



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE  
ENGENHARIA MECÂNICA

# **Influência do Agente Dopante na Resposta Biológica de Filmes Finos de Hidroxiapatite**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de  
Materiais na Especialidade de Biomateriais

**Autor**

**Sílvia Catarina Santos Neves**

**Orientadora**

**Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade**

**Júri**

**Presidente**

**Professora Doutora Maria Teresa Freire Vieira**  
**Professora Catedrática da Universidade de Coimbra**

**Vogais**

**Professora Doutora Maria Cristina de Castro Ribeiro**  
**Professora Adjunta do Instituto Superior de Engenharia do Porto**  
**Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade**  
**Investigadora Auxiliar da Universidade de Coimbra**

**Coimbra, setembro de 2012**

“A educação faz com que as pessoas sejam fáceis de guiar, mas difíceis de arrastar, fáceis de governar, mas impossíveis de escravizar.”

[Henry Peter]

## Agradecimentos

Este trabalho só foi possível graças à colaboração e apoio de algumas pessoas, às quais não posso deixar de prestar o meu enorme agradecimento.

À orientadora do trabalho, Doutora Ana Paula Piedade, pelo tempo disponibilizado, ensinamentos concedidos, dedicação, ajuda na realização de afazeres e orientação imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À Presidente de Mestrado, Professora Doutora Maria Teresa Vieira, que fez tudo pelo sucesso do Mestrado e que me concedeu todas as condições necessárias para este trabalho.

Ao Jorge Nunes pelo trabalho na observação das amostras por TEM, paciência e pelo seu tempo disponibilizado.

Ao Nelson Duarte e António Fonseca por todos os ensinamentos em técnicas de caracterização.

À Doutora Paula Morais pela ajuda e esclarecimentos fundamentais no que diz respeito às bactérias.

A todos aqueles que contribuíram, de forma direta ou indireta, construtivamente para este fim.

E por último, mas não menos importante, aos meus pais que me apoiaram e me deram todas as condições e regalias necessárias para que tudo isto se realizasse.

A todos, um MUITO OBRIGADA

## Resumo

A rejeição e a infecção bacteriana são dois dos maiores problemas em implantes ortopédicos, e por isso osteointegração e efeitos antibacterianos devem ser dois requisitos deste tipo de implante. O objetivo deste trabalho é a deposição de filmes finos de hidroxiapatite (HA) dopados com prata (HA/Ag), com flúor através da utilização de poli(tetrafluoretileno) (HA/PTFE) e ambos os materiais (HA/PTFE/Ag) e, após caracterização físico química avaliar da sua capacidade combinada de ser osteointegrador e ter efeito antibacteriano perante *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*. Simultaneamente foi avaliada a influência da composição química e da rugosidade dos substratos usando para o efeito o aço inoxidável 316L e o Ti cp4 com rugosidade nanométrica e micrométrica.

Os filmes finos, com espessuras entre os 160 e os 450 nm foram depositados por pulverização catódica r.f. magnetron. O teor de elemento dopante foi de 7%at. Ag, 50%at. F e 6%at. Ag/50%at. F. A análise estrutural evidenciou o facto de quase todos os revestimentos serem nanocompósitos, com matriz amorfa de HA, com uma distribuição das fases cristalinas nem sempre uniforme. Os filmes que foram codepositados com PTFE como fonte de F apresentam como fase maioritária o fluoreto de cálcio.

Os filmes finos têm maior capacidade osteointegradora, de acordo com os testes *in vitro* com solução de Hank, do que qualquer um dos substratos não revestidos, sendo que o melhor desempenho foi conseguido com as superfícies contendo F: HA/PTFE e HA/PTFE/Ag.

Os testes microbianos evidenciaram que a única estirpe de bactérias contra a qual as superfícies foram eficazes foi a *Staphylococcus epidermidis* e que o revestimento com melhor desempenho foi o HA/Ag, seguido pelo filme fino HA/PTFE/Ag.

No global, o revestimento que, com sucesso, consegue conjugar uma boa capacidade osteointegradora com atividade antimicrobiana é o HA/PTFE/Ag.

**Palavras-chave:** Hidroxiapatite, Prata, Flúor, Filmes finos, Efeito antibacteriano, Pulverização catódica.

## Abstract

Bacterial infection and biological rejection are two major problems in orthopedic implants and therefore osteointegration and antibacterial effects should be two major requirements of the implant. The objective of this work is the deposition of hydroxyapatite thin films (HA) doped with silver (HA/Ag), fluorine from poly(tetrafluoroethylene) (HA/PTFE) and both (HA/PTFE/Ag) by sputtering. After an extensive physicochemical characterization the modified surfaces were tested in their ability to cause osteointegration (by *in vitro* tests in Hanks solution) as well their ability to inhibit bacterial proliferation with three strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*. Simultaneously it was assessed the influence of substrate chemical composition and roughness by using 316L stainless steel and Ti cp4 with nano and micro rough surface.

The thin films, thickness between 160 and 450 nm were deposited by r.f magnetron sputtering. The amount of doped element was of 7 at% Ag, 50 at% F and 6 at% Ag/50 at% F. The microstructural analysis revealed the fact that almost all coatings are nanocomposites with an amorphous matrix of HA and that the distribution of the crystalline phases is not always homogenous. The coatings codeposited with PTFE, as the source of F, present as major component calcium fluoride.

All the modified surfaces are better osteointegrator than any of the uncoated substrates. The best performance was achieved by the surfaces with F: HA/PTFE and HA/PTFE/Ag.

The microbiological tests showed that the only bacterial strain to be inhibited by the modified surfaces was *Staphylococcus epidermidis* and that the coating with the best result was HA/Ag followed by HA/PTFE/Ag.

Considering the overall characterization the coating that, simultaneously, is able to induce osteointegration and antibacterial activity is HA/PTFE/Ag.

**Keywords** Hydroxyapatite, Silver, Fluor, Thin films, antibacterial effect, Sputtering.

## Índice

Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas .....	vii
Simbologia e siglas .....	viii
Simbologia.....	viii
Siglas .....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
1. Revisão Bibliográfica .....	2
1.1. Metais como Materiais Ortopédicos .....	2
1.2. A Hidroxiapatite e a Osteointegração .....	4
1.3. Prata .....	5
1.3.1. A Prata e o seu Efeito Antibacteriano .....	6
1.4. Flúor.....	8
1.5. Modificação de Superfícies.....	9
1.5.1. Revestimentos de HA dopados.....	10
2. Materiais e Métodos .....	13
2.1. Pulverização Catódica.....	13
2.2. Microsonda Eletrónica .....	14
2.3. Difração de Raios X.....	14
2.4. Microscopia Eletrónica de Transmissão .....	14
2.5. Microscopia Eletrónica de Varrimento .....	15
2.6. Microscopia de Força Atómica.....	15
2.7. Potencial Zeta .....	16
2.8. Ângulo de Contacto .....	17
2.9. Testes <i>in vitro</i> .....	18
2.10. Testes antibacterianos .....	18
3. Resultados e discussão .....	20
3.1. Composição Química e Espessura dos Revestimentos.....	21
3.2. Morfologia/topografia dos Revestimentos.....	22
3.3. Estrutura Cristalina .....	26
3.4. Carga de Superfície.....	30
3.5. Hidrofilicidade/Hidrofobicidade.....	31
3.6. Testes <i>in vitro</i> .....	34
3.6.1. Composição Química .....	35
3.6.2. Libertação de Flúor.....	36
3.6.3. Morfologia da Superfície.....	36
3.6.4. Topografia da Superfície .....	39
3.7. Testes antibacterianos .....	41
3.7.1. Teste em Meio Sólido NA.....	41
3.7.2. Testes em Meio Líquido LB.....	45
Conclusão .....	49
Referências bibliográficas .....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Problemas possíveis em materiais metálicos como implantes ortopédicos.....	3
Figura 1.2 - Diferença da interface implante/osso com biomateriais bioinerte e bioativo ....	4
Figura 1.3 - Formação de um biofilme sobre um implante .....	6
Figura 1.4 - Sistema da pulverização catódica para materiais não condutores .....	10
Figura 3.1 - Imagens de AFM dos substratos, 50×50 μm <sup>2</sup> a) aço, b) Ti polido, c) Ti rugoso. .....	20
Figura 3.2 - Medição da espessura de um filme fino por AFM: revestimento HA/Ag .....	21
Figura 3.3 - Micrografias SEM a) HA/PTFE/Ag em aço, b) HA/PTFE/Ag em Ti polido e c) HA/PTFE/Ag em Ti rugoso. ....	23
Figura 3.4 - Micrografias SEM dos revestimentos: a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag, d) HA/PTFE/Ag.....	23
Figura 3.5 - Imagens de AFM, 1×1 μm <sup>2</sup> , dos quatro revestimentos: a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag. ....	25
Figura 3.6 - Difratogramas dos revestimentos: * Ca(OH) <sub>2</sub> , • Ag e o CaF <sub>2</sub> .....	26
Figura 3.7 - Imagens TEM de HA, a) imagem de campo claro; b) padrão de difração com os planos da fase Ca(OH) <sub>2</sub> assinalados.....	28
Figura 3.8 - Imagens TEM de HA/PTFE, a) imagem de campo claro; b) padrão de difração com os planos da fase Ca(OH) <sub>2</sub> assinalados a azul e os planos de da fase CaF <sub>2</sub> assinalados a verde.....	29
Figura 3.9 - Imagens TEM de HA/PTFE, a) imagem de campo claro; b) padrão de difração com os planos de fase Ca(OH) <sub>2</sub> assinalados.....	29
Figura 3.10 - Imagens TEM de HA/Ag, a) imagem de campo claro; b) padrão de difração com os planos da fase Ca(OH) <sub>2</sub> assinalados a azul e os planos de da fase Ag assinalados a laranja. ....	30
Figura 3.11 - Concentração de flúor na solução ao longo de 30 dias.....	36
Figura 3.12 – Micrografias SEM dos substratos de a) aço, b) Ti polido e c) Ti rugoso, após quatro semanas de imersão em solução balanceada de Hanks. ....	37
Figura 3.13 - Micrografia SEM e espectro EDS do revestimento de HA após 4 semanas em solução balanceada de Hanks. ....	37
Figura 3.14 - Micrografia SEM e espectro EDS do revestimento de HA/Ag após 4 semanas em solução balanceada de Hanks. ....	38
Figura 3.15 - Micrografia SEM de HA/PTFE após 4 semanas em solução de Hanks. ....	38
Figura 3.16 - Micrografia SEM de HA/PTFE/Ag após 4 semanas em solução de Hanks. .	38
Figura 3.17 - Micrografia SEM e análises EDS de HA/PTFE/Ag, ×: EDS da parte escura, ×: EDS da clara.....	39
Figura 3.18 - Imagens de AFM, 1×1 μm <sup>2</sup> , dos filmes após teste <i>in vitro</i> . A primeira imagem de fase, a do meio imagem topográfica em 2D e a terceira imagem topográfica em 3D dos quatro revestimentos: a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag. ....	40
Figura 3.19 - Halos de inibição obtidos no teste antimicrobiano, para HA/Ag e para HA/PTFE/Ag, e HA/PTFE em <i>Bacillus</i> , onde não houve halo de inibição. ....	41
Figura 3.20 - Comparação entre as paredes celulares de uma bactéria Gram-positiva e de uma Gram-negativa .....	42

---

Figura 3.21 - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em contacto com <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	43
Figura 3.22 - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em contacto com <i>Bacillus cereus</i> .....	44
Figura 3.23 - Micrografias SEM com menor ampliação de HA/PTFE, HA/Ag e HA/PTFE/Ag, respetivamente, em contacto com <i>Bacillus cereus</i> .....	44
Figura 3.24 - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em contacto com <i>Escherichia coli</i> .....	45
Figura 3.25 - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em meio líquido com <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	46
Figura 3.26 - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em meio líquido com <i>Bacillus cereus</i> .....	47
Figura 3.27 -Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em meio líquido com <i>Escherichia coli</i> .....	47



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Parâmetros de deposição e designação das amostras. ....	13
Tabela 2.2 - Composição da Solução Balanceada de Hanks. ....	18
Tabela 3.1 - Valores da rugosidade superficial dos substratos utilizados. ....	20
Tabela 3.2 - Composição química e espessura dos revestimentos. ....	21
Tabela 3.3 – Parâmetros da rugosidade superficial calculados por análise de AFM. ....	25
Tabela 3.4 - Identificação da estrutura dos filmes finos: comparação dos picos de difração com as fichas ICDD. ....	27
Tabela 3.5 - Valores médios de potencial zeta ( $\zeta$ ) e respectivos desvios padrões, d. p. ....	31
Tabela 3.6 - Ângulos de contacto das amostras para diferentes $\gamma_L$ e tensão de adesão da água. ....	32
Tabela 3.7 - Tensão de superfície e componentes polar e dispersiva das superfícies em estudo. ....	33
Tabela 3.8 - Comparação da composição química antes e depois de um mês em solução. ....	35
Tabela 3.9 – Valores dos parâmetros de rugosidade, calculadas por AFM, da superfície dos filmes finos após um mês de imersão na solução balanceada de Hanks. ....	39

## SIMBOLOGIA E SIGLAS

### Simbologia

- A - Secção transversal do canal
- $\beta$  - Largura à meia altura dos picos de difração
- $d$  - Distância entre planos
- $\frac{dU}{dp}$  - Declive da “streaming current” versus pressão
- $\gamma_L$  - Tensão superficial de um líquido
- $\gamma_S$  - Tensão superficial de um sólido
- $\gamma^p$  - Força dispersiva não-polar da superfície
- $\gamma^d$  - Força polar da superfície
- $\Delta_f H^0$  - Entalpia padrão de formação
- $e$  - Carga do eletrão
- $\epsilon_0$  - Permittividade em vácuo
- $\epsilon$  - Constante dielétrica do eletrólito
- E - Energia no momento do impacto entre iões e o alvo
- L - Comprimento do canal do potencial zeta
- $n$  - Ordem de difração
- $\eta$  - Viscosidade do eletrólito
- $\theta$  - Ângulo de incidência dos raios X
- $\theta$  - Ângulo de contacto
- Sa - Rugosidade média
- Sms - Rugosidade quadrática média
- $\tau^0$  - Tensão de adesão da água
- V - Tensão aplicada entre cátodo e ânodo
- $\lambda$  - Comprimento de onda
- $\zeta$  - Potencial zeta

## **Siglas**

HA – Hidroxiapatite

PTFE – Poli(tetrafluoretileno)

AFM - Atomic Force Microscopy

AISI - American Iron and Steel Institute

ATR - Attenuated Total Reflectance

EDS - Energy Dispersive Spectroscopy

EPMA - Electron Probe Micro Analysis

FTIR - Fourier Transform Infra Red spectroscopy

ICDD - International Center for Diffraction Data

SEM - Scanning Electron Microscopy

XRD - X-Ray Diffraction

## INTRODUÇÃO

O titânio (Ti) e suas ligas são dos materiais mais utilizados em implantes ortopédicos devido à sua compatibilidade biológica e resistência mecânica, entre outras propriedades. Nesta aplicação específica a osteointegração entre implante e o osso e a ausência de infecções após implante são fatores preponderantes para sucesso do procedimento cirúrgico.

O presente trabalho tem como objetivo a produção e caracterização de filmes finos de hidroxiapatite (HA) e HA dopado com agentes considerados antibacterianos, como a prata (Ag) e o flúor (F). Ao comparar o desempenho dos diferentes revestimentos é estudado qual a superfície que, concomitantemente, poderá apresentar uma boa osteointegração e um efeito antimicrobiano apropriado.

Os revestimentos são depositados por pulverização catódica r.f magnetron a partir de um alvo de HA não dopado e dopado com Ag, com poli(tetrafluoretileno) (PTFE) e com os dois materiais simultaneamente, dando origem a quatro superfícies quimicamente distintas. Os revestimentos foram caracterizados quanto à composição química, morfologia, topografia, carga superficial, estrutura cristalina, ligações químicas e molhabilidade. O seu comportamento *in vitro*, em solução balanceada de Hanks, permite aferir da sua capacidade osteointegradora e a sua atividade antibacteriana foi avaliada quanto à sua capacidade de inibir o crescimento e a formação de um biofilme em três estirpes bacterianas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*.

Os filmes foram depositados sobre Ti com diferentes rugosidades e aço inoxidável 316L (AISI) com o intuito de avaliar a influência da rugosidade do substrato no desempenho final dos revestimentos, bem como aferir da possibilidade de substituir as ligas de titânio por aço 316L, material, economicamente, mais vantajoso.

A presente dissertação é composta por três capítulos seguidos das principais conclusões consequentes do trabalho de investigação realizado. No primeiro capítulo é apresentada uma breve revisão bibliográfica que aborda, sucintamente, os materiais utilizados e as capacidades osteointegradora e antimicrobiana de revestimentos à base de HA. No segundo capítulo são, resumidamente, descritos os materiais, técnicas e equipamentos utilizados ao longo do trabalho. No último capítulo são apresentados e discutidos os resultados.

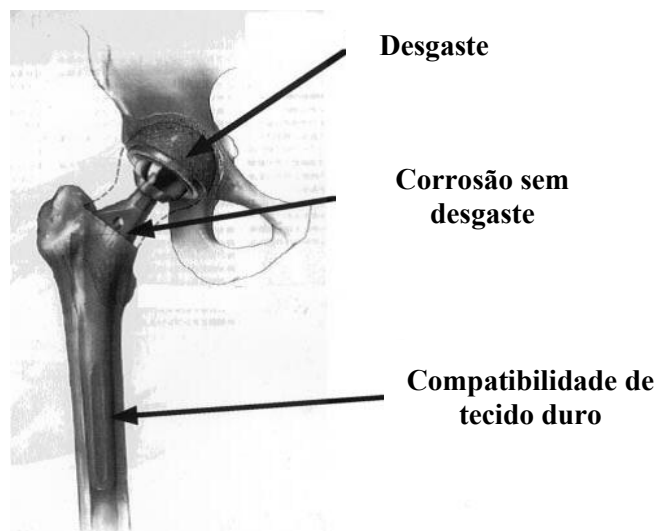
# 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1. Metais como Materiais Ortopédicos

Um biomaterial para ser ideal numa utilização ortopédica deve ter uma densidade relativamente baixa, pouca ou nenhuma citotoxicidade, elevada resistência à fadiga e corrosão, boa estabilidade química e biocompatibilidade com o tecido ósseo [1]. Os metais e as suas ligas têm boas propriedades mecânicas, como elevado módulo de elasticidade, resistência à fadiga e ductilidade o que faz deles uma classe de material ideal para implantes sujeitos a cargas.

O titânio é, de entre os metais, um dos mais utilizados para este fim, pois tem uma densidade baixa ( $4507 \text{ Kg.m}^{-3}$ ), apresenta propriedades mecânicas semelhantes às do osso e é resistente à corrosão. De entre os mais utilizados para implantes ósseos, e que são reportados na literatura como sendo mais biocompatíveis, encontra-se o Ti comercialmente puro grau 4 (Ti cp4) e a liga de Ti com 6% ponderal (%pd.) de alumínio e 4% pd. de vanádio (Ti-6Al-4V). A seleção destes dois materiais deve-se, essencialmente, à formação de um filme de óxido estável e protetor na superfície do implante de Ti logo que este entra em contacto com o oxigénio, o que irá impedir o encapsulamento do implante por tecido fibroso e melhorar a sua resistência à corrosão [2]. O problema surge com a destruição desta camada de óxido, o que ocorre com alguma frequência uma vez que este tipo de implante está sujeito a grandes cargas, fricção e desgaste. Outro fator que pode causar problemas no revestimento de óxido é a composição química dos fluídos biológicos, uma vez que estes contêm aminoácidos e proteínas que tendem a acelerar a corrosão (figura 1.1). Além deste efeito há a considerar o da variação dos valores de pH, que em condições normais oscilam entre 7,35 e 7,45, uma vez que nos tecidos duros estes podem baixar até 5,2 aquando da colocação do implante e manter-se nesse valor durante cerca de duas semanas. Para valores acídicos de pH é normal ocorrer desnaturação proteica que pode, em casos extremos, desencadear o processo de resposta imunológica do organismo, culminando com a rejeição do implante. Deste modo, quando o implante à base de Ti está a ser solicitado, e em contacto com fluídos corporais, fica mais propício à corrosão libertando para o meio iões Ti, que facilmente interagem com iões orgânicos. Estas

variações provocam alterações no tecido circundante do implante, o que, se em quantidade significativa, pode induzir toxicidade e alergias [3].



**Figura 1.1** - Problemas possíveis em materiais metálicos como implantes ortopédicos [adaptada de 3].

Outra desvantagem da utilização de metais como implantes ortopédicos é a sua pouca bioatividade, que leva alguns autores a classificar este material como bioinerte, o que é consequência de uma ligação mecânica entre implante e tecido, mas não uma ligação biológica. Esta adesão implante/tecido é dependente em grande escala das características superficiais do implante, tais como propriedades químicas, topografia e rugosidade [4].

