



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ISAU DANTAS MORAIS

**USO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO AUMENTA A MOLHABILIDADE E
PREVINE A CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM SUPERFÍCIES DE LIGAS DE
TITÂNIO- ALUMÍNIO-VANÁDIO**

MOSSORÓ/RN

2024

ISAU DANTAS MORAIS

**USO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO AUMENTA A MOLHABILIDADE E
PREVINE A CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM SUPERFÍCIES DE LIGAS DE
TITÂNIO- ALUMÍNIO-VANÁDIO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal da Universidade Federal
Rural do Semi-Árido como requisito para
obtenção do título de mestre em ciência animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia
Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de
Moura.

MOSSORÓ/RN

2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

MM828 Morais, Isau Dantas.
u Uso do plasma atmosférico a frio aumenta a
 molhabilidade e previne a contaminação fúngica em
 superfícies de ligas de titânio- alumínio-vanádio /
 Isau Dantas Morais. - 2024.
 54 f. : il.

 Orientador: Carlos Eduardo Bezerra de Moura.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2024.

 1. Plasma não térmico. 2. Biomateriais. 3.
Candida albicans. I. Moura, Carlos Eduardo
Bezerra de , orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ISAU DANTAS MORAIS

**USO DO PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO AUMENTA A MOLHABILIDADE
E PREVINE A CONTAMINAÇÃO FÚNGICA EM SUPERFÍCIES DE LIGAS
DE TITÂNIO- ALUMÍNIO-VANÁDIO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido para a obtenção do título de mestre.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia animal.

Defendida em: 31/01/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA**
Data: 21/02/2024 17:05:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)

Presidente

Documento assinado digitalmente
 **CLODOMIRO ALVES JUNIOR**
Data: 21/02/2024 17:38:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Clodomiro Alves Junior (UFERSA)

Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **CAIO SERGIO SANTOS**
Data: 07/02/2024 18:17:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Caio Sergio Santos (UFERSA)

Membro Examinador

In memoriam a **Antônio Batista de Oliveira** (Sr. Tarcísio).

In memoriam a **Vitinho** (Meu eterno amigo).

Dedico este trabalho a mamãe Arquildes e a papai Zé. Eu os amo!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS** por mesmo sem eu merecer me permitir chegar até esse momento tão gratificante. Obrigado por ser tão grande e tão fiel em minha vida, papai do céu! Que eu sempre possa reconhecer o quanto o SENHOR essencial para mim! EU TE AMO!

A minha mamãe **Arquildes**. A senhora é a pessoal mais importante da minha vida. Muito obrigado por dizer que me ama em cada conversa, abraço e beijos. Obrigado por nunca desistir de mim, mesmo quando meus cabelos, unhas e pele já estavam desistindo. Obrigado por acreditar que DEUS iria me curar. Sem dúvidas eu tenho a melhor mãe do mundo.

Ao meu papai **Zé**. Muito obrigado por me amar tanto! Obrigado por me aceitar como seu filho e acreditar no meu futuro. Obrigado por me dar a honra de fazer sua barba. Sem dúvidas, eu tenho o melhor pai do mundo. Eu te amo!

A mamãe **Gilcele**. Gratidão por cuidar tão bem de mim e acreditar que eu pudesse ser alguém de valor. Obrigado por me incentivar sempre a ser uma pessoa melhor. Eu te amo!

A minha esposa **Thaissa**. Saiba que sou eternamente grato a DEUS por ter você em minha vida. Obrigado por todos os conselhos, ensinamentos e amor doado a mim. Sem dúvidas, você é mais do que sonhei. Eu te amo!

Aos meus irmãos, **Diego, Elizama e Roxana**. Saibam que sou eternamente grato a DEUS por ter vocês em minha vida, vocês fazem parte dessa vitória.

Aos meus tios **Gilneto, Gilberto e Ricardo**. Muito obrigado por todos os ensinamentos.

A minha sogra **Zizi** e aos meus cunhados **Thiago, Thainá** e seu marido **Daniel**. Muito obrigado por se fazerem presentes em minha vida e me ajudar em todos os momentos.