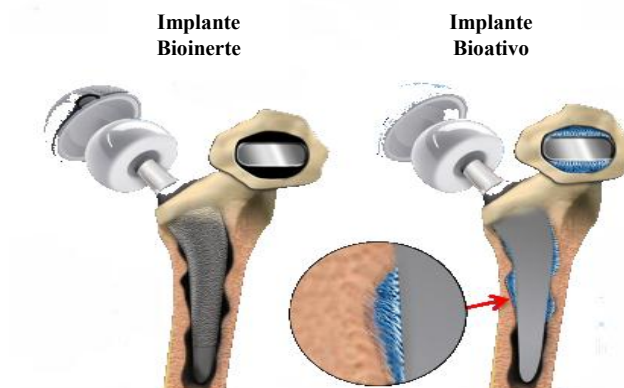
Além do Ti, também outros materiais metálicos são utilizados para implantes ortopédicos, como o aço inoxidável, sendo o aço 316L um dos mais utilizados em biomedicina. Este é de fácil maleabilidade, tem uma boa resistência à corrosão devido à formação de uma camada de óxido de cromo na superfície e é considerado biocompatível em aplicações ortopédicas, apresentando como grande vantagem em relação ao Ti o seu baixo custo. A grande desvantagem está na libertação de íons de ferro, níquel e cromo como produtos da sua corrosão, que se mostraram ser carcinogénicos e alérgicos para o organismo humano [5,6].

A corrosão, causada pelo meio, pode levar ao enfraquecimento e falha do implante, além de, como já referido, poder causar a libertação de íons nocivos para os tecidos ao seu redor. Por estes motivos, uma das estratégias mais utilizadas para minimizar os problemas tem sido o da modificação de superfícies, onde a deposição de um revestimento sobre a superfície do implante pode ajudar a melhorar a resistência ao

desgaste, à corrosão e também a sua osteointegração e bioatividade, sem afetar negativamente as propriedades do metal [7,8]. De entre os materiais que podem ser utilizados com este objetivo, sem dúvida que a hidroxiapatite é, devido às suas características biomiméticas com a parte inorgânica do osso, uma das escolhas óbvias.

## 1.2. A Hidroxiapatite e a Osteointegração

Osteointegração é a ligação biológica entre implante e osso quando, em torno do implante, se forma tecido ósseo mas sem formação de tecido fibroso, acontecimento que ocorre naturalmente quando se desencadeia uma resposta inflamatória e que pode conduzir à rejeição do implante por parte do organismo. Para auxiliar este processo biológico, aquando da implantação de biomateriais, normalmente recorre-se a biocerâmicos como a hidroxiapatite (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ). Este material é o principal componente mineral do osso e da dentina, caracterizado por ser osteocondutor e osteoindutivo, e por isso tem as mais variadas aplicações na saúde [1,5]. A sua presença é a solução para promover a osteointegração entre osso/implante, incentivando a formação de osso em redor do biomaterial. A osteointegração é um processo complexo que se inicia com a dissolução de HA, reprecipitação, troca de iões, ligação, proliferação e diferenciação celular que levam à formação da matriz extracelular (figura 1.2). Na literatura é afirmado que uma estrutura porosa, rugosa e texturada influencia positivamente a adesão, crescimento e diferenciação celular e que estes fatores ocorrem melhor numa superfície revestida com HA do que não revestida [1].



**Figura 1.2** - Diferença da interface implante/osso com biomateriais bioinerte e bioativo [Adaptada de 11].

Por tudo isto, a forma sintética de HA, muito semelhante estrutural e quimicamente com a fase mineral do osso e da dentina, é o material mais utilizado em implantes e está extensamente estudada para aplicações médicas. As principais utilizações incluem o preenchimento de defeitos ósseos, revestimento fino de metais para melhorar a biocompatibilidade, ou seja, para promover a rápida osteointegração em implantes metálicos [12,13]. Também é referenciado na literatura disponível que este sucesso da HA como material de revestimento para melhorar a osteointegração se deve à liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , que incentivam a resposta celular, que é o principal objetivo do revestimento de implantes de Ti [2].

A razão de HA ser um material utilizado principalmente sob a forma de revestimentos e não como o implante maciço em si é baseada na sua fragilidade quando exposta a cargas, a sua alta taxa de dissolução em ambiente biológico e à pobre resistência à corrosão em ambiente ácido [7]. Contudo, o sucesso a longo prazo destes implantes depende não só da sua osteointegração entre implante/osso, mas também da prevenção de infecções bacterianas após implantação, que é um dos maiores problemas a nível de dispositivos médicos internos [14].

### 1.3. Prata

A prata é um metal que se encontra na natureza em estado puro e apresenta um excelente poder de reflexão da luz de onde tem origem o seu símbolo químico, Ag, que vem do latim *argentum*, que significa clara e brilhante. É o metal com melhor condutividade elétrica e térmica, é dúctil e maleável e é utilizada há milhares de anos pelo Homem. Na antiguidade foi muito utilizada para preservação de água e vinho, mas também em joias e moedas. A sua primeira utilização na medicina, descrita cientificamente, ocorreu em 1884 quando se juntou 1% de nitrato de prata a uma solução ocular para a prevenção de conjuntivite neonatal. Desde cedo os iões de Ag mostraram efeito tóxico em bactérias, fungos e vírus sem elevada toxicidade para o ser Humano, e por isso é atualmente usada em pensos para feridas externas, desinfetante de equipamentos médicos e também antibióticos [15].



### 1.3.1. A Prata e o seu Efeito Antibacteriano

Um dos maiores problemas após colocação de implantes é a infecção, resultado da adesão e colonização bacteriana seguida pela formação de uma camada de biofilme (figura 1.3). A colocação de um implante afeta o mecanismo de defesa do hospedeiro ao danificar as barreiras epiteliais [16,17]. O tecido hospedeiro e os micro-organismos competem pela superfície do implante, se o organismo conseguir vencer a invasão dos micro-organismos com uma resposta eficiente a infecção não ocorre, o que impede a colonização. O período decisivo para o sucesso a longo prazo do implante são as primeiras seis horas após a implantação, pois durante este período o implante está particularmente recetivo à colonização de bactérias na sua superfície [18]. As principais fontes de infecções são a atmosfera ambiente da sala de cirurgia, o equipamento cirúrgico, as roupas dos profissionais de saúde ou até bactérias residentes na pele ou organismo do paciente [8]. As complicações causadas pela infecção ao redor do implante reduzem a taxa de sucesso em cirurgia ortopédica e trauma, levam a insatisfação do paciente e a enormes custos médicos, dado que há necessidade de remoção do implante e da colocação de novo implante [19]. Acresce ainda o facto de este segundo implante ter mais 40% de hipótese de infecção do que o primeiro [14].

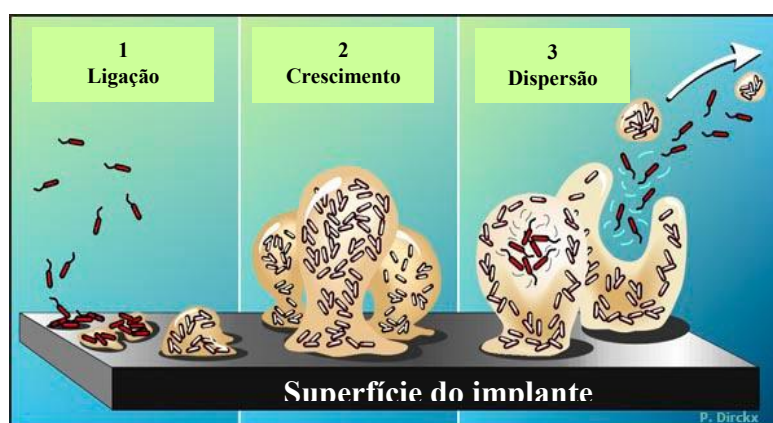


Figura 1.3 - Formação de um biofilme sobre um implante [Adaptada de 20].

Devido à infecção bacteriana após colocação do implante ser uma complicação ascendente muito significativa, várias são as tentativas para reverter e combater a infecção. O método mais tradicional é o uso de antibióticos, mas este, para além de causar toxicidade sistémica, nem sempre é eficaz no combate à proliferação bacteriana na superfície do

material implantado não conseguindo prevenir contra infecções pós-cirúrgicas a longo prazo [21]. Para matar as bactérias num biofilme seria necessário 1000 vezes a dose de antibiótico necessário para alcançar o mesmo efeito numa suspensão celular e, mesmo assim, há bactérias, tais como *Staphylococcus epidermidis*, que têm capacidade de iludir a defesa imunológica e a terapia por antibióticos [11,21]. Devido a estas desvantagens dos antibióticos, a pesquisa foi também direcionada para o desenvolvimento de materiais resistentes a bactérias, superfícies sintéticas e revestimentos resistentes à colonização bacteriana [19,22].

Este problema da infecção pode então ser reduzido ao utilizar um material antibacteriano na superfície, como prata, Ag, cobre, Cu, e zinco, Zn, mas, tendo em consideração que tanto o Zn e o Cu levam a uma diminuição da resistência à corrosão por parte do Ti, a prata é o material mais indicado. A prata é conhecida por apresentar efeitos bactericidas, bem como um amplo espectro de atividades antibacterianas [9,23]. Existem diferentes formas de prata que lhe conferem diferentes graus de propriedades antibacterianas (metálica, iónica, nanocrystalina) [10]. Um dos modos de a prata poder causar inativação bacteriana é por ligação ao ADN microbiano, prevenindo a replicação dos micro-organismos [22]. Outras vias incluem a perfuração das membranas celulares das bactérias, ou a ligação aos grupos tióis de aminoácidos e de proteínas levando à sua inativação [19]. As bactérias mostram ter pouca capacidade para desenvolver resistência à Ag e por isso esta consegue ter um efeito inibitório de bactérias a concentrações mínimas e sem efeitos tóxicos para as células. Acresce o facto de que materiais dopados com Ag mostraram também capacidade de ajudar na cicatrização de feridas, reduzindo a inflamação e granulação do tecido, auxiliando, deste modo, a reparação epidérmica [24].

Na última década houve um forte crescendo da pesquisa de nanopartículas de prata para prevenção de infecções, esta tem uma forte toxicidade para uma larga gama de micro-organismos e por isso é um material muito utilizado em aplicações antibacterianas [9]. Estes resultados são comprovados em alguns estudos já feitos anteriormente, que mostram que incorporação de prata em biomateriais tem sucesso a diminuir a ligação de bactérias à superfície do material. Por todos os motivos referidos, a prata é um bom material para incorporar em superfícies de hidroxiapatite [12,25]. Contudo, o excesso de Ag no organismo pode levar a problemas a nível de saúde do hospedeiro, porém na literatura é referido que revestimentos com quantidade de Ag iguais ou inferiores a 5 %pd.

não apresentam toxicidade para o organismo e que valores de Ag no sangue até um valor de 200 ppb não são incomuns, uma vez que o ser humano ingere pequenas quantidades de Ag diariamente, que, posteriormente, serão reabsorvidas pelo intestino e outras serão excretadas pelo fígado [10,24].

#### 1.4. Flúor

Este elemento químico nunca ocorre na natureza na sua forma pura. Muitos cientistas trabalharam na separação deste elemento a partir dos vários compostos que o continham, mas só em 1886 o químico Henri Moissan teve sucesso. Este elemento pertence ao grupo 17 da tabela periódica, e é, deste grupo, o elemento mais reativo uma vez que reage com quase todos os outros elementos, exceto os gases inertes. Elemento muito utilizado em dentífricos pois são eficazes na prevenção dentária, uma vez que tornam o dente mais forte e resistente à deterioração. Na literatura disponível é afirmado que este elemento em excesso pode causar irritação grave nas vias respiratórias, podendo levar até à morte [26].

Alguns dos estudos feitos sobre revestimentos de HA focaram a incorporação de flúor, na estrutura de hidroxiapatite,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2\text{F}_x(\text{OH})_{2-x}$ , onde os iões  $\text{F}^-$  substituem os grupos  $\text{OH}^-$ . Os resultados mostram que ao incorporar flúor é possível melhorar as características da hidroxiapatite que por vezes restringem a sua aplicação na medicina, como por exemplo as suas pobres propriedades mecânicas [13,27]. HA parcialmente substituída por F tem sido alvo de alguma investigação devido à presença considerável de HA parcialmente fluoretada em ossos e dentes. O fluor promove a mineralização e cristalização de fosfato de cálcio no processo de desenvolvimento dental e ósseo, melhora também a diferenciação de osteoblastos em cultura celular. Adicionalmente, os revestimentos de HA com F conseguem fornecer níveis de F suficientemente baixos para melhorar a formação de osso agindo em redor das células, incrementando a ligação celular [27,28].

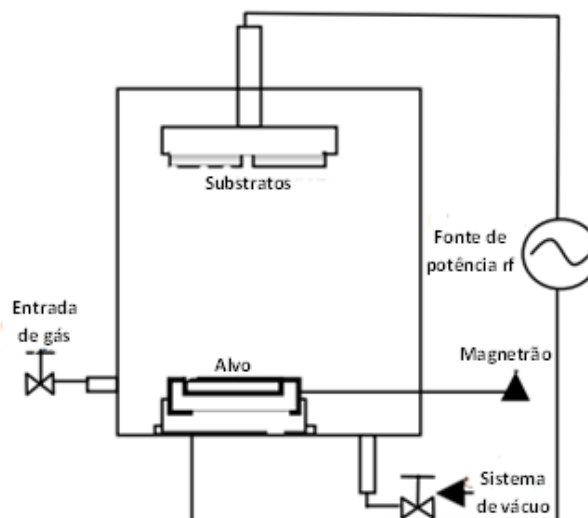
Na literatura disponível é referido que este tipo de revestimento é uma boa alternativa a revestimentos de HA puro devido à sua comparável biocompatibilidade e bioatividade, melhor estabilidade aquando em ambientes fisiológicos e à sua boa atividade antibacteriana, uma vez que a libertação de iões  $\text{F}^-$ , por parte do revestimento, pode atuar

como agente antimicrobiano ao afetar o metabolismo microbiano, levando à redução do crescimento e proliferação bacteriano na superfície do implante [29,30].

## 1.5. Modificação de Superfícies

São vários os métodos utilizados para integrar prata ou fluor na hidroxiapatite, como por exemplo, o método sol-gel [19], a deposição eletroquímica [16], a deposição assistida por feixe iônico (IBAD do inglês “*ion beam assisted deposition*”) [12,17], a síntese mecânica (MA do inglês “*mechanical alloying*”) [27] ou a deposição por laser pulsado (PDL do inglês “*Pulsed Laser Deposition*”) [9,10]. Neste trabalho a pulverização catódica ou “sputtering” foi o método escolhido por ser um método físico e não químico, devido à sua capacidade de depositar revestimentos com boa adesão em substratos metálicos, pureza elevada do processo e pelo facto de permitir combinações de materiais não possíveis em outras técnicas, de acordo com o concluído num estudo realizado por *Chen et al.* [22] Deposição catódica, técnica classificada como deposição física em fase de vapor (PVD, do inglês “*Physical Vapor Deposition*”), compreende três fases: a transformação do material a depositar para vapor, o transporte desse material transformado para a superfície do substrato e a condensação do vapor na superfície do substrato, formando o filme [1].

O seu funcionamento passa por um campo elétrico gerado entre o substrato (ânodo) e o(s) alvo(s) (cátodo), numa câmara sob atmosfera controlada onde é introduzido um gás, normalmente Árgon por ser um gás inerte e também por garantir uma taxa de pulverização adequada para quase todos os elementos químicos. O árgon sujeito a um campo elétrico ioniza, o que origina o plasma, que ao bombardear o alvo faz com que os átomos sejam ejetados e se depositem no substrato formando o revestimento (figura 1.4). Esta técnica pode também usufruir de um sistema magnetron que consiste na aplicação de um campo magnético que irá forçar os eletrões a descrever uma trajetória helicoidal até ao alvo que fará com que a distância percorrida por estes seja muito maior aumentando assim a probabilidade de colisão com os átomos de gás e por consequência melhor ionização deste. A fonte utilizada na pulverização catódica pode ser contínua, para materiais condutores, ou de rádio frequência, para materiais não condutores [31].



**Figura 1.4** - Sistema da pulverização catódica para materiais não condutores [Adaptada de 32].

### 1.5.1. Revestimentos de HA dopados

No que concerne a revestimento de HA dopados com Ag, *W. Chen et al* investigaram o efeito antibacteriano e citotóxico *in vitro* de um revestimento, depositado por pulverização catódica, contendo HA e Ag (2 %pd.), tendo concluído que havia uma redução de bactérias bastante significativa quando em comparação com um revestimento unicamente formado por HA e que a alteração de citotoxicidade não era preocupante [22]. Dois anos depois, *Chen et al* procuram caracterizar um revestimento de HA contendo Ag (0-5 %pd.) preparado por pulverização plasmática quanto à sua antibactericidade e citotoxicidade. O revestimento era efetivo na inibição da *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e não foram observadas citotoxicidade e hemólise significativas [23]. Em 2010 *Jelínek et al* testou o efeito antibacteriano de camadas de HA dopadas com diferentes quantidades de Ag, de 0 a 14 %at.. Neste estudo utilizou a técnica de deposição por laser pulsado e concluiu que a camada com melhor efeito antibacteriano era a que continha apenas 1,2 %at. de Ag. O mesmo estudo levou os autores a afirmar que a estrutura do filme, amorfo ou cristalino, não tinha influência na eficácia antibacteriana [9]. No mesmo ano, *Ando et al* desenvolveram um revestimento, por pulverização térmica, de fosfato de cálcio contendo Ag (3 %pd.) e avaliaram a sua eficácia antibacteriana e segurança biológica. A superfície modificada suprimiu por completo o crescimento de algumas bactérias, tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e diminuiu o número

de bactérias aderente à superfície do revestimento sem apresentar toxicidade [33]. Em 2011 *Rabiei et al* ao recorrerem à deposição assistida por feixe iônico preparou revestimentos com diferentes percentagens de Ag, de 0 a 7 %pd., em substratos de vidro e Ti com o objetivo de observar a adesão dos revestimentos e qual proporcionaria o melhor crescimento celular de osteoblastos. O revestimento com 1 %pd. de Ag mostrou a melhor adesão e a maior taxa de proliferação celular, enquanto que o revestimento com 6,6 %pd. de Ag exibiu os piores resultados [12]. No mesmo ano *Lu et al* codepositaram HA e Ag num substrato de Ti recorrendo a deposição eletroquímica para averiguar sobre a sua antibactericidade e biocompatibilidade, de onde pode concluir a boa biocompatibilidade e propriedade antimicrobiana do revestimento contendo Ag (7-15 % pd.) [34]. *Qu et al* revestiram scaffolds de Ti poroso com um compósito HA/Ag pelo método sol-gel e comparou o desempenho de um revestimento que consistia exclusivamente em HA, com outros dopados com prata com teores de 0,8 %pd. e 1,6 %pd.. Os dois revestimentos que possuíam prata apresentaram uma elevada taxa antibactericida contra a *Escherichia coli* e a *Staphylococcus albus*, e a biocompatibilidade do revestimento com 0,8 %pd. de Ag apresentava uma biocompatibilidade comparável à do revestimento de HA, sendo o revestimento selecionado pelos autores [35]. *Jelínek et al*, continuando o trabalho de 2009, repetiram todo o procedimento mas desta vez com o objetivo de descobrir qual o valor mínimo de Ag necessário num revestimento de HA que seria capaz de conseguir alta eficácia antibacteriana. O estudo demonstrou que o revestimento com 4,4 %at. de Ag apresentava excelentes propriedades antibacterianas, cerca de 99% contra o *Bacillus subtilis* [10]. *Stanic' et al* estudaram o efeito antibacteriano de HA dopada com prata monofásica ( $\text{Ag}_x\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  para  $0,002 \leq x \leq 0,04$ ), tendo dissolvido  $\text{Ag}_2\text{O}$  numa solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  que foi, posteriormente, adicionada lentamente a uma suspensão de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . A amostra com maior quantidade de Ag ( $x=0,04$ ) mostrou a atividade antimicrobiana mais elevada, ao inibir a *Escherichia coli* em 100% e reduzindo em 99% a presença de *Staphylococcus aureus* [36]. Ao sintetizar HA de osso bovino no qual incluíram nanopartículas de Ag, pelo método de decomposição térmica seguido de redução de nitrato de prata, *Nirmala et al* concluíram que o efeito antibacteriano deste composto era mais eficaz numa bactéria *Gram-positiva* que numa *Gram-negativa* e que HA pura não apresentava nenhuma atividade antimicrobiana [37].