Ao meu falecido sogro, o Sr. **Tarcísio**. Mesmo com o pouco tempo de convivência o Sr. me ensinou muitas coisas boas que eu levo para vida. Que o SENHOR DEUS esteja cuidando de ti nos céus.

Ao meu falecido e grande amigo **Vitinho**. As nossas brincadeiras de criança foram incríveis. Eu não consigo esquecer você. Se DEUS quiser um dia vamos se encontrar e conversar mais um pouquinho. Que o papai do céu te guarde eternamente.

A minha princesa **Isabela**. Você foi um dos maiores presentes que chegou até mim. Titio te ama e fará de tudo para te fazer feliz.

Ao **Sr. Luiz**. Muito obrigado por ser tão generoso comigo. Que o SENHOR DEUS continue abençoando sua vida.

Ao Professor **Cadu**. Sem dúvidas o Sr. É um pai para todos nós. Muito obrigado pelos ensinamentos que ultrapassam a vida acadêmica. O senhor merece tudo de melhor na vida. Nunca deixe de ser esse ser humano incrível és. Que o SENHOR DEUS multiplique sua vida para que muitas pessoas tenham o prazer de te conhecer.

A banca examinadora. Aos professores **Clodomiro, Caio e Jussier**, muito obrigado por contribuir para que possa crescer academicamente e como ser humano.

Ao meu amigo e irmão **Mateus**. Você sabe o quanto eu te amo e torço muito pelo seu sucesso. Obrigado por todas as palavras de incentivo e por ser a primeira pessoa que viu a flor da docência em minha vida! DEUS abençoe irmão.

A **Vanesca** por ter sido o meu braço direito no laboratório de Plasma. A sua amizade, companheirismo e incentivo foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Que o SENHOR sempre esteja contigo, querida.

A **Juliete**. Mesmo tendo chegado há pouco tempo, você já conquistou nossos corações. Obrigado por acreditar na pesquisa e escolher o nosso laboratório como caminho para o seu crescimento.

A **Luiz Emanuel** pelo empenho em todo o processo. Obrigado por acreditar em mim, principalmente nessa etapa final ajudando para que tudo fosse concluído da melhor maneira possível. Que o SENHOR DEUS continue abençoando sua vida irmão.

A **CAPES** pela oportunidade que me foi concedida para realizar uma parte dos meus sonhos.

Aos meus atletas da **LÁCIO**. Obrigado por me aceitarem como técnico no início de 2023 e confiar no meu trabalho.

Aos meus atletas da **Atlética Tormenta (Futsal masculino e feminino)**. Graças a DEUS nós criamos uma relação incrível e hoje os tenho como umas das melhores parte minha vida. Peço muito a DEUS que ele conserve o nosso projeto por muitos e muitos anos. Eu amo vocês!

A **Gabriel** por me acolher no **LabPlasma** e ajudar na minha evolução enquanto discente. O sua forma de ensinar foi essencial para que tudo desse certo. Te desejo toda a felicidade do mundo.

Ao professor **Moacir** por todas as orientações e conversas de amigo. Obrigado pelas palavras amor e carinho de sempre. Assim como o professor Cadu, o Sr. é um pai que a UFERSA me deu. Que o SENHOR DEUS te conserve por muitos anos, o mundo precisa de homens como o senhor.

Ao **CITED**, em especial o **LabPlasma** e o **Laboratório de Filmes finos** por me fornecer condições necessárias para eu vencer esta etapa da vida.

As meninas cuidadoras do **CITED**. Obrigado por zelar o nosso patrimônio e permitir que ele estivesse sempre nas melhores condições possíveis para nos receber.

A professora **Janine** por acreditar em mim. Muito obrigado pelas palavras de incentivo durante o seu período de doutorado. Você é merecedora de tudo que está vivendo.

A **Bia**. Muito obrigado por me ajudar nesse processo e acreditar que tudo seria possível. Que DEUS conserve a nossa amizade.

Ao **Laboratório de Anatomia Veterinária**. Lá foi onde tudo começou e onde eu tive a oportunidade de aprender e compartilhar um pouco do que aprendi.

A todos os meus **alunos e alunas**. Muito obrigado por me tratarem tão bem, tanto dentro quanto fora da sala de aula. Sou grato a DEUS por nossa relação de amizade ultrapassar os limites da sala de aula.