No que se refere ao estudo de filmes de HA dopados com flúor pode ser referido que em 2005 *Cheng et al* iniciaram uma pesquisa para estudar a influência do teor de flúor no comportamento de osteoblastos em revestimentos de hidroxiapatite fluoretada (FHA) preparados pelo método sol-gel, onde concluíram que para um melhor acordo entre boa ligação celular, proliferação celular, resistência de dissolução e redeposição de apatite, o x em  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2\text{F}_x(\text{OH})_{2-x}$  devia variar de 0,7 a 1,5 [38]. Algo semelhante foi tentado por *Fathi et al* em 2009, que pretendiam preparar, por síntese mecânica, FHA nanocristalina com diferentes graus de fluoretação e estudar a sua bioatividade *in vitro* por imersão em SBF (do inglês “*Simulated Body Fluid*”). Estes investigadores concluíram que o aumento de flúor leva a uma diminuição na taxa de dissolução de FHA mas aumentou a taxa de nucleação do osso [28]. No ano seguinte houve algumas investigações neste campo, sendo de salientar a de *Ge et al* que, através de deposição eletroquímica, criaram um revestimento denso e uniforme de fosfato de cálcio fluoretado (5 %at. de F) com o objetivo de testar o seu efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Porphyromonas gingivalis*. Desta investigação foi concluído que a atividade antibacteriana do revestimento FHA é muito maior que a do revestimento só de HA [30]. No mesmo ano, *Rau et al* revestiram um substrato de Ti com FHA (2,2-2,6 %pd. de F), por deposição de laser pulsado, e pretendiam investigar este material para aplicação em implantes ósseos e dentários. A investigação demonstrou que ao variar a temperatura do substrato durante o processo de deposição é possível obter filmes finos de diferentes texturas e rugosidades [29]. Numa investigação subsequente *Ge et al* procuraram estudar a integridade do revestimento FHA, depositado por pulverização catódica, continuando assim o seu estudo sobre FHA. Comprovou que o revestimento com flúor apresenta boa integridade química e mecânica, que é mais estável em ambiente fisiológico que um revestimento de HA sem flúor, que tem maior adesão e que a integração de flúor não tem efeito na carga superficial [13].

Em nenhuma da literatura consultada o PTFE foi utilizado com o objetivo de depositar filmes de HA com flúor, nem foi encontrada nenhuma referência ao efeito conjunto de Ag e F, pelo que se considera que o presente estudo pode contribuir para o avanço do conhecimento neste campo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Pulverização Catódica

Os filmes foram depositados por pulverização catódica usando um equipamento rf magnetrão (Edwards Coating System E306A), em modo não reativo sendo o gás de descarga utilizado o Árgon (99,9999% puro). Na deposição de todos os filmes foi usado um alvo de hidroxiapatite sinterizada (Cerac - 99,99% de pureza). Para aferir da quantidade de pastilhas de PTFE e Ag que seriam utilizadas para dopar o alvo de HA foram efetuados testes preliminares. No que concerne o PTFE, independentemente do número de pastilhas de 10x10 mm<sup>2</sup> usadas os filmes apresentavam teores de flúor de 50 %at.. Face a estes resultados e, por uma questão de simetria no alvo, foram usadas duas pastilhas de PTFE para as deposições subsequentes. No caso dos testes preliminares de HA dopada com várias pastilhas de Ag, foram avaliados teores entre 1 e 50%at.. Para as deposições seguintes foi selecionada a configuração que dava origem ao filme com 8%at. de Ag e que correspondia à dopagem do alvo de HA com uma pastilha de Ag de 10x10 mm<sup>2</sup>.

Os principais substratos utilizados foram o Ti cp4 e o aço inoxidável 316L AISI. Também foram usados como substratos lâminas de vidro e silício (Si). Todos os substratos foram previamente limpos em ultrassons durante 10 minutos em acetona, etanol e água desionizada.

As condições de limpeza e deposição, bem como a designação dadas aos filmes finos estão sumariadas na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Parâmetros de deposição e designação das amostras.

Designação	Limpeza do substrato			Limpeza do alvo			Deposição		
	Pressão (Pa)	Potência (W)	Tempo (min)	Pressão (Pa)	Potência (W)	Tempo (min)	Pressão (Pa)	Potência (W)	Tempo (min)
HA	0,7	250	10	0,7	250	10	0,7	250	90
HA/PTFE	0,7	250	10	0,7	250	10	0,7	250	90
HA/Ag	0,7	250	10	0,7	250	10	0,7	250	90
HA/PTFE/Ag	0,7	250	10	0,7	250	10	0,7	250	90



## 2.2. Microsonda Eletrónica

O princípio de funcionamento da microsonda eletrónica (EPMA - do inglês “*Electron Probe Micro Analysis*”) consiste na incidência de um feixe de elétrons sobre a superfície da amostra. Este facto provoca alterações nos níveis eletrónicos dos elementos presentes na amostra, o que resulta, entre outros fenómenos, na emissão de raios X. O comprimento de onda da radiação emitida é característica de cada elemento, tornando assim possível inferir sobre os elementos que constituem a amostra [39].

A composição química foi avaliada por EPMA, num equipamento Cameca, Camebax SX50. A tensão de aceleração foi de 5 kV e a corrente de 60 nA.

## 2.3. Difração de Raios X

A difração de raios X (XRD - do inglês “*X-Ray Diffraction*”) permite a identificação da estrutura dos materiais por comparação entre as distâncias interplanares medidas nos difractogramas e as constantes nas fichas ICCD (*International Center for Diffraction Data*) [40].

No ensaio de XRD foi usado um equipamento Philips x’Pert, equipado com anticátodo de Cobalto, com comprimento de onda  $K\alpha_1=0,178896$  nm. As caracterizações foram efetuadas em modo convencional, com tensão de aceleração de 40 kV, intensidade de corrente de 35 mA, gama de varrimento entre  $20^\circ - 120^\circ$ , com  $0,025^\circ$  por passo e o tempo de aquisição foi de 0,5 segundos por passo.

## 2.4. Microscopia Eletrónica de Transmissão

A microscopia eletrónica de transmissão permite a avaliação da microestrutura de materiais.

Os substratos de Si, sobre os quais os filmes finos foram depositados, foram polidos até uma espessura de 150  $\mu\text{m}$ . Em seguida foi cortado, por ultrassons, um disco de 3mm de diâmetro, com um model 170 da Fishione e posteriormente feito um orifício por desbaste com um Dimple Grinder, model 656 da Gatan, de acordo com o procedimento já

descrito por outros autores [41]. Por fim, o acabamento da amostra, foi efetuado por desbaste iónico, durante 45 minutos, num equipamento Gatan Dual Ion Mill 600. Para evitar artefactos, causados por aquecimento da amostra, o sistema foi arrefecido com azoto líquido.

As amostras foram observadas num microscópio FEI Tecnai G<sup>2</sup> com 200KV de tensão de aceleração.

## 2.5. Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM - do inglês “*Scanning Electron Microscopy*”) permite o estudo da morfologia de materiais ao varrer a superfície da amostra com um feixe de eletrões. O feixe é gerado pela diferença de potencial aplicada no cátodo e a imagem SEM produzida devido à interação entre o feixe e a amostra o que resulta na emissão de diferentes sinais posteriormente detetados. Os sinais mais utilizados são os eletrões secundários, que permitem a observação da morfologia, e eletrões retrodifundidos, que permitem a observação de elementos com diferentes densidades eletrónicas [42].

A morfologia das amostras foi observada utilizando um equipamento *Philips*, modelo *XL 30* com uma tensão de feixe de 10 kV e que por ter integrado um detetor de dispersão de energia (EDS do inglês “*Energy Dispersive Spectroscopy*”), permite efetuar uma análise da composição química do material.

## 2.6. Microscopia de Força Atómica

A topografia de superfície da amostra pode ser analisada através de imagens em microscopia de força atómica (AFM - do inglês “*Atomic Force Microscopy*”), cujo funcionamento se baseia em forças de interação repulsiva e atrativa entre um braço em balanço (*cantilever*) e a superfície. O equipamento pode operar em diferentes modos: modo de contacto, em que a ponta está em contacto com a amostra; em modo de não-contacto, em que a amostra não tem contacto com a amostra e também em modo de contacto intermitente (*tapping*), em que há contacto intermitente entre a ponta e a

superfície. Quando é utilizado o modo “*tapping*” é possível, além da imagem topográfica obter a imagem de fase que permite a observação de zonas que interagem de modo distinto com a ponta [43,44]. A partir da imagem topográfica é possível caracterizar a superfície em parâmetros de rugosidade, nomeadamente a rugosidade média,  $S_a$  (determinada a partir da média aritmética do desvio da altura da superfície em relação ao valor médio) e o valor quadrático médio da altura da superfície em relação ao valor médio,  $S_{ms}$  (raiz quadrada do desvio ao valor médio) [45].

As imagens AFM foram adquiridas por um equipamento de marca Veeco, modelo diInnova. A ponta utilizada foi de  $Si_3N_4$  com frequência de ressonância,  $f_0$ , de 291-326 kHz e constante de força,  $k$ , 20-80  $Nm^{-1}$ . Foram realizados varrimentos de  $50 \times 50 \mu m^2$ ,  $5 \times 5 \mu m^2$  e  $1 \times 1 \mu m^2$  com resolução de 512 linhas e frequência variável 0,6-0,8 Hz em modo de contacto intermitente. Os dados foram analisados com recurso ao programa Gwiddion. Esta técnica foi usada também para medir a espessura do filme.

## 2.7. Potencial Zeta

O potencial zeta é uma técnica que permite avaliar a carga superficial de um material quando este é colocado em contacto com um meio líquido, e a acumulação de cargas elétricas nessa interface leva à formação de uma dupla camada elétrica. A diferença de potencial nesta interface é então denominada por potencial zeta, gerado quando um eletrólito é forçado, por pressão hidráulica, a fluir pela superfície da amostra sólida numa corrente de fluxo contínua. Este valor pode ser calculado pela medição do potencial de fluxo ou da corrente de fluxo [46].

O equipamento usado para esta medição foi o SuRPass, da Anton Paar, que possui três tipos de células para efetuar as medições, a célula cilíndrica, a célula fechada e a célula com abertura ajustada. A escolha da célula depende das dimensões da amostra. Neste trabalho foi utilizada a célula com abertura ajustada que determina a corrente de fluxo em função da pressão. Por este motivo o potencial zeta foi calculado pela equação Helmholtz-Smoluchowski (H-S),

$$\zeta = \frac{dU}{dp} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \frac{L}{A}$$

onde  $\zeta$  é o potencial zeta,  $\frac{dU}{dp}$  corresponde ao declive da corrente de fluxo versus pressão,  $\eta$  viscosidade do eletrólito,  $\varepsilon_0$  permissividade em vácuo,  $\varepsilon$  constante dielétrica do eletrólito,  $L$  comprimento do canal e  $A$  é a secção transversal do canal.

Para cada um dos revestimentos o potencial zeta foi calculado sempre a pH=7,4 mas com vários eletrólitos: cloreto de potássio (KCl) 1mM; cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 1mM; solução salina de tampão fosfato (PBSS do inglês “*Phosphate Buffered Saline Solution*”) a 1mM e a 10mM e também água milli Q.

## 2.8. Ângulo de Contacto

O ângulo de contacto é avaliado como o ângulo formado na interface sólido/líquido/vapor quando uma gota de líquido se encontra sobre uma superfície sólida. A avaliação da molhabilidade de uma superfície pode ser efetuada de vários modos sendo o mais usual, e o utilizado neste trabalho, o da gota séssil. Segundo *Vogler*, pelos limites de *Berg*, se ângulo de contacto for superior a 65° o líquido não molha o sólido, sendo possível afirmar que se está perante uma superfície hidrófoba, quando a medição é realizada com água, e se o ângulo for inferior a 65° há molhamento do sólido por parte do líquido e assim a superfície é hidrófila. Há vários fatores que afetam a molhabilidade superficial, sendo a rugosidade e heterogeneidade química da superfície, as reações entre sólido e líquido, e a temperatura alguns dos mais importantes [47].

Neste trabalho foi efetuada a medição do ângulo de contacto estático entre as superfícies em estudo e dois líquidos distintos: água ( $\gamma_L=72,8 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) e formamida ( $\gamma_L=58,2 \text{ mJ.m}^{-2}$ ). Para tal foi utilizado um equipamento da Data Physics, modelo OCA-20 que possui uma seringa micrométrica que permite a deposição de gotas de 10  $\mu\text{L}$ . Em cada superfície e para cada líquido foram efetuadas 6 medições, sendo o resultado apresentado correspondente ao valor médio. Os valores dos ângulos de contacto permitiram ainda o cálculo da tensão superficial,  $\gamma_s$ , e a tensão de adesão da água,  $\tau^0$  para cada superfície em estudo.

## 2.9. Testes *in vitro*

A bioatividade, nomeadamente a capacidade dos filmes finos efetuarem troca iónica com a solução e permitirem a deposição, na sua superfície, de precipitados de Ca e P, foi testada através da imersão das superfícies em estudo numa solução balanceada de Hanks (tabela 2.2), durante um mês, sendo o conjunto colocado num agitador térmico a 37°C e a 100 rpm. A capacidade de formação deste precipitado dá indicações sobre a capacidade osteointegradora dos revestimentos em estudo. Ao longo deste período foi também calculada a libertação de flúor para a solução, através de um eléctrodo de flúor de marca HACH, modelo sension2.

**Tabela 2.2** - Composição da Solução Balanceada de Hanks.

Reagente	(g/L)
Cloreto de cálcio	$18,9 \times 10^{-2}$
Sulfato de magnésio	$20,4 \times 10^{-2}$
Cloreto de potássio	0,4
Fosfato de potássio monobásico	$0,6 \times 10^{-1}$
Bicarbonato de sódio	$3,5 \times 10^{-1}$
Cloreto de sódio	8,0
Fosfato de sódio dibásico	$4,8 \times 10^{-2}$
pH	7,4

## 2.10. Testes antibacterianos

Para testar a atividade antimicrobiana dos diferentes filmes finos foram efetuados testes com três estirpes de bactérias distintas: *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa, organismo modelo que tem sido extensivamente estudado; *Staphylococcus epidermidis*, bactéria Gram-positiva, presente na pele e responsável por infeções hospitalares, e *Bacillus cereus*, uma bactéria Gram-positiva, produtora de esporos, muito resistente e responsável por intoxicação alimentar.

Os testes foram efetuados em meio sólido e em meio líquido, tendo este último por finalidade averiguar da capacidade de formação de um biofilme sobre as superfícies em estudo.

Nos testes em meio sólido o meio de cultura Nutrient Agar (NA) (500 mL) foi preparado, autoclavado (121°C, 15 min) e espalhado em caixas de Petri (90 mm). O meio foi deixado a solidificar à temperatura ambiente em câmara de fluxo laminar.

As bactérias, preservadas a -80° C, foram colocadas em meio NA e incubadas a 37°C durante 24h. Quando crescidas foram utilizadas para preparar uma suspensão, em 2 mL água estéril, com a turbidez igual ao n°5 de MacFarland. Em cada caixa de Petri foram inoculados 100 µL da suspensão e espalhada com espalhador para distribuir homogeneamente as bactérias. Sobre o meio de cultivo inoculado foram colocadas as superfícies em estudo, em duplicado. As caixas foram incubadas a 37 °C durante 24h, findas as quais foram observadas e fotografadas. A análise de resultados consistiu na avaliação dos halos de inibição do crescimento sendo considerados apenas os halos cujo diâmetro supera em 1mm a dimensão da amostra.

Nos testes em meio líquido o meio de cultura utilizado foi o Luria Bertani (LB) e o procedimento diferiu no anterior. Os filmes finos, em duplicado, foram colocados no fundo de caixas *multiwell* em contacto com 1mL de meio líquido LB e 40µL de cada tipo de suspensão bacteriana (preparadas como já descrito). As caixas foram colocadas num agitador térmico a 37°C e 100 rpm, onde permaneceram 24horas. Findo este tempo as superfícies foram observadas para averiguar da formação de biofilme.

A observação das bactérias por microscopia eletrónica de varrimento foi efetuada após fixação química com glutaraldeído 5% (v/v) e desidratação em etanol. Após imersão em glutaraldeído durante 10 minutos os tecidos foram imersos por igual período de tempo em soluções de etanol:água com concentrações sequenciais de 25, 50, 75 e 100% (v/v). Antes da observação todas as superfícies foram revestidas, por pulverização catódica, com 10 nm de ouro para as tornar eletricamente condutoras.

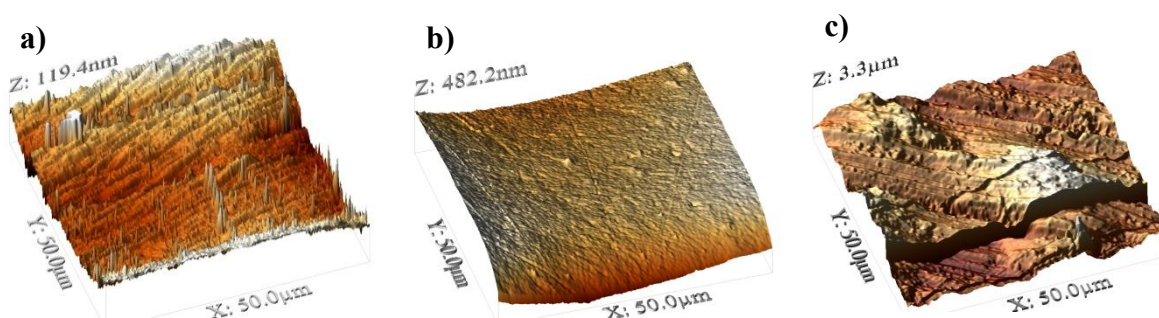
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos objetivos deste trabalho é o de avaliar a influência da rugosidade do substrato no desempenho dos revestimentos, sobretudo no que concerne aos testes *in vitro* com a solução balanceada de Hanks. Por este motivo, antes de se apresentar e discutir os resultados referentes aos revestimentos, este capítulo é iniciado pela caracterização da rugosidade e da topografia superficial dos substratos de aço 316L polido, Ti polido e Ti rugoso. Este estudo foi efetuado por AFM e os valores das rugosidades superficiais  $S_a$  (rugosidade média) e  $S_{ms}$  (rugosidade quadrática média) estão sumariados na tabela 3.1.

**Tabela 3.1** - Valores da rugosidade superficial dos substratos utilizados.

Substrato	Rugosidade (nm)	
	$S_a$	$S_{ms}$
Aço	38	46
Ti	39	54
Ti <sub>rugoso</sub>	439	555

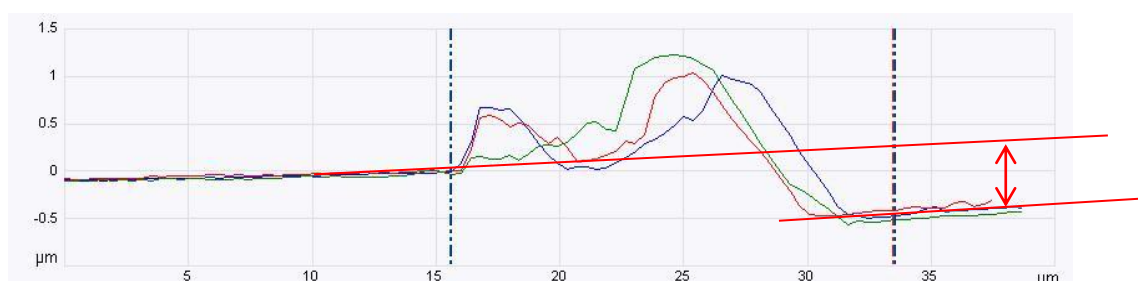
Os resultados evidenciam que a rugosidade do aço e do Ti polidos são muito semelhantes e, tal como esperado, a rugosidade do substrato designado por Ti rugoso é superior a estas por um fator de 11x. Esta diferença é bastante visível nas imagens 3D do varrimento de uma área de  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  de cada um dos substratos (figura 3.1). Deste modo será possível comparar o efeito da rugosidade induzida pelo substrato no desempenho dos revestimentos.



**Figura 3.1** - Imagens de AFM dos substratos,  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  a) aço, b) Ti polido, c) Ti rugoso.

### 3.1. Composição Química e Espessura dos Revestimentos

A espessura dos filmes finos foi avaliada por AFM, no soalco deixado depois de retirada a gota de nitrato de boro (figura 3.2) e os resultados apresentados na tabela 3.2. O filme com maior espessura é o HA/PTFE/Ag o que não é surpreendente, uma vez que neste revestimento há a contribuição de três materiais distintos para o crescimento do filme. No entanto, qualquer um dos filmes apresenta espessura interior a 0,5  $\mu\text{m}$  devido, essencialmente, ao baixo rendimento de pulverização da HA.



**Figura 3.2** - Medição da espessura de um filme fino por AFM: revestimento HA/Ag.

A análise por microsonda mostrou que o revestimento de HA é composto, tal como esperado, por oxigénio, fósforo e cálcio, com uma razão Ca/P de 1,91. Este valor é ligeiramente superior ao do valor teórico da HA maciça (1,67) mas, segundo a literatura, este é uma característica dos filmes finos de HA depositados por pulverização catódica [48].

**Tabela 3.2** - Composição química e espessura dos revestimentos.

Revestimentos	Composição química (%at.)						Razão Ca/P	Espessura (nm)
	C	O	F	P	Ca	Ag		
HA	-	60,9	-	13,3	25,5	-	1,91	137-307
HA/PTFE	9,9	7,1	57,7	0,9	24,4	-	25,90	206-243
HA/Ag	-	43,5	-	6,4	42,1	7,9	6,55	137-208
HA/PTFE/Ag	8,2	7,0	57,2	0,3	21,8	5,6	77,80	417-471



O filme de HA/PTFE apresenta o flúor como elemento maioritário e que, devido ao facto de ser o dobro do teor de Ca, permitir supor que este revestimento terá como um dos seus constituintes o fluoreto de cálcio,  $\text{CaF}_2$ . Já o caso do fósforo é o oposto pois a sua concentração é praticamente residual. Estes dois factos podem ser explicados pela entalpia de formação padrão do sal ( $\Delta H_f^0 \text{CaF}_2 = -1228 \text{ kJ/mol}$ ) [49] que, devido ao seu valor, faz com que a formação do composto seja, termodinamicamente, muito favorável. Com efeito, na bibliografia [50] é referido que a formação de  $\text{CaF}_2$  é tão espontânea que, ao depositar fosfato de cálcio sobre PTFE, o valor mais baixo da relação Ca/P é de 2 e só após 600 min de deposição, para tempos inferiores esta relação é muito superior. Os autores atribuem este efeito, não só à facilidade de formação do fluoreto de cálcio, como também à formação de um gás muito estável  $\text{PF}_3$ , que, ao ser evacuado pelo sistema de bombas, empobrece o revestimento em fósforo. No caso deste estudo, uma vez que o polímero é codepositado com o cerâmico, os dois fatores acima referidos são majorados durante a deposição.

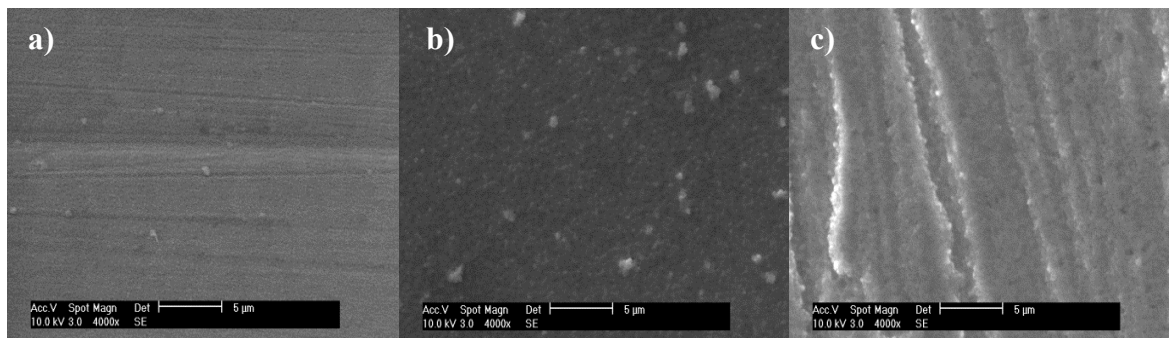
O revestimento HA/Ag contém 7 %at. de Ag, sendo, na sua maioria, constituído por Ca e O, sendo possível estar perante um revestimento de óxido de cálcio,  $\text{CaO}$ , ou hidróxido de cálcio  $\text{Ca(OH)}_2$  que também apresentam entalpias de formação negativas. À semelhança do filme codepositado com o polímero também este filme apresenta um valor de Ca/P muito superior ao valor teórico do cerâmico maciço.

No revestimento de HA/PTFE/Ag o efeito combinado de cada um dos materiais dopantes resulta, novamente, numa estequiometria que sugere a formação de  $\text{CaF}_2$ . A razão Ca/P é, neste revestimento, muito superior à dos outros filmes finos dado, precisamente ao efeito aditivo de Ag com PTFE.

### 3.2. Morfologia/topografia dos Revestimentos

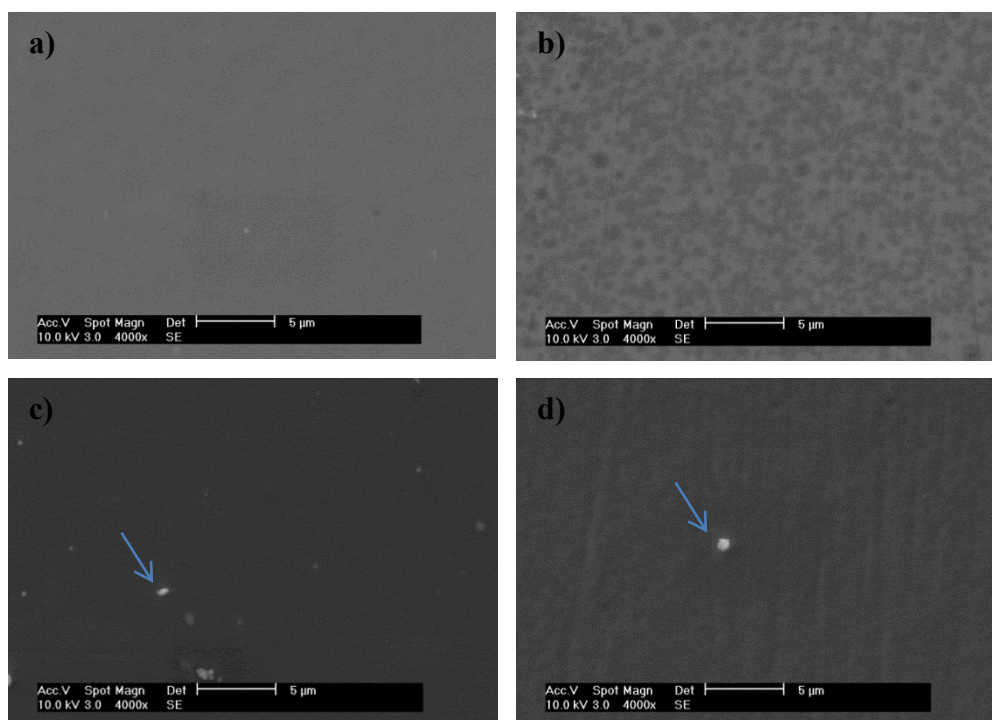
A morfologia dos revestimentos, depois de depositados nos diferentes substratos, foi avaliada por SEM (exemplo na figura 3.3). Nas micrografias é visível que a topografia do substrato tem pouca influência na morfologia dos filmes, e que as diferenças observadas dizem respeito à diferença do filme quando depositado numa superfície rugosa e numa não rugosa.

Em 2010 *Puckett et al* mostraram que existe uma melhor adesão de fibroblastos e uma diminuição na adesão de bactérias numa superfície de Ti nanorugoso quando em comparação com superfície microrugosa [51]. Assim, a falta de rugosidade micrométrica dos revestimentos não é um fator impeditivo na continuação deste estudo.



**Figura 3.3** - Micrografias SEM a) HA/PTFE/Ag em aço, b) HA/PTFE/Ag em Ti polido e c) HA/PTFE/Ag em Ti rugoso.

A figura 3.4 mostra a morfologia de superfície dos revestimentos depositados sobre aço. Nas ampliações usadas apenas é possível observar que são revestimentos densos e revestem completamente o respectivo substrato.



**Figura 3.4** - Micrografias SEM dos revestimentos: a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag, d) HA/PTFE/Ag.

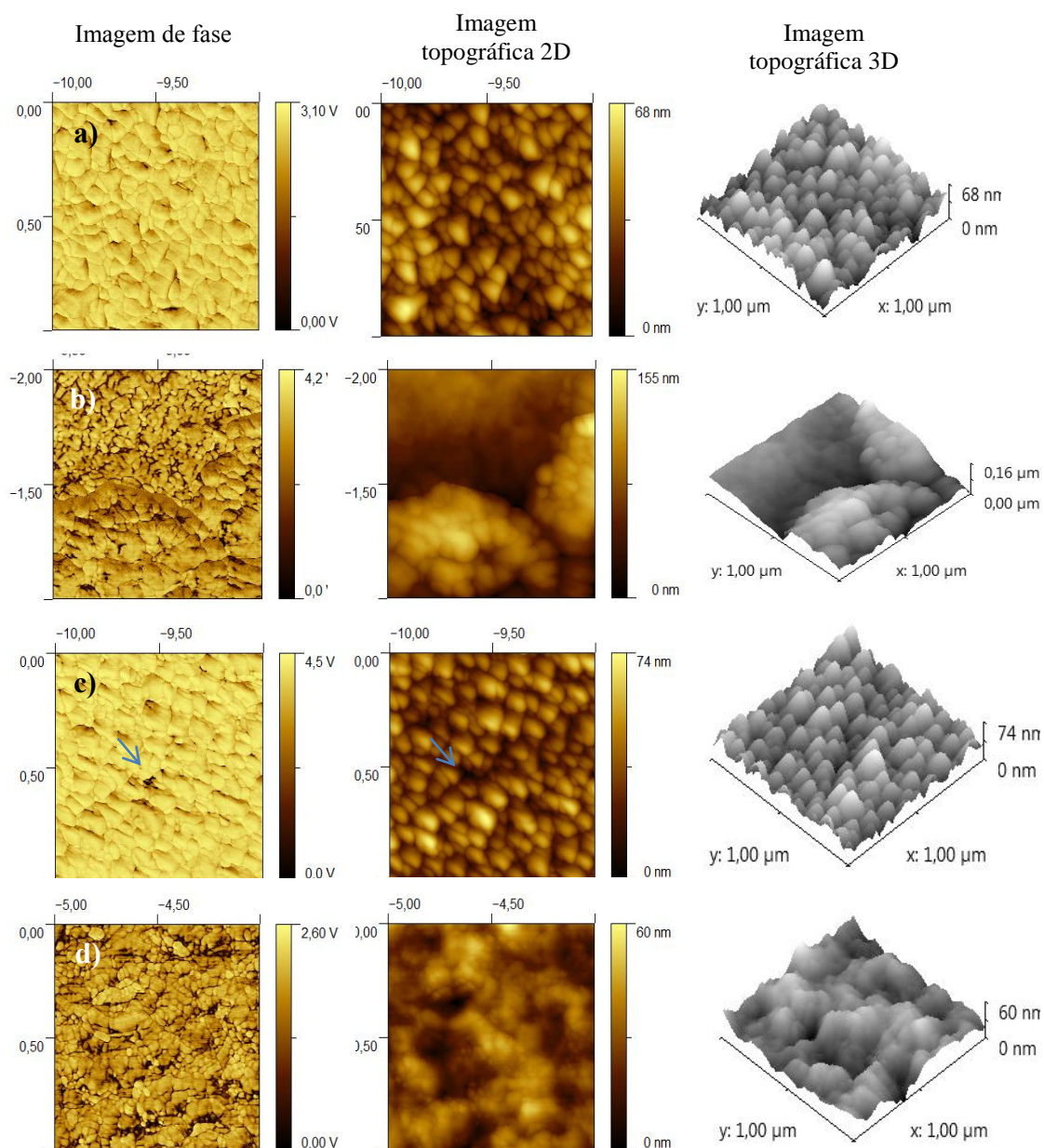
Dado que por SEM não foi possível observar, com o pormenor desejado, a morfologia superficial dos filmes, esta foi analisada por AFM. As imagens de fase, topográfica 2D e topográfica 3D estão na figura 3.5.

A análise das imagens torna perceptível que os filmes finos sem flúor (HA e HA/Ag) apresentam uma morfologia muito semelhante, não só na distribuição homogénea pela superfície como na variação de altura máxima pico/vale que ronda os 70 nm. A imagem de fase do filme fino de HA não evidencia zonas diferentes o que nos informa que toda a superfície interage do mesmo modo com a ponta de AFM. Já no filme HA/Ag há uma zona (assinalada por uma seta) que poderia indicar a presença de uma zona distinta da do restante revestimento. No entanto, após comparação com a imagem topográfica é perceptível que esta “perturbação” corresponde apenas a uma zona topograficamente distinta.

O revestimento de HA/PTFE é o único com uma variação de pico/vale de 160 nm, que é essencialmente devida à formação de aglomerados de maior dimensão que contêm partículas de dimensões semelhantes às observadas nos revestimentos de HA e HA/Ag. A imagem de fase evidencia que a superfície não é uniforme no que concerne a distribuição de zonas que interagem de modo distinto com a ponta. Esta observação, tendo em consideração o sugerido pela composição química, parece indicar que a distribuição de  $\text{CaF}_2$  não é uniforme.

O filme fino HA/PTFE/Ag apresenta uma topografia da superfície que pode ser considerada híbrida das duas anteriores. Com efeito, a altura pico/vale é da ordem dos 60 nm, mas a imagem topográfica revela que as partículas não têm o seu contorno tão bem definido como nos filmes com variação pico/vale semelhante. Acresce o facto que há também uma aparente formação de aglomerados, mas também estes não se encontram tão distintos como os da superfície do filme dopado com o polímero. Neste filme a imagem de fase evidencia a presença de zonas distintas, não influenciadas pela topografia, e que permitem também especular quanto a uma distribuição não homogénea da fase  $\text{CaF}_2$ .

Os parâmetros da rugosidade superficial,  $S_a$  e  $S_{ms}$ , foram calculados a partir das imagens adquiridas por AFM, numa área de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , e apresentados na tabela 3.3. Estes resultados confirmam a avaliação das imagens topográficas, dado que o filme HA/PTFE é o que apresenta maiores valores de rugosidade. No global, todas as superfícies apresentam rugosidade nanométrica.



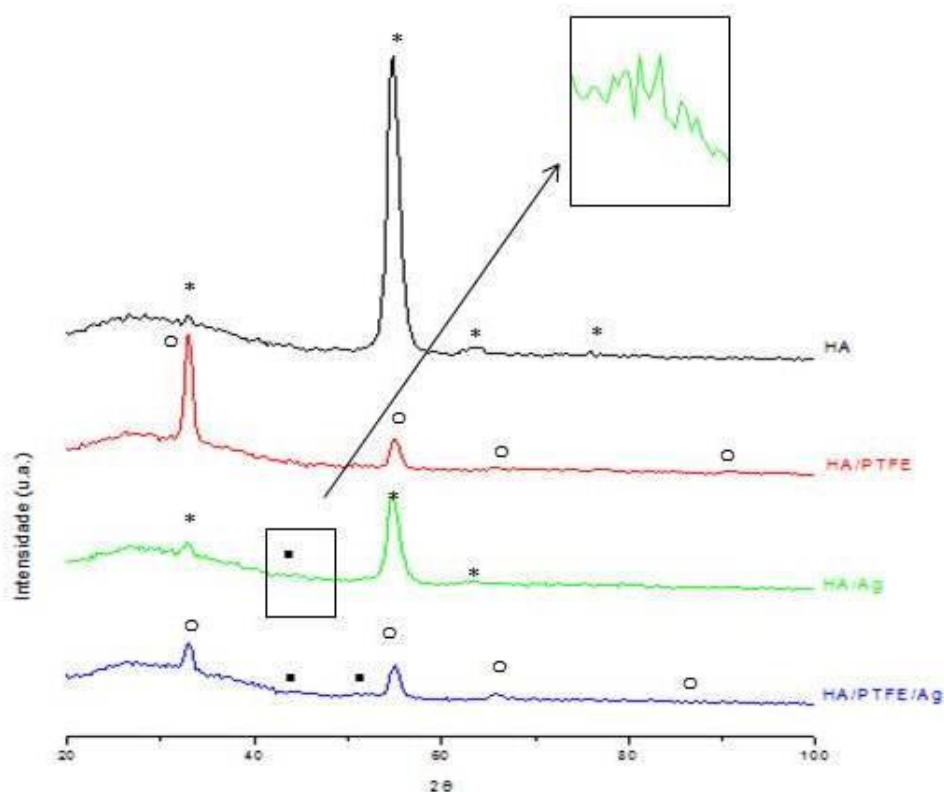
**Figura 3.5** - Imagens de AFM,  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , dos quatro revestimentos: a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag.

**Tabela 3.3** – Parâmetros da rugosidade superficial calculados por análise de AFM.

Revestimentos	Sa (nm)	Sms (nm)
HA	11,1	13,9
HA/PTFE	26,6	34,6
HA/Ag	10,2	12,8
HA/PTFE/Ag	10,2	13,2

### 3.3. Estrutura Cristalina

A estrutura cristalina dos filmes finos foi, em primeiro lugar, avaliada por difração de raios X (figura 3.6). Os picos de difração foram indexados com recurso às fichas ICDD<sup>1</sup> e a identificação resultante está sumariada na tabela 3.4.



**Figura 3.6** - Difratomogramas dos revestimentos: \* Ca(OH)<sub>2</sub>, • Ag e o CaF<sub>2</sub>.

No revestimento de HA apenas foram identificados os picos correspondentes aos planos de difração de Ca(OH)<sub>2</sub>. Esta indexação, conjuntamente com a composição química e com resultados preliminares de membros do CEMUC para revestimentos de HA [52] sugerem que o revestimento é constituído por 2 fases: hidroxiapatite sem ordem estrutural, uma vez que não é identificável nos difratogramas, e a fase de Ca(OH)<sub>2</sub>. A difração de raios X, em relação à composição química, permitiu esclarecer que o revestimento contém Ca(OH)<sub>2</sub> e não CaO dado que a microsonda não deteta nem

<sup>1</sup> Fichas ICDD em anexo, página A.2.

quantifica hidrogénio. Com efeito, do ponto de vista termodinâmico a formação do hidróxido é favorecida em relação ao óxido ( $\Delta_f H^0 \text{Ca(OH)}_2 = -986 \text{ kJ/mol}$ ;  $\Delta_f H^0 \text{CaO} = -635 \text{ kJ/mol}$ ).

**Tabela 3.4** - Identificação da estrutura dos filmes finos: comparação dos picos de difração com as fichas ICDD.

Fichas ICDD	$2\theta$ (°)	hkl	Revestimento			
			HA	HA/PTFE	HA/Ag	HA/PTFE/Ag
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b> <b>n° 81-2041</b>	33	100	X		X	
	55	102	X		X	
	64	111	X		X	
	76	013	X			
<b>Ag</b> <b>n° 87-0720</b>	44	111			X	X
	52	200				X
<b>CaF<sub>2</sub></b> <b>n° 87-0971</b>	33	111		X		X
	55	220		X		X
	65	311		X		X
	91	331		X		X

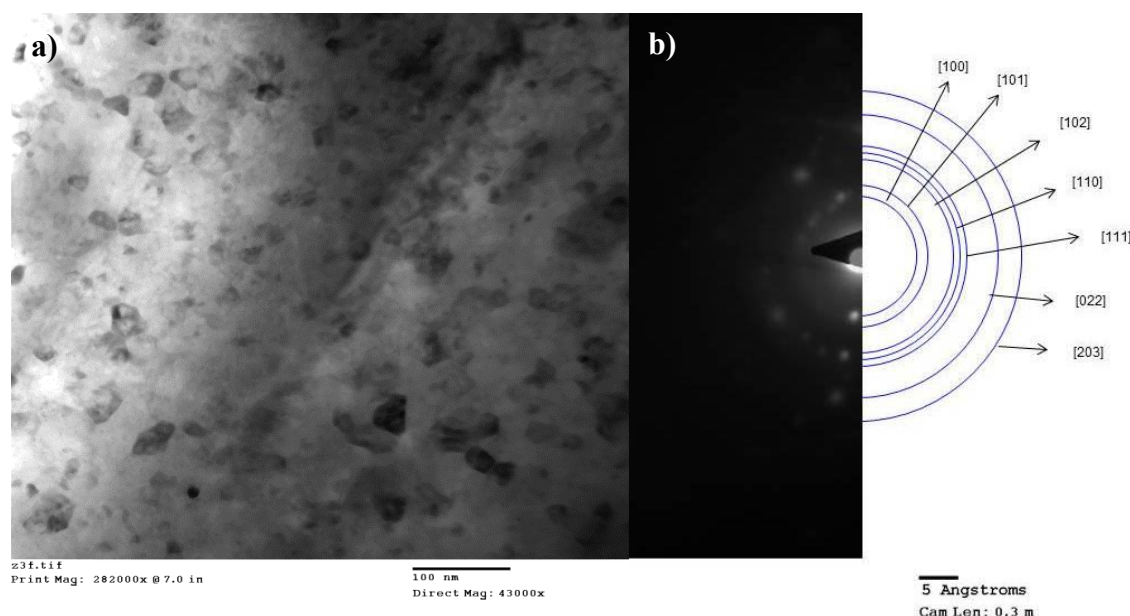
O filme fino de HA/PTFE apresenta picos de difração da fase de  $\text{CaF}_2$ , o que já seria expectável face à composição química. No entanto, deve ser considerado que os planos de difração do fluoreto de cálcio ocorrem para valores muito semelhantes aos do hidróxido de cálcio pelo que a coexistência destas duas fases não pode, para já, ser excluída.