BEM AVENTURANÇA DO CRENTE

Bem-aventurado o que confia
No Senhor, como fez Abraão
Ele creu, ainda que não via
E, assim, a fé não foi em vão
É feliz quem segue, fielmente
Nos caminhos santos do Senhor
Na tribulação é paciente
Esperando no seu Salvador

Os heróis da Bíblia Sagrada
Não fruíram logo seus troféus
Mas levaram sempre a cruz pesada
Para obter poder dos céus
E depois, saíram pelo mundo
Como mensageiros do Senhor
Com coragem e amor profundo
Proclamando Cristo, o Salvador.

Quem quiser de Deus ter a coroa
Passará por mais tribulação
Às alturas santas ninguém voa
Sem as asas da humilhação
O Senhor tem dado aos Seus queridos
Parte do Seu glorioso ser
Quem no coração for mais ferido
Mais daquela glória há de ter

Quando aqui as flores já fenecem
As do céu começam a brilhar
Quando as esperanças desvanecem

O aflito crente vai orar
Os mais belos hinos e poesias
Foram escritos em tribulação
E do céu, as lindas melodias
Se ouviram, na escuridão

Sim, confia tu, inteiramente
Na imensa graça do Senhor
Seja de ti longe o desalento
E confia no Seu santo amor

Aleluia seja a divisa
Do herói e todo o vencedor
E do céu mais forte vem à brisa
Que te leva ao seio do Senhor.

(Harpa cristã, hino 126).

RESUMO

O titânio e suas ligas são biomateriais metálicos que se destacam pelo seu bom grau de biocompatibilidade, leveza e resistência à corrosão, se mostrando essencial para sucessos clínicos como a fixação de implantes. Apesar disso, esses implantes estão propensos à adesão de microrganismos como *Candida albicans*, gerando riscos ao organismo humano que variam desde a toxicidade medicamentosa no combate a infecção à substituição do material implantado. Sabendo que *C. albicans* tem afinidade para crescer em superfícies hidrofóbicas, torna-se fundamental o uso de estratégias para tornar esses biomateriais com o caráter hidrofílico. O plasma atmosférico a frio (CAP) é um gás ionizado que ao bombardear superfícies metálicas tem a capacidade de quebrar suas ligações e formar novos grupos funcionais que melhoram a energia da superfície, potencializando hidrofiliabilidade sobre elas. Dessa forma, o presente trabalho utilizou o CAP sobre superfícies da liga titânio-alumínio-vanádio (Ti6AL4V) visando melhorar da hidrofiliabilidade desses materiais, bem como prevenir a contaminação com o fungo *C. albicans*. As caracterizações das amostras como a molhabilidade por meio do ângulo de contato e a composição química da superfície por Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) foram avaliadas, além da contagem da unidade formadora de colônias (UFC) e formação de pseudohifas do fungo *C. albicans*. Os resultados mostraram que o CAP foi capaz de promover aumento da molhabilidade em Ti6AL4V que se manteve inalterada nos três primeiros dias. Na análise de XPS observou-se oxidação do Ti e aumento de hidroxilas nas superfícies tratadas. Houve uma redução no crescimento de *C. albicans* e da formação de pseudohifas nas superfícies Ti-6Al-4V tratadas. Esses bons resultados foram creditados à capacidade do CAP em promover maior hidrofiliabilidade das superfícies de Ti6AL4V e minimizar os riscos de contaminação por fungos.

Palavras-chave: Plasma não térmico; biomateriais; *Candida albicans*.