No filme fino dopado com Ag, para além de picos correspondentes aos planos de difração de  $\text{Ca(OH)}_2$ , é perceptível uma pequena variação na intensidade sinal/ruído do difratograma (zona ampliada na figura 3.6) e que corresponde ao plano (111) da prata. Esta indexação é provável dado que o filme contém cerca de 7 %at. deste elemento metálico. No entanto, deve ser tomado em consideração que uma indexação baseada num único pico de difração não é o modo mais apropriado e que a percentagem de prata está muito

próxima do limite de detecção do equipamento<sup>2</sup>, o que faz com que a variação sinal/ruído seja muito pequena, o que dificulta ainda mais a indexação.

O revestimento HA/PTFE/Ag apresenta, de um modo geral, o somatório dos planos identificados para os revestimentos HA/PTFE e HA/Ag, com a diferença que pode ser identificado um segundo pico correspondente ao plano (200) da prata. Mais uma vez deve ser reforçado o ponto de a indexação de planos de  $\text{Ca(OH)}_2$  e  $\text{CaF}_2$  ser muito semelhante, pelo que não deve ser excluído a coexistência destas duas fases.

Devido às dúvidas suscitadas na caracterização por DRX foi efetuada a avaliação em TEM aos revestimentos HA, HA/PTFE e HA/Ag. Na imagem TEM correspondente ao filme fino de HA (figura 3.7) é possível distinguir a existência de duas fases. Pelo padrão de difração foi possível identificar a fase cristalina como sendo  $\text{Ca(OH)}_2$ . Conforme anteriormente referido a deposição de hidroxiapatite por pulverização catódica origina filmes amorfos, que podem ter alguma ordem estrutural após tratamento térmico [48,52,53].

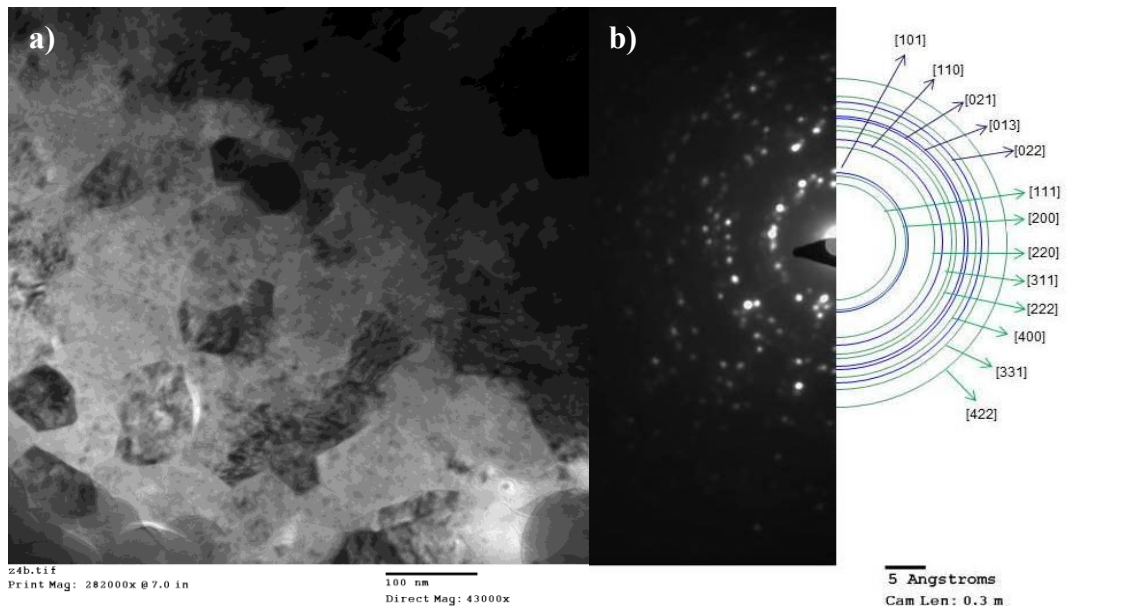


**Figura 3.7** - Imagens TEM de HA, a) imagem de campo claro; b) padrão de difração com os planos da fase  $\text{Ca(OH)}_2$  assinalados.

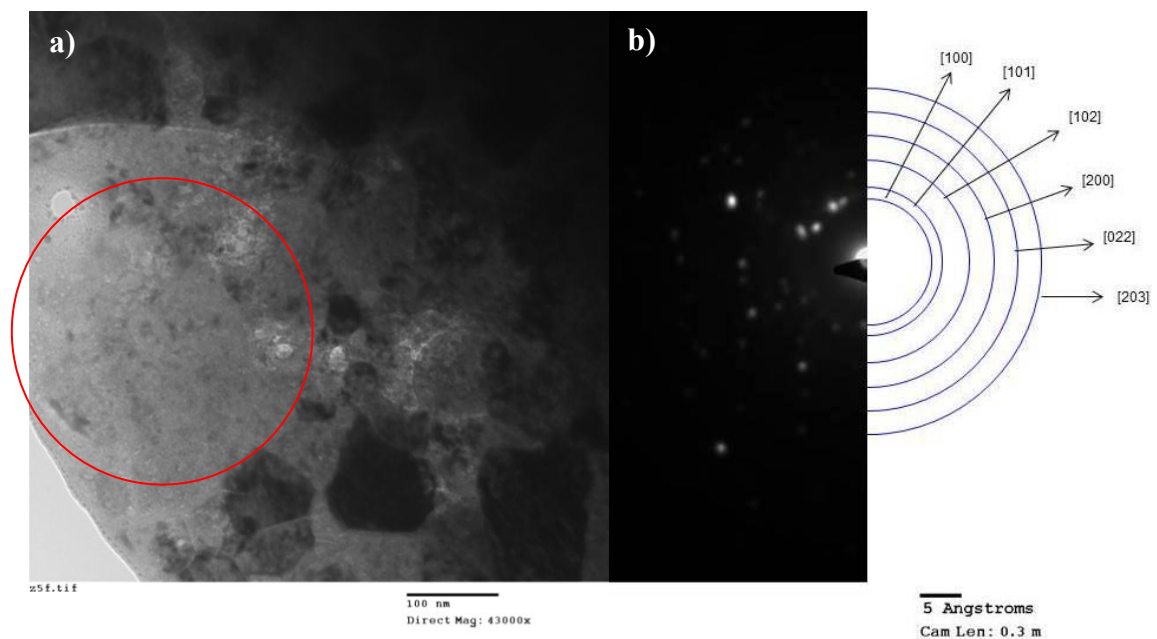
Também pela caracterização em TEM do revestimento HA/PTFE (figura 3.8) foi possível clarificar a estrutura, sendo que esta é composta não só por  $\text{CaF}_2$ , como parecia

<sup>2</sup> 7%at. de Ag  $\approx$  4%vol. de Ag nesta matriz. Limite de detecção do equipamento é 4-5%vol.

indicar o respetivo difratograma, como também por  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . A observação também evidenciou o facto de, ao contrário do revestimento de HA, o filme fino ser heterogéneo no que concerne a distribuição das fases que o constituem, uma vez que há zonas de dimensão considerável (à escala de visualização do TEM) cujo padrão de difração apenas corresponde ao hidróxido de cálcio (figura 3.9).



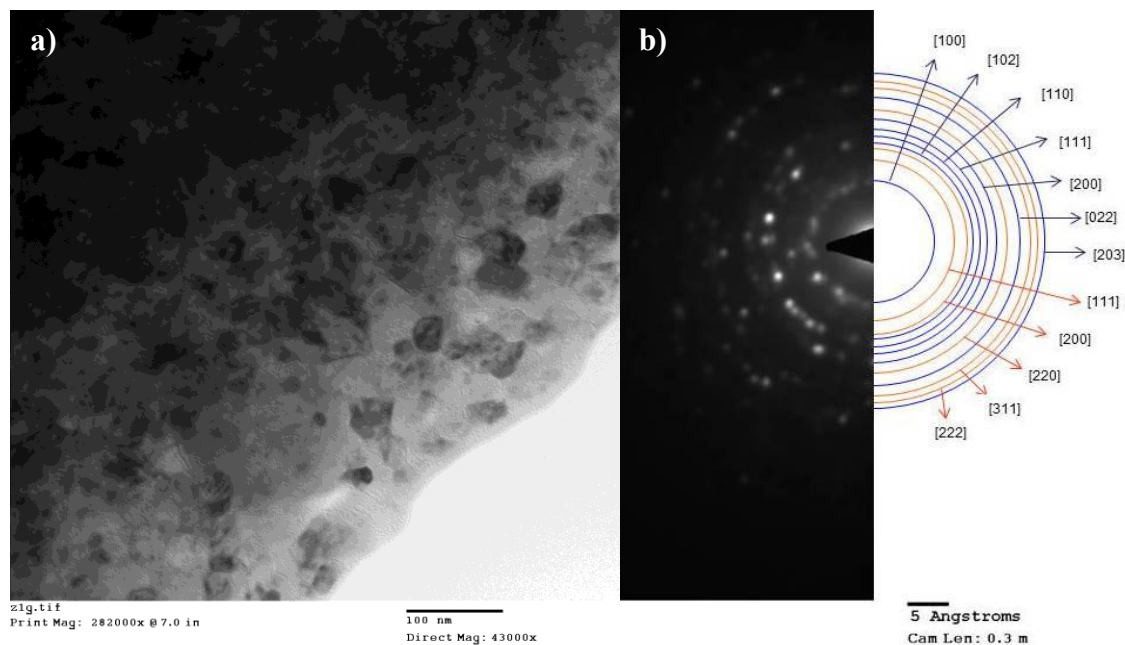
**Figura 3.8** - Imagens TEM de HA/PTFE, a) imagem de campo claro; b) padrão de difração com os planos da fase  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  assinalados a azul e os planos de da fase  $\text{CaF}_2$  assinalados a verde.



**Figura 3.9** - Imagens TEM de HA/PTFE, a) imagem de campo claro; b) padrão de difração com os planos de fase  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  assinalados.



No revestimento HA/Ag (figura 3.10) é possível identificar a presença de duas fases cristalinas:  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e Ag. Este resultado veio confirmar os resultados da difração de raios X, e terá que ser considerado que, à semelhança do filme HA, estas fases se encontram dispersas numa matriz amorfa de HA.



**Figura 3.10** - Imagens TEM de HA/Ag, a) imagem de campo claro; b) padrão de difração com os planos da fase  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  assinalados a azul e os planos de da fase Ag assinalados a laranja.

### 3.4. Carga de Superfície

A carga elétrica da superfície é considerada um dos principais fatores responsáveis pela evolução biológica do tecido à volta do implante, e por isso um fator importante a analisar nos filmes em questão. A carga superficial dos revestimentos foi calculada com vários eletrólitos e com diferentes concentrações, tendo sido efetuadas 8 medições/superfície/eletrólito e o valor médio e desvio padrão apresentados na tabela 3.5.

A primeira observação é a que respeita aos substratos não revestidos, sendo que ambos se encontram fora do limite considerado instável para aplicação como biomateriais (-30 a 30 mV). No entanto, o valor do Ti cp4 é mais negativo do que o do aço 316L o que, de acordo com a literatura, favorece a osteointegração [54].

**Tabela 3.5** - Valores médios de potencial zeta ( $\zeta$ ) e respectivos desvios padrões, d. p.

	HA		HA/PTFE		HA/Ag		HA/PTFE/Ag		Ti cp4		Aço	
	$\zeta$ (mV)	d. p.	$\zeta$ (mV)	d. p.	$\zeta$ (mV)	d. p.	$\zeta$ (mV)	d. p.	$\zeta$ (mV)	d. p.	$\zeta$ (mV)	d. p.
H <sub>2</sub> O millQ	-74,8	2,9	-69,6	2,8	-69,7	2,0	-68,6	2,1				
KCl (1mM)	-82,4	2,7	-80,7	1,1	-83,6	0,9	-87,6	2,7	-60,0	2,3	-35,8	2,2
CaCl <sub>2</sub> (1mM)	-36,3	0,9	-33,3	0,4	-37,0	0,2	-36,0	0,8				
PBSS (1mM)	-75,6	2,4	-74,5	0,8	-75,2	2,3	-78,3	1,5				
PBSS (10mM)	-45,8	0,9	-46,2	2,1	-74,1	61,1	-44,4	1,4				

No que diz respeito aos valores do potencial zeta dos filmes finos, determinados com o mesmo eletrólito que os substratos (KCl), é constatado que todos eles apresentam valores mais negativos o que é, conforme referido, favorável à osteointegração. O mesmo acontece quando o potencial zeta é medido com as restantes soluções: as variações entre revestimentos, à exceção do valor do revestimento de HA/Ag em PBSS 10 mM, não são significativas. No entanto, deve ser realçado que nesta superfície há reação com o eletrólito como pode ser observado pelo valor do desvio padrão.

Na literatura disponível é dito que quanto mais negativo o  $\zeta$  melhor a adsorção da matriz extracelular e melhor a ligação de fibroblastos pelo que todos os revestimentos podem ser utilizados pois melhoram a superfície do implante maciço, pelo menos neste requisito [13]. Quando se comparam os valores calculados para os diferentes eletrólitos o que dá melhores resultados é o KCl e o menos favorável para as determinações é o CaCl<sub>2</sub>. Esta variação é devido à relação de valências entre catiões e aniões, isto é, se existe uma maior influência de catiões que de aniões, como acontece no CaCl<sub>2</sub> que tem uma relação de 2:1, o potencial zeta tende a ser menos negativo do que quando se utiliza o KCl que tem uma relação de 1:1.

### 3.5. Hidrofilicidade/Hidrofobicidade

Fatores tais como a rugosidade da superfície, a sua heterogeneidade química, o tamanho e forma de grão podem afetar a avaliação do carácter hidrófilo de uma superfície e que podem limitar a aplicação específica de um biomaterial [55]. Segundo um estudo de *Vogler*, respeitando o limite *Berg*, o limiar entre hidrofobicidade e hidrofilicidade é o

ângulo de contacto com água de  $65^\circ$ , se  $\theta < 65^\circ$  a superfície é hidrófila e se  $\theta > 65^\circ$  a superfície é considerada hidrófoba.

Vogler afirma ainda que a tensão de adesão da água,  $\tau^0$ , é a medida mais importante da estrutura e atividade da água num biomaterial uma vez que não requer uma série de medições do ângulo de contacto sobre a mesma superfície e também não requer teorias complexas onde prevalecem suposições. A tensão de adesão da água é assim calculada pela seguinte equação:

$$\tau^0 = \gamma^0 \times \cos\theta$$

em que  $\gamma^0$  representa tensão superficial da água e  $\theta$  o ângulo de contacto entre a superfície e a água [47].

O valor médio dos ângulos de contacto, avaliado a partir de 6 medições, com água e formamida, bom como o valor de  $\tau^0$  estão sumariados na tabela 3.6. Os resultados evidenciam que todas as superfícies analisadas apresentam comportamento hidrófilo, pois todas apresentam um ângulo de contacto inferior a  $65^\circ$  e uma tensão de adesão da água superior a  $30 \text{ mJ.m}^{-2}$ .

**Tabela 3.6** - Ângulos de contacto das amostras para diferentes  $\gamma_L$  e tensão de adesão da água.

	Ângulo de contacto ( $^\circ$ )			
	HA	HA/PTFE	HA/Ag	HA/PTFE/Ag
<b>Água</b> ( $\gamma_L=72,8 \text{ mJ.m}^{-2}$ )	34,9	40,3	50,4	53,4
<b>Formamida</b> ( $\gamma_L=58,2 \text{ mJ.m}^{-2}$ )	15,0	41,3	57,6	29,4
<b><math>\tau^0</math> (<math>\text{mJ.m}^{-2}</math>)</b>	59,7	55,5	46,4	43,4

Quanto à molhabilidade da superfície, quanto menor o ângulo de contacto mais molhável a superfície é pelo líquido em questão. Em superfícies quimicamente homogêneas o normal é que quanto menor a tensão do líquido utilizado menor o ângulo de contacto, ou seja, os ângulos de contacto com a formamida deveriam ser inferiores aos determinados com água. No entanto, apenas os filmes finos de HA e HA/PTFE/Ag obedecem a este pressuposto o que, conjuntamente com a caracterização topográfica e microestrutural, leva a supor que será a distribuição heterogênea de fases a responsável

pelo comportamento anormal no que concerne a molhabilidade, uma vez que não há relação entre a variação da rugosidade e o fenómeno observado.

A tensão superficial dos revestimentos foi calculada com recurso à equação:

$$\gamma_s = \gamma_s^p + \gamma_s^d$$

onde  $\gamma_s^p$  é a componente polar da tensão superficial e  $\gamma_s^d$  a componente dispersiva da tensão superficial. Estes foram calculados a partir de um sistema de duas equações:

$$\begin{cases} \gamma_L(1 + \cos\theta) = 2(\sqrt{\gamma_s^p \times \gamma_L^p} + \sqrt{\gamma_s^d \times \gamma_L^d}) \\ \gamma_{L2}(1 + \cos\theta) = 2(\sqrt{\gamma_s^p \times \gamma_{L2}^p} + \sqrt{\gamma_s^d \times \gamma_{L2}^d}) \end{cases}$$

onde  $\gamma_L$  corresponde à tensão superficial da água,  $\gamma_{L2}$  à tensão superficial da formamida,  $\theta$  é o ângulo de contacto com cada líquido,  $\gamma_L^p$  e  $\gamma_L^d$  as componentes polar e dispersiva tensão da água, respetivamente, e  $\gamma_{L2}^p$  e  $\gamma_{L2}^d$  as componentes polar e dispersiva da tensão da formamida [56].

**Tabela 3.7** - Tensão de superfície e componentes polar e dispersiva das superfícies em estudo.

	$\gamma_s^p$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s^d$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_s$ (mJ/m <sup>2</sup> )
HA	8,7	54,9	63,6
HA/PTFE	8,3	44,3	52,6
HA/Ag	7,5	32,3	39,8
HA/PTFE/Ag	7,2	41,7	48,9

Todas as superfícies apresentam valores de tensão superficial que os incluem na categoria de superfícies hidrófilas, confirmando os valores de ângulo de contacto com água (tabela 3.7). Mais importante do que o valor total da tensão superficial é a relação entre as suas componentes polar e dispersiva. Com efeito, a componente polar dá ideia da quantidade de grupos polares, com características hidrófilas, que se encontram presentes. Das superfícies em estudo a que apresenta maior componente polar é a de HA, ao adicionar PTFE, o valor da componente mantém o seu valor, devido ao facto de o

polímero não ser incorporado no revestimento com a sua estrutura molecular original (hidrófoba) mas sim dando origem, de acordo com as caracterizações anteriores, ao fluoreto de cálcio. Se se considerar a composição química elementar deste revestimento é visível a incorporação de alguma percentagem de C que poderá, eventualmente, ser constituinte de algumas cadeias fluorocarbonadas presentes no revestimento e que podem contribuir para este ligeiro decréscimo.

A ligeira diminuição da componente polar no filme fino de HA/Ag é devido à presença do elemento metálico que tem características marcadamente hidrófobas. No entanto, dado que o seu teor no filme é de apenas 8 %at. a sua contribuição para a diminuição de  $\gamma_s^p$  não pode ser muito acentuada. O revestimento de HA/PTFE/Ag é o que apresenta uma maior descida no componente polar, pois aqui tanto a prata como o PTFE contribuem para a hidrofobicidade.

Esta propriedade superficial influencia fortemente a resposta biológica de um biomaterial, uma vez que superfícies hidrófilas não favorecem a adsorção de proteínas pois é um processo energeticamente desfavorável. A hidrofobicidade permite que as superfícies se tornem mais eficientes na ligação de células, o que neste estudo é importante uma vez que se pretende um revestimento para uma melhor osteointegração de implante/células ósseas. É também pretendido que o revestimento tenha uma boa componente antibacteriana, e a energia livre da superfície tem uma influência significativa no que toca à adesão bacteriana. No entanto, *Vogler* afirma que não é possível controlar a ligação bacteriana só pelo manuseamento da energia de superfície. Deste modo não há dados concretos que permitam afirmar que uma superfície hidrófila é prejudicial para uma boa atividade antibacteriana [9,47].

### 3.6. Testes *in vitro*

De forma a investigar a bioatividade dos revestimentos *in vitro* estes foram colocados durante 30 dias em contacto com solução balanceada de Hanks. A caracterização foi novamente efetuada por EPMA, SEM e AFM e foi também investigada a libertação de flúor para a solução ao longo dos 30 dias.

### 3.6.1. Composição Química

Após um mês em solução a composição química elementar dos revestimentos foi novamente avaliada apenas para os filmes dopados (tabela 3.8), uma vez que no filme fino de HA não seria possível distinguir entre o Ca e o P do revestimento com o que resulta da deposição por troca iónica com a solução.

**Tabela 3.8** - Comparação da composição química antes e depois de um mês em solução.

Composição Química (%at.)	Como depositado			Após 4 semanas em solução		
	HA/PTFE	HA/Ag	HA/PTFE/Ag	HA/PTFE	HA/Ag	HA/PTFE/Ag
<b>C</b>	9,9	--	8,2	9,1	--	12,0
<b>O</b>	7,1	43,5	7,0	16,8	53,1	50,7
<b>F</b>	57,7	--	57,2	52,1	--	20,0
<b>P</b>	0,9	6,4	0,3	4,8	7,1	4,6
<b>Ca</b>	24,4	42,1	21,8	17,2	34,8	12,4
<b>Ag</b>	--	7,9	5,6	--	5,0	0,2
<b>Ca/P</b>	25,9	6,6	77,8	3,6	4,9	2,7

Comum a todos os revestimentos é o incremento dos teores de O e P e a diminuição das concentrações de Ca e F, o que indica que, em todos os filmes finos dopados, aparentemente, houve a capacidade de efetuar a troca iónica com a solução de Hanks. De todos os revestimentos o filme que regista os maiores incrementos de O e P associados à maior diminuição de Ca e F é o revestimento de HA/PTFE/Ag. Concomitantemente, este é o revestimento que apresenta a relação Ca/P mais próxima da de HA maciça. Aparentemente, a presença de Ag potencia a libertação de  $F^-$ , com a simultânea dissolução de  $Ca^{2+}$  do revestimento e a precipitação de Ca, P e O da solução, indicando assim que o filme HA/PTFE/Ag é o que apresenta maior bioatividade, ou seja, face apenas à composição química, este é o revestimento que dará origem a maior osteointegração. Dado que esta superfície apresentava o maior ângulo de contacto com a água e o menor valor da componente polar da tensão superficial, a explicação poderá residir no facto de apresentar o valor mais negativo de carga superficial quando em contacto com eletrólitos “complexos” tais como PBSS, que é comparável à solução de Hanks. Este facto coloca em evidência a importância da carga da superfície nos biomateriais.

### 3.6.2. Liberação de Flúor

Através da figura 3.11, e com a ajuda da linha de tendência, pode ser afirmado que a quantidade de flúor na solução em contacto com os filmes que contêm F, tem um aumento rápido nos primeiros 5 dias e que a partir do 10º dia a quantidade de flúor na solução, mesmo estando sempre a aumentar, tende a estabilizar. A única diferença é a quantidade em solução, uma vez que o revestimento HA/PTFE parece libertar menor quantidade de F do que HA/PTFE/Ag, o que está de acordo com a composição química elementar dos filmes finos após 4 semanas de imersão. Na literatura é referido que revestimentos constituídos por F e HA permitem a libertação de F suficientemente baixa para ajudar na formação óssea e para a não acumulação de F no organismo [27].

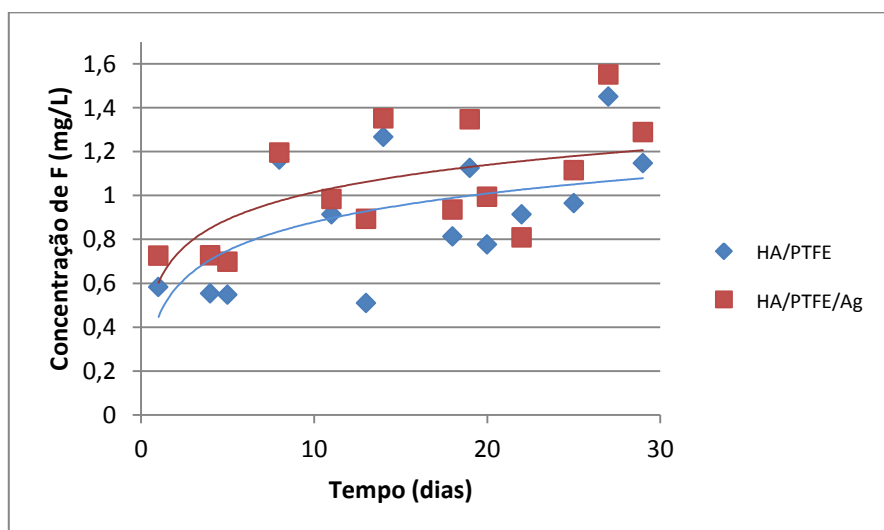
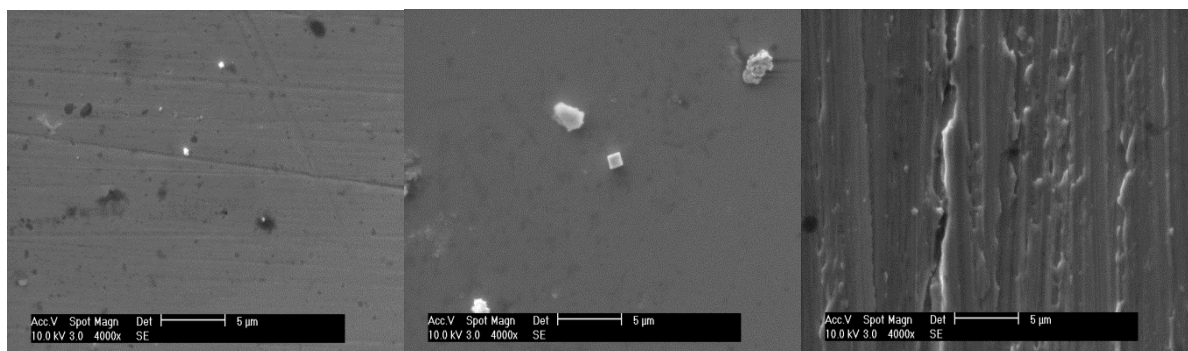


Figura 3.11 - Concentração de flúor na solução ao longo de 30 dias.

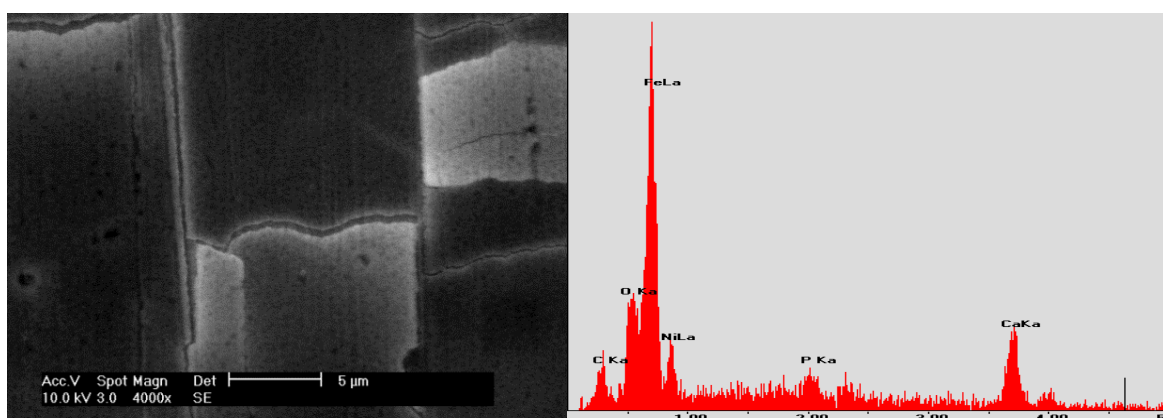
### 3.6.3. Morfologia da Superfície

A avaliação da morfologia superficial dos substratos não revestidos antes e após 4 semanas de imersão em solução balanceada de Hanks não evidenciou qualquer tipo de formação de precipitados (figura 3.12). Assim, aparentemente, nem a rugosidade do substrato, nem a sua composição química tiveram qualquer tipo de influência na capacidade osteointegradora dos materiais maciços ao fim de 30 dias.



**Figura 3.12** – Micrografias SEM dos substratos de a) aço, b) Ti polido e c) Ti rugoso, após quatro semanas de imersão em solução balanceada de Hanks.

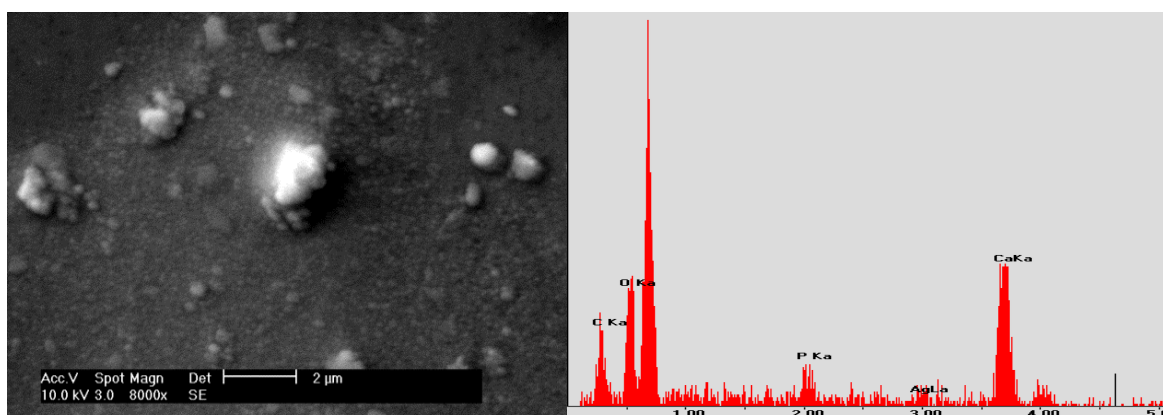
Ao comparar com a morfologia do filme fino de HA antes dos testes *in vitro*, e após 4 semanas em contacto com a solução de Hank, para além de alguma degradação do revestimento, não se observam grandes mudanças na superfície nem são visíveis aglomerados resultantes da troca iónica com a solução de Hanks (figura 3.13).



**Figura 3.13** - Micrografia SEM e espectro EDS do revestimento de HA após 4 semanas em solução balanceada de Hanks.

No revestimento HA/Ag, (figura 3.14), é possível distinguir a presença de aglomerados na superfície que não existiam na morfologia inicial e que, pela análise EDS feita no local assinalado na figura, mostraram ser compostos por Ca e P, o que confirma a existência de trocas iónicas entre meio e o revestimento.

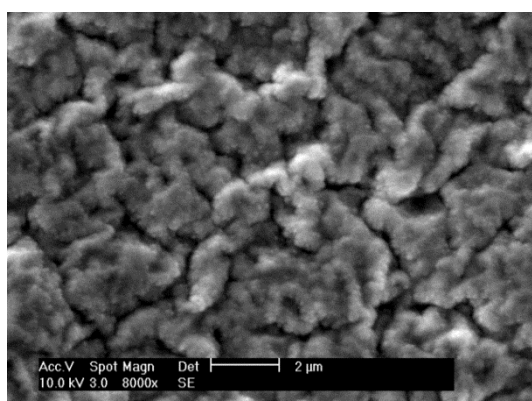




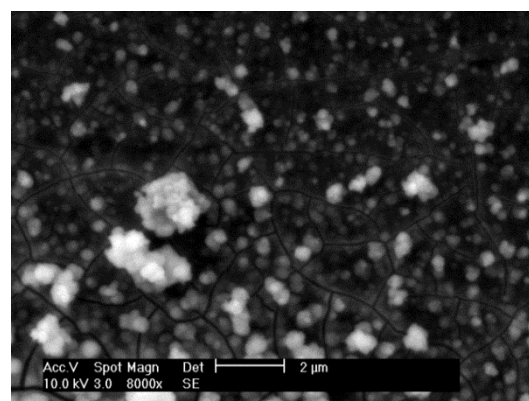
**Figura 3.14** - Micrografia SEM e espectro EDS do revestimento de HA/Ag após 4 semanas em solução balanceada de Hanks.

Após 30 dias em solução, os revestimentos com PTFE estão completamente revestidos por uma camada de precipitados, que pela análise EDS mostram, mais uma vez, corresponder a Ca e P. Na figura 3.15 é visível uma camada de precipitados sobre o revestimento HA/PTFE, mas é no revestimento HA/PTFE/Ag (figura 3.16), que há a formação de uma camada uniforme destes precipitados que, com base na análise EDS (figura 3.17), reveste completamente a superfície do filme fino.

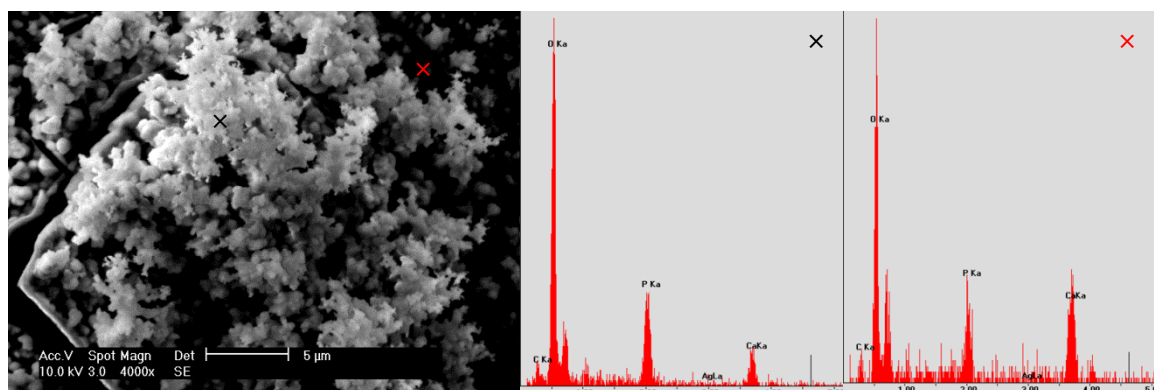
Ambas as camadas são constituídas por precipitados de Ca e P, existindo também uma elevada contribuição de oxigénio. Esta superfície mostra assim um grau de bioatividade superior em relação às restantes amostras.



**Figura 3.15** - Micrografia SEM de HA/PTFE após 4 semanas em solução de Hanks.



**Figura 3.16** - Micrografia SEM de HA/PTFE/Ag após 4 semanas em solução de Hanks.



**Figura 3.17** - Micrografia SEM e análises EDS de HA/PTFE/Ag, x: EDS da parte escura, x: EDS da clara.

*Otsu et al*, em 2007, mostraram que sobre um substrato sem revestimento bioativo não se forma a camada de Ca e P, o que resultaria numa pobre osteointegração, valorizando assim revestimentos bioativos [57]. Segundo *Rautray et al* a causa de íões fósforo adsorverem numa superfície com  $Ca^{2+}$  é a atração de cargas elétricas, que leva à formação de fosfato de cálcio, o que vem confirmar a influência da carga superficial no desempenho deste tipo de biomateriais [1].

### 3.6.4. Topografia da Superfície

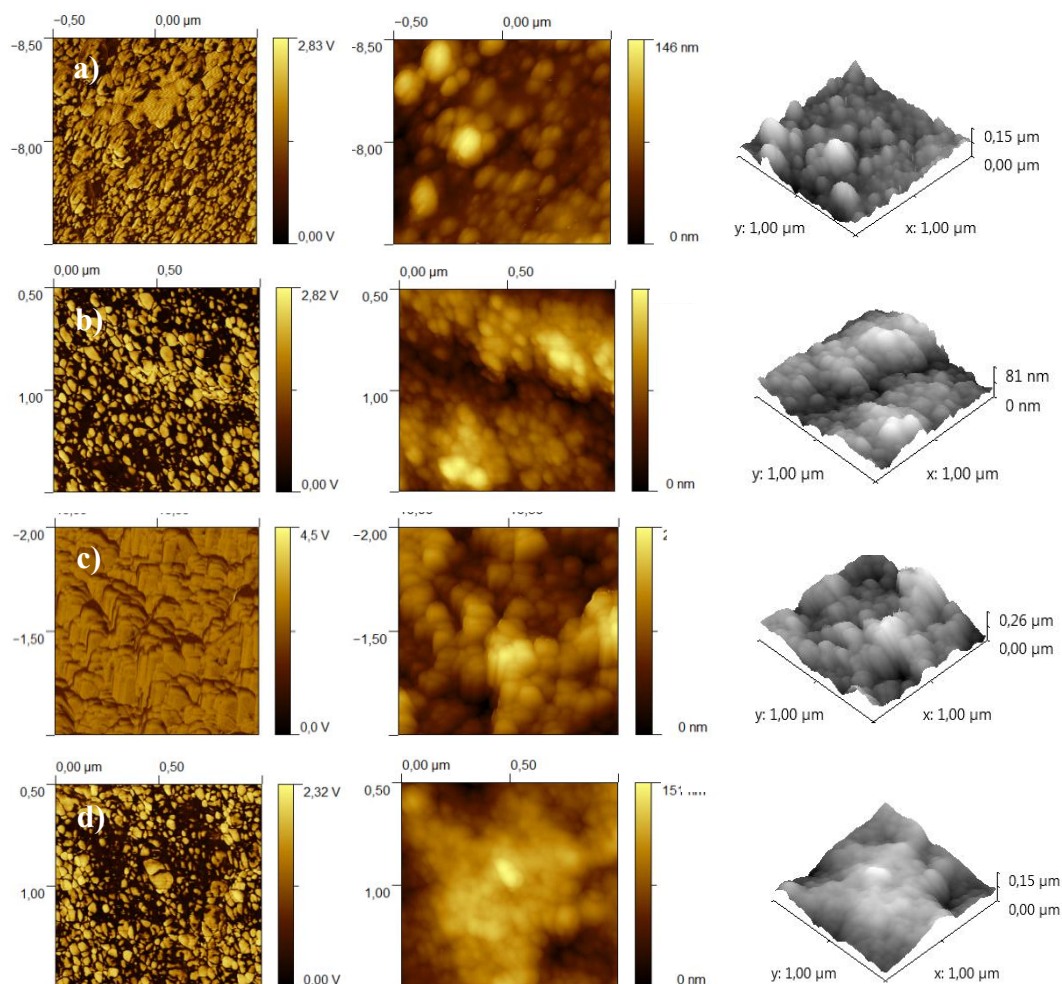
Os parâmetros de rugosidade Sa e Sms de todos os revestimentos em estudo evidenciaram um ligeiro aumento após os testes *in vitro*, resultado explicado pela formação de precipitados na superfície e por isso já esperado (tabela 3.9). Mais uma vez se confirma que o maior incremento é registado no filme HA/PTFE/Ag que é o revestimento que, pelas caracterizações anteriores, apresentou maior capacidade de troca iónica com a solução de Hanks.

**Tabela 3.9** – Valores dos parâmetros de rugosidade, calculadas por AFM, da superfície dos filmes finos após um mês de imersão na solução balanceada de Hanks.

	Como depositados		Após 4 semanas de imersão	
	Sa (nm)	Sms (nm)	Sa (nm)	Sms (nm)
HA	11,1	13,9	16,0	21,2
HA/PTFE	26,6	34,6	36,0	44,1
HA/Ag	10,2	12,8	12,5	15,2
HA/PTFE/Ag	10,2	13,2	21,9	26,0

A figura 3.18 corresponde às imagens de AFM dos filmes finos após 30 dias em solução balanceada de Hanks. Em todas as imagens é visível a alteração da topografia devido à deposição, sobre as superfícies, de precipitados, consequência da troca iônica com a solução.

Devido destaque deve ser dado às imagens de fase dos revestimentos de HA/PTFE e HA/PTFE/Ag que evidenciam, sem serem artefactos topográficos, a existência de fases distintas na área analisada. Estes resultados vêm confirmar a deposição de grandes quantidades de Ca e P já observada pelas imagens de SEM.



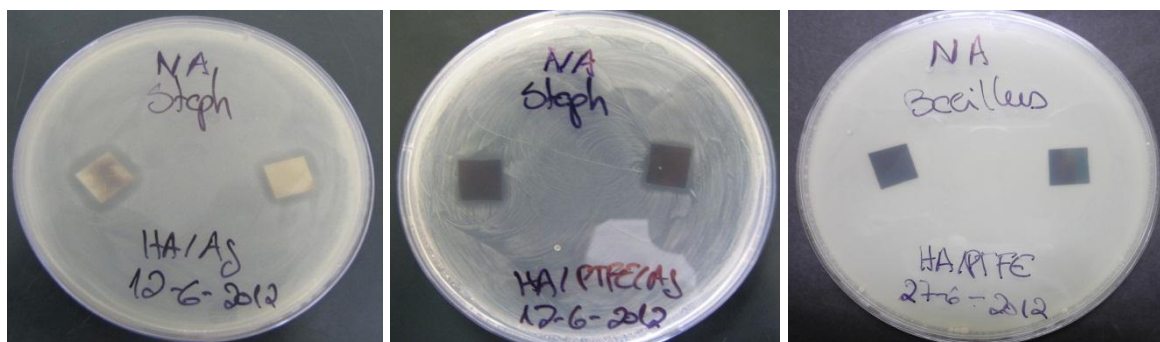
**Figura 3.18** - Imagens de AFM,  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , dos filmes após teste *in vitro*. A primeira imagem de fase, a do meio imagem topográfica em 2D e a terceira imagem topográfica em 3D dos quatro revestimentos: a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag.

### 3.7. Testes antibacterianos

Quando o tratamento médico passa pela colocação de um implante, um dos maiores problemas consiste no aparecimento de infecções pós-implantação. As infecções são capazes de provocar alterações na matriz extracelular o que leva a uma melhor adesão por parte das bactérias, pelo que impedir este fenómeno é essencial para o sucesso de um implante. Os testes realizados neste estudo tiveram uma duração de 24h, uma vez que é nas primeiras horas após o procedimento cirúrgico que se dão as infecções.

#### 3.7.1. Teste em Meio Sólido NA

Após 24 horas em contacto com os três tipos de bactérias em meio sólido NA, apenas os revestimentos com prata apresentaram halos de inibição e apenas na *Staphylococcus epidermidis* (figura 3.19). O maior halo ocorreu em HA/Ag com 2,6 mm e o halo em HA/PTFE/Ag é de 1,4 mm, os halos foram calculados através do software “ImageJ”. Esta diferença de halos é explicada pela quantidade de prata existente no revestimento, uma vez que HA/Ag tem maior quantidade de prata alcançou um maior halo de inibição. Estes dois filmes mostram assim capacidade para tratar infecções sem a necessidade de excesso de antibióticos, esta habilidade pode ser atribuída apenas à libertação de iões prata para o meio e não há libertação de iões flúor.

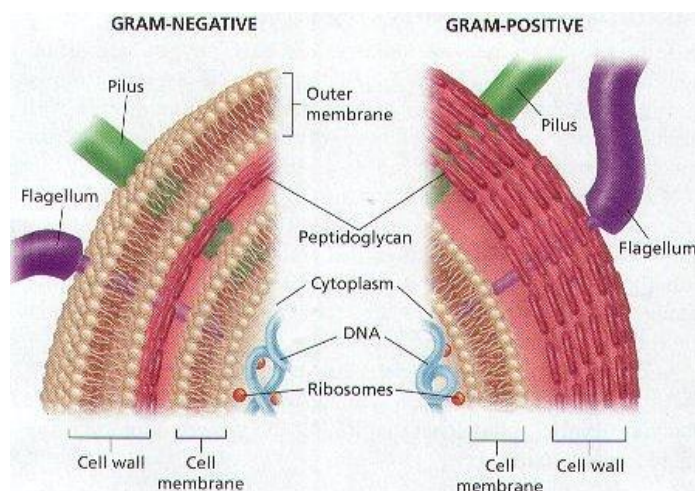


**Figura 3.19** - Halos de inibição obtidos no teste antimicrobiano, para HA/Ag e para HA/PTFE/Ag, e HA/PTFE em *Bacillus*, onde não houve halo de inibição.

O facto de estes revestimentos só conseguirem resultados na *Staphylococcus epidermidis* poderá estar relacionado com o facto de esta bactéria ser uma Gram-positiva e a *Escherichia coli* uma Gram-negativa sendo que a grande diferença está na constituição da parede celular de cada uma (figura 3.20).

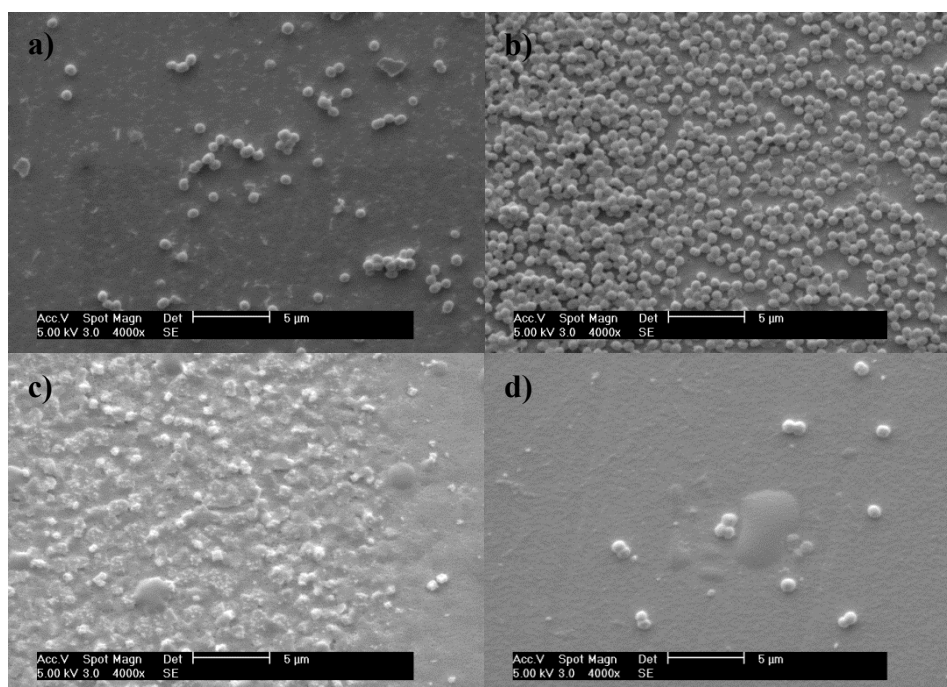
A parede celular de uma Gram-positiva é constituída por uma espessa e rígida camada de peptidoglicanos, polímero constituído por açúcares e aminoácidos fortemente ligados entre eles em longas cadeias. A parede celular de uma Gram-negativa também é constituída por peptidoglicanos, mas esta não é tão espessa como a de uma Gram-positiva, como se pode ver na figura 3.20. A Gram-negativa tem a “revestir” a camada de peptidoglicanos uma camada exterior de fosfolípidos, apresentando uma dupla proteção contra agentes nocivos à célula que a torna mais resistente do que as bactérias Gram-positivas [58]. Em 2011, *Nirmala et al* obtiveram resultados semelhantes, onde uma Gram-positiva se mostrou mais sensível ao revestimento de HA com Ag do que uma Gram-negativa [37].

A *Bacillus cereus* é uma também uma Gram-positiva, mas produtora de esporos e, por este motivo, muito resistente dado que se adapta a quase todas as condições. Neste contexto, o que torna este resultado positivo é o facto de que se os revestimentos em estudo tivessem o efeito de inibição do *B. cereus* significava que a libertação agentes antimicrobianos era tal modo elevado que, para além de bactérias, poderia ser citotóxico para as células saudáveis do organismo [10].



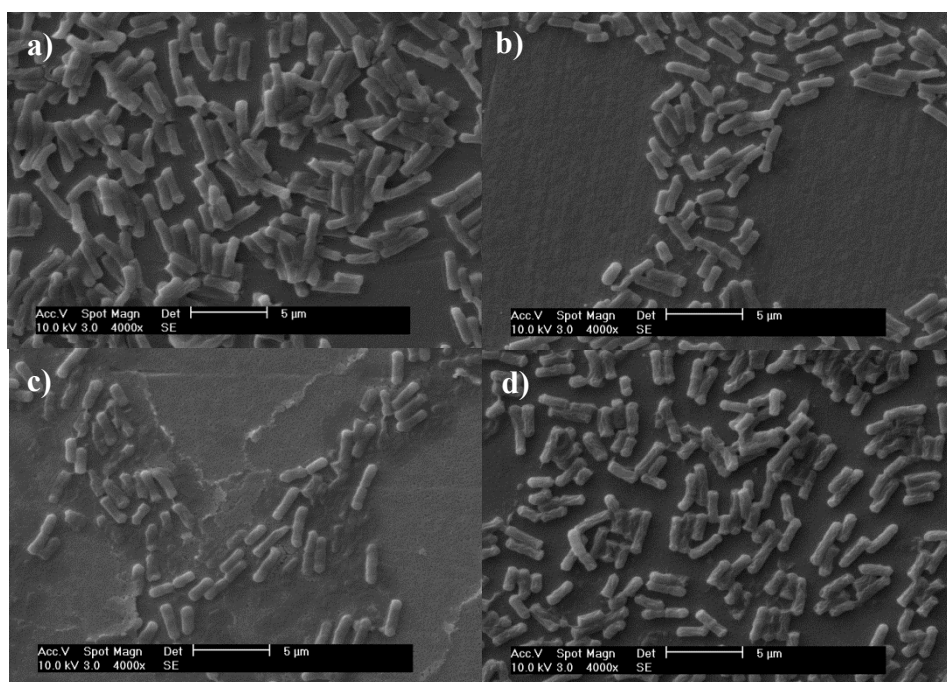
**Figura 3.20** - Comparação entre as paredes celulares de uma bactéria Gram-positiva e de uma Gram-negativa [Adaptada de 59].

Através de imagens de SEM foi possível perceber melhor o modo como as bactérias interagem com a superfície. Na figura 3.21 estão as imagens dos quatro revestimentos em contacto com a *S. epidermidis*, a única em que se obteve halo de inibição. É possível perceber que a superfície HA/PTFE é a superfície onde as bactérias melhor colonizam, o que leva a afirmar que a presença de flúor no revestimento não induz qualquer tipo de inibição, o que vai contra os resultados de *Ge et al*, onde um revestimento de HA com flúor tinha maior taxa antibacteriana que um revestimento só de HA [30]. Mas está de acordo com a investigação de *Puckett et al*, que concluíram que o aumento de iões flúor leva a um aumento de adesão bacteriana [51]. O revestimento de HA também apresenta bactérias, mais numas zonas que noutras, enquanto no filme fino de HA/PTFE/Ag há uma menor densidade bacteriana devido, provavelmente à presença de prata. Em todas as superfícies as bactérias mantêm a sua morfologia, exceto no revestimento de HA/Ag, onde há, aparentemente, matriz extracelular visível o que é uma consequência da perda de integridade da parede celular. Assim, as poucas que conseguem colonizar a superfície não sobrevivem.

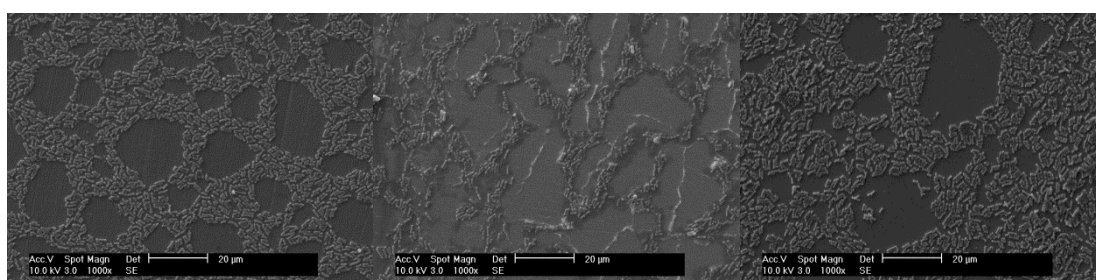


**Figura 3.21** - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em contacto com *Staphylococcus epidermidis*.

Na figura 3.22 estão as imagens dos revestimentos após contacto com *Bacillus cereus*, onde não foi visível a formação de qualquer halo de inibição. A superfície do filme finos de HA está coberta por esta bactéria, mas, nos restantes três revestimentos, é visível uma situação estranha na medida em que a bactéria prolifera mas mantém-se afastada de certas zonas, isto é, abre “halos de inibição” sobre a superfície, como se pode ver melhor nas imagens de menor ampliação da figura 3.23. Este resultado, indica que há uma não uniformidade na superfície destes filmes e que, considerando, as caracterizações anteriormente efetuadas, pode ser ao nível da distribuição de fases. No entanto, não é possível tirar uma conclusão definitiva sobre o comportamento observado.

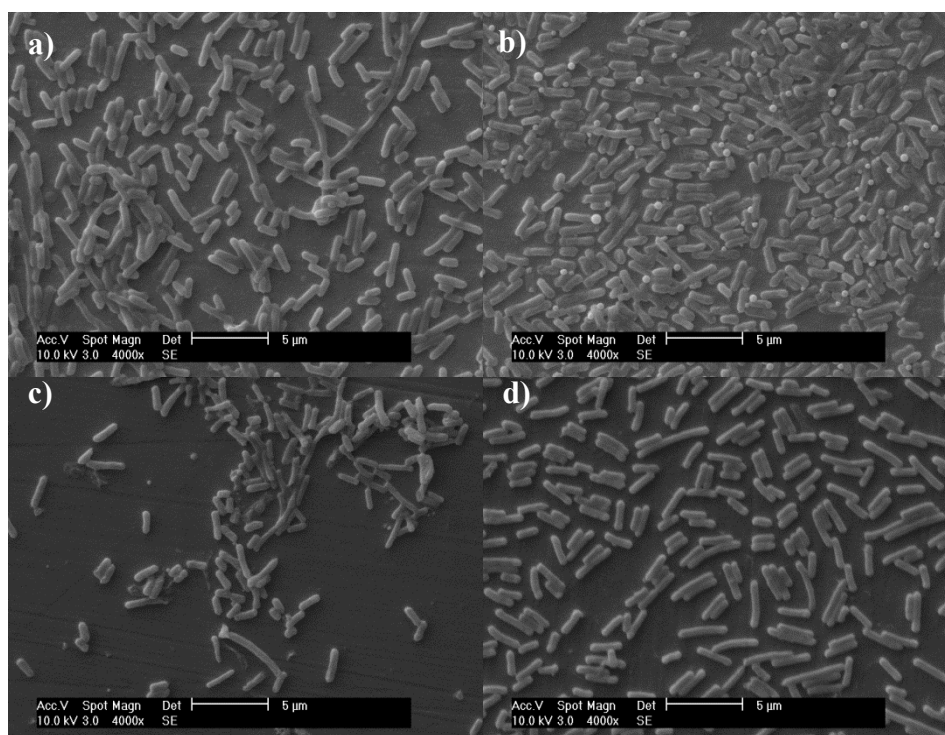


**Figura 3.22** - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em contacto com *Bacillus cereus*.



**Figura 3.23** - Micrografias SEM com menor ampliação de HA/PTFE, HA/Ag e HA/PTFE/Ag, respetivamente, em contacto com *Bacillus cereus*.

A figura 3.24 mostra que também a *Escherichia coli* coloniza melhor sobre o filme de HA/PTFE quando em comparação com as restantes superfícies. Mais uma vez é no filme de HA/Ag que a densidade bacteriana é inferior quando comparada com o observado nos restantes filmes finos. Estes resultados, comparação entre HA e HA/Ag, estão de acordo com os resultados de *Chen et al* [22,23]. As bactérias apresentam em todas as superfícies uma morfologia semelhante na literatura disponível [60].



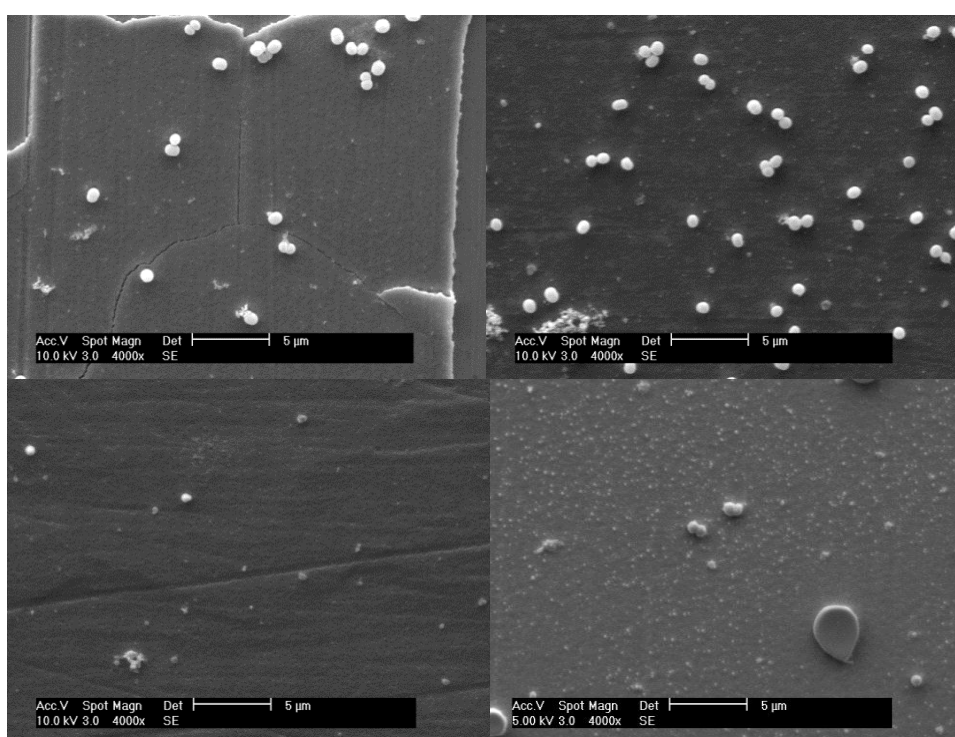
**Figura 3.24** - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em contacto com *Escherichia coli*.

### 3.7.2. Testes em Meio Líquido LB

O teste em meio líquido teve como objetivo observar se se formava um biofilme de bactérias na superfície, o que poderia levar a rejeição do implante por parte do organismo. Do estudo efetuado por observação em SEM pode ser concluído que não houve a formação de biofilme em nenhuma das superfícies qualquer que fosse o agente microbiano utilizado.

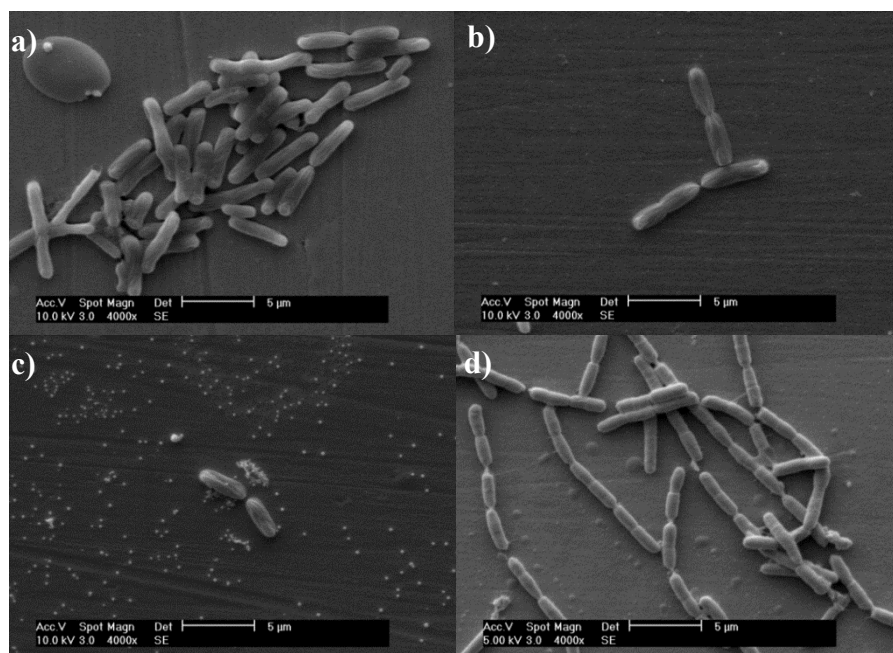


Nas amostras que estiveram em contacto com a *Staphylococcus epidermidis*, (figura 3.25) o revestimento que apresentava menor densidade de bactérias era o HA/Ag seguido, em ordem crescente, de HA, HA/PTFE/Ag, e por último o de HA/PTFE com a maior densidade bacteriana. Em nenhum dos casos a densidade bacteriana é suficiente HA/PTFE para considerar que houve a formação de um biofilme. No revestimento HA/PTFE/Ag deve ser salientado que a morfologia das bactérias era distinta do normal dado que apresentavam uma forma achatada, nada semelhante à forma redonda normal.



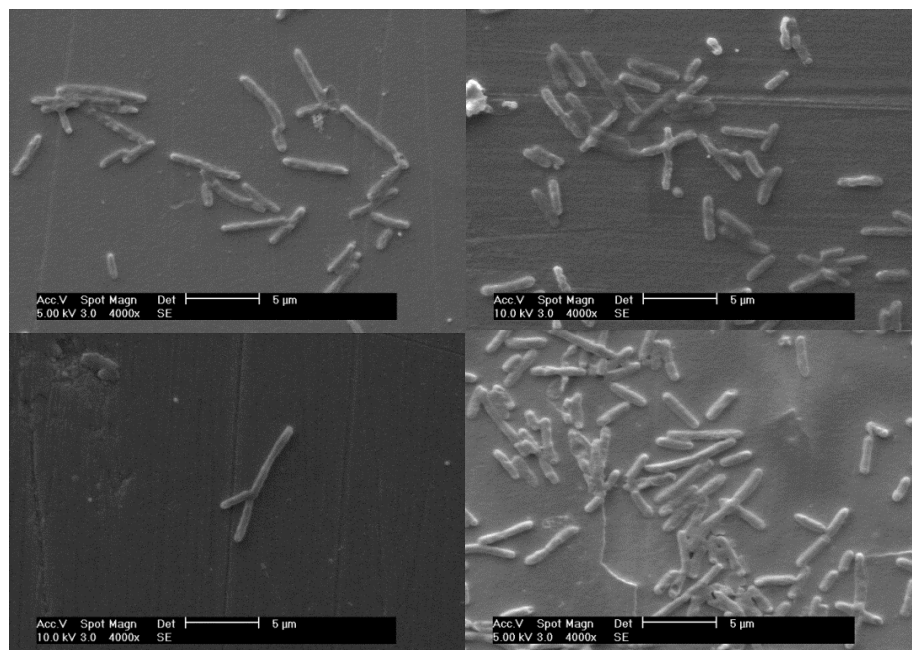
**Figura 3.25** - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em meio líquido com *Staphylococcus epidermidis*.

A figura 3.26 permite observar o comportamento do *Bacillus cereus* 24 horas depois de contacto com os revestimentos. Mais uma vez o filme fino dopado com prata é o que apresenta menos bactérias colonizadas na sua superfície e com uma morfologia algo distinta da normal. No caso específico desta bactéria a superfície do filme HA/PTFE, contrariamente ao observado anteriormente, apresenta uma baixa densidade bacteriana, semelhante do filme HA/Ag. Contudo, o que deve ser salientado é que nenhuma superfície apresentou a formação de biofilme.



**Figura 3.26** - Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em meio líquido com *Bacillus cereus*.

Quando em meio LB líquido com suspensão de *E. coli*, o revestimento de HA/Ag continua a ser o que apresenta melhores resultados (figura 3.27) apesar de em nenhum dos casos, mais uma vez, se ter observado a formação de um biofilme.



**Figura 3.27** -Micrografias SEM de a) HA, b) HA/PTFE, c) HA/Ag e d) HA/PTFE/Ag em meio líquido com *Escherichia coli*.

Assim, nenhum dos revestimentos mostrou a formação de um biofilme sobre a superfície em contacto com as três diferentes bactérias, o que é um resultado bastante positivo tendo em conta a aplicação, pois a formação deste poderia levar à falha e, conseqüente, remoção do implante, por outro lado talvez 24 horas seja pouco tempo para se poder ter garantias.

Ao comparar o comportamento dos revestimentos em meio sólido e meio líquido, é observado que em meio sólido as bactérias estão em maior quantidade sobre os revestimentos que em meio líquido. A diferença reside no facto de que, enquanto no meio sólido as caixas de inoculação estão estáticas, nos testes em meio líquido as caixas multiwell estão em movimento o que poderá dificultar o início do processo de adesão bacteriano.

Nos testes microbiológicos o revestimento de HA/Ag tem o melhor efeito antibacteriano de todos os revestimentos, tanto em meio líquido como em meio sólido, sendo que a bactéria mais sensível a esta superfície é a *Staphylococcus epidermidis*, que em meio sólido levou à formação de halo de inibição. No geral a superfície de HA/PTFE apresentou os piores resultados, especialmente na *Staphylococcus epidermidis*, o que indica que enquanto a prata tem um importante efeito inibidor nas bactérias o mesmo não pode ser afirmado para o flúor, para as estirpes estudadas, ao contrário do que alguma literatura refere.

---

## CONCLUSÃO

Tendo em consideração que o objetivo principal deste trabalho só poderia ser alcançado se vários fatores para ele contribuíssem, as principais conclusões podem ser sumariadas como se segue:

- A pulverização catódica, modo r.f. magnetrão não reativo, permitiu a deposição de filmes finos a partir de um alvo de HA puro e dopado;
- Quando se utiliza como material fornecedor de F o PTFE, os filmes finos não apresentam a substituição de parte da estrutura da HA com F, em vez disso formam revestimentos ricos em fluoreto de cálcio;
- Ao nível estrutural todos os filmes finos, inclusive o de HA, apresentam mais do que uma fase;
- Todos os filmes finos apresentam, após deposição, morfologias compactas (para a escala observada) e uma superfície nanorugosa;
- Todas as superfícies modificadas apresentam características hidrófilas e valores de potencial zeta mais facilitadores de osteointegração do que os substratos de Ti e aço 316L não revestidos;
- Os testes preliminares *in vitro* efetuados com solução balanceada de Hanks mostraram que, ao fim de 30 dias, os substratos não revestidos não apresentavam precipitados de Ca e P, o que indicia a sua fraca capacidade de induzir osteointegração, independentemente da sua composição química ou micro, nanorugosidade superficial;
- Dos testes *in vitro* os revestimentos que apresentaram capacidade para induzir maior osteointegração foram os que continham F: HA/PTFE e HA/PTFE/Ag;
- Os testes microbiológicos em meio líquido indicaram que nenhuma das três estirpes de bactérias foi capaz de formar um biofilme, após 24 horas de incubação, sobre nenhum dos revestimentos estudados;
- Os testes microbiológicos em meio sólido mostraram que os halos de inibição apenas foram observados para a bactéria *Staphylococcus epidermidis*, sendo que o revestimento com melhor efeito antimicrobiano é o HA/Ag seguido pelo revestimento HA/PTFE/Ag;
- Considerando o efeito conjunto de capacidade osteointegradora com propriedades antibacterianas o revestimento com o melhor desempenho é o HA/PTFE/Ag.

A literatura refere que o tratamento térmico leva a uma maior ordem estrutural de filmes finos de hidroxiapatite, o que, de acordo com alguns autores, induz uma maior facilidade na troca iónica com o meio e, conseqüentemente, uma maior capacidade osteointegradora.

Assim, seria interessante para trabalho futuro estudar qual o comportamento *in vitro* e em testes bacteriológicos destes filmes finos após tratamento térmico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] – Tapash R. Rautray et al., “Ion implantation of titanium based biomaterials”, *Progress in Materials Science* 56 (2011) 1137–1177.
- [2] – Lise T. de Jonge et al., “Organic–inorganic surface modifications for titanium implant surfaces”, *Pharmaceutical Research* 25 (2008) 2357-2369.
- [3] – Takao Hanawa, “In vivo metallic biomaterials and surface modification”, *Materials Science and Engineering A-Structural Materials Properties Microstructure and Processing* 267 (1999) 260–266.
- [4] – Nida Iqbal et al., “Electrophoretic deposition of PVA coated hydroxyapatite on 316L stainless steel”, *Current Applied Physics* 12 (2012) 755-759.
- [5] – M. Javidi et al., “In vitro electrochemical evaluation and phase purity of natural hydroxyapatite coating on medical grade 316L stainless steel”, *Materials and Corrosion* 60 (2009) 336-343.
- [6] – S. Virtanen et al., “Special modes of corrosion under physiological and simulated physiological conditions”, *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 468-476.
- [7] – A. A. Abdeltawab et al., “Electrophoretic deposition of hydroxyapatite coatings on titanium from dimethylformamide suspensions”, *Surface & Coatings Technology* 206 (2011) 43–50.
- [8] – Daniela Ionita et al., “Antimicrobial activity of the surface coatings on TiAlZr implant biomaterial”, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112 (2011) 630–634.
- [9] – Miroslav Jelínek et al., “Antibacterial properties of Ag-doped hydroxyapatite layers prepared by PLD method”, *Applied Physics A-Materials Science & Processing* 101 (2010) 615–620.
- [10] – M. Jelínek et al., “Biomedical properties of laser prepared silver-doped hydroxyapatite”, *Laser Physics* 21 (2011) 1265–1269.
- [11] - <http://www.mxortho.com/>, pesquisa em 29 agosto de 2012.

[12] – Stefan Sandukas et al., “Osteoblast adhesion to functionally graded hydroxyapatite coatings doped with silver”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 97 (2011) 490-497.

[13] – Xiang Ge et al., “Integrity and zeta potential of fluoridated hydroxyapatite nanothick coatings for biomedical applications”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4 (2011) 1046–1056.

[14] – Marcos Díaz et al., “Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite”, *Journal of Nanomaterials* 498505 (2009), 1-6.

[15] – X. Chen and H. J. Schluesener, “Nanosilver: A nanoparticle in medical application”, *Toxicology Letters* 176 (2008) 1-12.

[16] – Yaser Ghani et al., “Development of a hydroxyapatite coating containing silver for the prevention of peri-prosthetic infection Development of a hydroxyapatite coating containing silver for the prevention of peri-prosthetic infection”, *Journal of Orthopaedic Research* 30 (2012) 356-363.

[17] – Xiao Bai et al., “Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components”, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2264–2273.

[18] – Meital Zilberman and Jonathan J. Elsner, “Antibiotic-eluting medical devices for various applications”, *Journal of Controlled Release* 130 (2008) 202–215.

[19] – Michael Sygnatowicz, “Antimicrobial properties of silver-doped hydroxyapatite nano-powders and thin films”, *Biological and Biomedical Materials* 62 (2010) 65-70.

[20] – <http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/v003/r002/contents/chapters/chapter001/section001/blue/page001.html>, pesquisa em 29 agosto de 2012.

[21] – J. M. Schierholz and J. Beuth, “Implant infections: a haven for opportunistic bacteria”, *Journal of Hospital Infection* 49 (2001) 87-93.

[22] – W. Chen et al., “In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating”, *Biomaterials* 27 (2006) 5512-5517.

[23] – Yikai Chen et al., “Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings”, *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 19 (2008) 3603–3609.

[24] – Andrea Ewald et al., “Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity”, *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 4064–4070.

[25] – X. Zhang et al., “Toughening of calcium hydroxyapatite with silver particles”, *Journal of Materials Science* 32 (1997) 235-243.

[26] – “<http://www.chemistryexplained.com/elements/C-K/Fluorine.html#b>”, pesquisa em 12 de julho de 2012.

[27] – M.H. Fathi and E. Mohammadi Zahrani, “Fabrication and characterization of fluoridated hydroxyapatite nanopowders via mechanical alloying”, *Journal of Alloys and Compounds* 475 (2009) 408-414.

[28] – M.H. Fathi and E. Mohammadi Zahrani, “Mechanical alloying synthesis and bioactivity evaluation of nanocrystalline fluoridated hydroxyapatite”, *Journal of Crystal Growth* 311 (2009) 1392–1403.

[29] – J. V. Rau et al., “Properties of pulsed laser deposited fluorinated hydroxyapatite films on titanium”, *Materials Research Bulletin* 45 (2010) 1304–1310.

[30] – Xiang Ge et al., “Antibacterial coatings of fluoridated hydroxyapatite for percutaneous implants”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 95A (2010) 588-599.

[31] – Albano Cavaleiro e Maria Teresa Vieira, “Textos de apoio às disciplinas: Engenharia de superfícies e Degradação e proteção de superfícies”, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra 1995.

[32] - J. E. Alfonso et al., “Influence of the Substrate Bias Voltage on the Crystallographic Structure and Surface Composition of Ti6Al4V Thin Films Deposited by rf Magnetron Sputtering”, *Brazilian Journal of Physics* 36 (2006) 994-996.

[33] – Yoshiki Ando et al., “Calcium phosphate coating containing silver shows high antibacterial activity and low cytotoxicity and inhibits bacterial adhesion”, *Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications* 30 (2010) 175–180.

[34] – Xiong Lu et al., “Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition”, *Journal of Royal Society Interface* 8 (2011) 529-539.

[35] – Jie Qu et al., “Silver/hydroxyapatite composite coatings on porous titanium surfaces by sol-gel method”, *Journal of Biomedical Materials* 79B (2011) 40-48.

[36] – Vojislav Stanić et al., “Synthesis of antimicrobial monophasic silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering”, *Applied Surface Science* 257 (2011) 4510–4518.



[37] – R. Nirmala et al., “Synthesis and characterization of bovine femur bone hydroxyapatite containing silver nanoparticles for the biomedical applications”, *Journal of Nanoparticle Research* 13 (2011) 1917–1927.

[38] – Kui Cheng et al., “In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings”, *Biomaterials* 26 (2005) 6288–6295.

[39] – Nuno Miguel Rodrigo Figueiredo, “Revestimentos decorativos à base de SPR: o sistema W-O com adições de Au”, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, 2010.

[40] – H. Stanjek and W. Häusler, “Basics of X-ray Diffraction”, *Hyperfine Interactions* 154 (2004) 107–119.

[41] – Jorge Manuel Ramos Nunes, “Filmes finos funcionais em gradiente para dispositivos de cirurgia vascular” Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra 2008.

[42] – E. A. Torres and A. J. Ramírez, “In situ scanning electron microscopy”, *Science and Technology of Welding and Joining* 16 (2011) 68-78.

[43] – José Luis Alonso, Wolfgang H. Goldmann, “Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology”, *Life Sciences* 72 (2003) 2553–2560.

[44] – Yongho Seo and Wonho Jhe, “Atomic force microscopy and spectroscopy”, *Reports on Progress in Physics* 71 (2008) 1-23.

[45] - Pedro Miguel Fernandes Da Fonseca, “ Filmes finos para sensores de pressão em próteses em membros inferiores – Dióxido de titânio dopado com prata”, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra, 2011.

[46] – Hermina Bukšek et al., “Zeta potential determination of polymeric materials using two differently designed measuring cells of an electrokinetic analyzer”, *Acta Chimica Slovenica* 57 (2010) 700–706.

[47] – Erwin A. Vogler, “Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces”, *Advances in Colloid and Interface Science* 74 (1998) 69-117.

[48] – Yan Yonggang et al., “Preparation and characterization of RF magnetron sputtered calcium pyrophosphate coatings”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 76 (2006) 744-752.

[49] – D. R. Lide (Ed.) Handbook of chemistry and physics, 85th Ed. CRC Press, Boca Raton, USA, 2004.

[50] – B. Feddes et al., “Bulk composition of r.f. magnetron sputter deposited calcium phosphate coatings on different substrates”, Surface & Coatings Technology 185 (2004) 346–355.

[51] – Sabrina D. Puckett et al., “The relationship between the nanostructure of titanium surfaces and bacterial attachment”, Biomaterials 31 (2010) 706–713.

[52] – A.R., Ribeiro et al, “Characterization of hydroxyapatite sputtered films doped with titanium”, Key Engineering Materials 330-332 (2007) 649-652.

[53] – J. G. C. Wolke et al., “In vivo dissolution behavior of various RF magnetron sputtered Ca-P coatings”, Journal of Biomedical Materials Research 39 (1998) 524-530.

[54] – Ralf Smeets et al., “A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation”, Head & Face Medicine 5 (2009) 8 páginas.

[55] – A. P. Luz et al., “Artigo revisão: Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários”, Cerâmica 54 (2008) 174-183.

[56] – Chen Jie-Rong and T. Wakida, “Studies on the surface free energy and surface structure of PTFE film treated with low temperature plasma”, Journal of Applied Polymer Science 63 (1997) 1733-1739.

[57] – Naofumi Ohtsu et al., “Calcium phosphates formation on CaTiO<sub>3</sub> coated titanium”, Journal of Materials Science-Materials in Medicine 18 (2007) 1009-1016.

[58] – Teemu J. Kinnari et al., “Influence of surface porosity and pH on bacterial adherence to hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate bioceramics”, Journal of Medical Microbiology 58 (2009) 132–137.

[59] – “<http://tommytoy.typepad.com/tommy-toy-pbt-consultin/2011/11/antibacterials-tartups-draw-venture-capital-for-drugs-targeting-gram-negative-bacteria-and-infection.html>” pesquisa em 1 agosto de 2012.

[60] – Chang Wang et al., “Toxicity effects of four typical nanomaterials on the growth of Escherichia coli, Bacillus subtilis and Agrobacterium tumefaciens”, Environmental Earth Sciences 65 (2012) 1643-1649.

# Anexo

**Composição química dos materiais metálicos utilizados como substratos**

	Composição química (%pd. máxima)					
	Fe	O	H	N	C	Ti
Ti cp4 *	0,5	0,4	0,0015	0,05	0,1	bal

	Composição química (% pd. máxima)									
	C	Mn	Si	Cr	Ni	Mo	P	S	N	Fe
316L**	0,02	2,0	0,75	18,0	14,0	3,0	0,045	0,030	0,10	bal

\*"Titanium in Medicine", DM Brunette, PTengvall, M Textor and P Thomsen, Eds. Springer-Verlag:Berlin, 2001, pg.33

\*\* de acordo com AISI (<http://www.steel.org/>)

## Fichas ICDD

81-2041		Wavelength= 1.78897				C		
Ca(OH) <sub>2</sub>		2 $\theta$	Int	h	k	l		
Calcium Hydroxide		20.989	718	0	0	1		
		33.451	186	1	0	0		
		39.825	999*	1	0	1		
		42.726	7	0	0	2		
Rad.: CuK $\alpha$	$\lambda$ : 1.54060	Filter:	d-sp: Calculated	55.322	415	1	0	2
				59.796	270	1	1	0
Cut off: 17.7	Int.: Calculated	I/Corr.: 3.60		64.105	151	1	1	1
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)				66.243	12	0	0	3
Ref: Desgranges, L et al., Acta Crystallogr., Sec. B: Structural Science, 49, 812 (1993)				70.279	22	2	0	0
				74.271	106	0	2	1
				76.277	114	0	1	3
Sys.: Hexagonal	S.G.: P $\bar{3}$ m1 (164)			85.869	82	0	2	2
a: 3.589(8)	b:	c: 4.911(14)	A:	93.531	14	0	0	4
$\alpha$ :	$\beta$ :	$\gamma$ :	Z: 1	95.398	23	1	1	3
			mp:	99.177	16	2	1	0
Ref: Ibid.				103.052	76	2	1	1
				103.052	76	0	1	4
				105.052	36	2	0	3
Dx: 2.246	Dm:	ICSD # : 073468						

Peak height intensity. R-factor: 0.018. Single-crystal data used. PSC: hP5. Mwt: 74.09. Volume[CD]: 54.78.



© 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

81-2041		Wavelength= 1.78897				C		
Ca(OH) <sub>2</sub>		d(A)	Int	h	k	l		
Calcium Hydroxide		4.911	718	0	0	1		
		3.1081	186	1	0	0		
		2.6263	999*	1	0	1		
		2.4555	7	0	0	2		
Rad.: CuK $\alpha$	$\lambda$ : 1.54060	Filter:	d-sp: Calculated	1.9267	415	1	0	2
				1.7945	270	1	1	0
Cut off: 17.7	Int.: Calculated	I/Corr.: 3.60		1.6855	151	1	1	1
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)				1.6370	12	0	0	3
Ref: Desgranges, L et al., Acta Crystallogr., Sec. B: Structural Science, 49, 812 (1993)				1.5540	22	2	0	0
				1.4816	106	0	2	1
				1.4484	114	0	1	3
Sys.: Hexagonal	S.G.: P $\bar{3}$ m1 (164)			1.3131	82	0	2	2
a: 3.589(8)	b:	c: 4.911(14)	A:	1.2277	14	0	0	4
$\alpha$ :	$\beta$ :	$\gamma$ :	Z: 1	1.2093	23	1	1	3
			mp:	1.1747	16	2	1	0
Ref: Ibid.				1.1425	76	2	1	1
				1.1425	76	0	1	4
				1.1270	36	2	0	3
Dx: 2.246	Dm:	ICSD # : 073468						

Peak height intensity. R-factor: 0.018. Single-crystal data used. PSC: hP5. Mwt: 74.09. Volume[CD]: 54.78.



© 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

87-0971 Wavelength= 1.78897 C

CaF2	2 $\theta$	Int	h	k	l
Calcium Fluoride	32.899	999*	1	1	1
	38.171	6	2	0	0
	55.087	998	2	2	0
	65.672	308	3	1	1
	68.991	4	2	2	2
	81.682	108	4	0	0
	90.899	95	3	3	1
	93.965	8	4	2	0
	106.439	169	4	2	2

Rad.: CuK $\alpha$ 1  $\lambda$ : 1.54060 Filter: d-sp: Calculated  
 Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/ICor.: 4.10  
 Ref: Calculated from ICSD using POWD-12+, (1997)  
 Ref: Zhurova, E.A et al., Kristallografiya, 41, 438 (1996)


---

Sys.: Cubic S.G.: Fm $\bar{3}$ m (225)  
 a: 5.4712(4) b: c: A: C:  
 $\alpha$ :  $\beta$ :  $\gamma$ : Z: 4 mp:  
 Ref: Ibid.

Dx: 3.167 Dm: ICSD #: 082707

---

Peak height intensity. R-factor: 0.006. PSC: cF12. Mwt: 78.08. Volume[CD]: 163.78.

 © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
 PCPDFWIN v. 2.1

87-0971 Wavelength= 1.78897 C

CaF2	d(A)	Int	h	k	l
Calcium Fluoride	3.1588	999*	1	1	1
	2.7356	6	2	0	0
	1.9343	998	2	2	0
	1.6496	308	3	1	1
	1.5794	4	2	2	2
	1.3678	108	4	0	0
	1.2551	95	3	3	1
	1.2234	8	4	2	0
	1.1168	169	4	2	2

Rad.: CuK $\alpha$ 1  $\lambda$ : 1.54060 Filter: d-sp: Calculated  
 Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/ICor.: 4.10  
 Ref: Calculated from ICSD using POWD-12+, (1997)  
 Ref: Zhurova, E.A et al., Kristallografiya, 41, 438 (1996)

---

Sys.: Cubic S.G.: Fm $\bar{3}$ m (225)  
 a: 5.4712(4) b: c: A: C:  
 $\alpha$ :  $\beta$ :  $\gamma$ : Z: 4 mp:  
 Ref: Ibid.

Dx: 3.167 Dm: ICSD #: 082707

---

Peak height intensity. R-factor: 0.006. PSC: cF12. Mwt: 78.08. Volume[CD]: 163.78.

 © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
 PCPDFWIN v. 2.1