ABSTRACT

O titanium and its alloys are metallic biomaterials that stand out for their good degree of biocompatibility, lightness, and corrosion resistance, proving essential for clinical successes such as implant fixation. However, these implants are prone to microbial adhesion such as *Candida albicans*, posing risks to the human body ranging from drug toxicity in combating infection to the replacement of the implanted material. Knowing that *C. albicans* has an affinity to grow on hydrophobic surfaces, it becomes essential to use strategies to make these biomaterials hydrophilic. Cold atmospheric plasma (CAP) is an ionized gas that, when bombarding metallic surfaces, has the ability to break their bonds and form new functional groups that improve surface energy, enhancing hydrophilicity over them. Thus, the present study used CAP on surfaces of the titanium-aluminum-vanadium alloy (Ti6Al4V) aiming to improve the hydrophilicity of these materials, as well as to prevent contamination with the fungus *C. albicans*. Characterizations of the samples such as wettability through contact angle and surface chemical composition by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) were evaluated, in addition to the counting of colony-forming units (CFU) and formation of pseudohyphae of the fungus *C. albicans*. The results showed that CAP was able to promote an increase in the wettability of Ti6Al4V, which remained unchanged in the first three days. In the XPS analysis, oxidation of Ti and an increase in hydroxyls on the treated surfaces were observed. There was a reduction in the growth of *C. albicans* and the formation of pseudohyphae on the treated Ti-6Al-4V surfaces. These good results were attributed to CAP's ability to promote greater hydrophilicity of the Ti6Al4V surfaces and minimize the risks of fungal contamination.

KEY-WORDS: Non-thermal plasma; biomaterials; *Candida Albicans*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média e desvio padrão (DP) da contagem expressa em unidade formadora de colônia (UFC) de *Candida albicans* ATCC 10231 aderidas sobre superfícies de Ti6Al4V controle (LC) e tratadas com plasma atmosférico a frio (LiCap)41

Tabela 2 - Número de pseudohifas (média $\pm$ desvio padrão) formadas sobre superfícies de Ti6Al4V tratadas com plasma atmosférico a frio.....42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem representativa do titânio nas fases hexagonal e cúbica. Ao atingir temperaturas superiores a 882°C a fase hexagonal do titânio modifica-se para cúbica.	22
Figura 2 – Aplicabilidade dos biomateriais em diversas regiões do corpo, desde o crânio até o pé.	23
Figura 3 – Ângulo de contato das superfícies. A) Hidrofilica e B) Hidrofóbica.	25
Figura 4 – Ângulo de contato sobre superfícies de titânio tratadas com plasma atmosférico a frio. A – superfície sem tratamento. B – superfície tratada.	25
Figura 5 - Ação do XPS sobre a amostra. A radiação eletromagnética alcança a amostra e promove a ejeção de elétrons para o analisador.	26
Figura 6 – Fase de adesão, proliferação e formação de biofilme e dispersão de <i>Cândida albicans</i>	27
Figura 7 – Angiogênese durante a osseointegração. Observar células perivasculares (cor verde) migrando dos vasos sanguíneos e diferenciam-se em osteoblastos sobre a superfície do implante. A partir daí se inicia o processo de osteogênese.	28
Figura 8 – Protótipo de plasma atmosférico a frio criado em laboratório ligado a uma fonte. Observa-se na figura: fonte de energia, cilindro de gás, tubo direcionador de fluxo e o jato de plasma.	31
Figura 9 – Aplicação do CAP seguindo um processo de varredura por toda a amostra.	32
Figura 10 – Efeitos do plasma sobre superfícies.	32
Figura 11 – Efeitos das propriedades do plasma sobre microrganismos. O plasma quando direcionado tem a capacidade de danificar a parede celular, gerando danos ao conteúdo interno.	33
Figura 12 - Ângulo de contato nas superfícies de Ti6Al4V tratadas com plasma atmosférico a frio, imediatamente após tratamento (D0), 24 horas depois (D1), 72h (D3) e 120h (D5).	39
Figura 13 - Análise de XPS de superfícies de Ti6Al4V tratadas por CAP. A – Curvas da análise. B – Histogramas representativos da quantificação da área de Ti.	40
Figura 14 – Análise de XPS de superfícies de Ti6Al4V tratadas por CAP. A – Curvas da análise. B – Histogramas representativos da quantificação da área dos grupamentos formados.	41
Figura 15 - Contagem de UFC de cepas (ATCC 10231) de <i>Candida albicans</i> sobre superfícies de Ti6Al4V tratadas (LigaTcap) ou não (LigaC) com plasma atmosférico a frio.	42
Figura 16 - Morfologia de <i>C. albicans</i> sobre as superfícies de Ti6Al4V controle (A) e tratadas com CAP (B).	43

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

°	Graus
±	Mais ou menos
CAP	Plasma atmosférico a frio
Ti6Al4V	Titanio-aluminio-vanádio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
UFC	Unidade formadora de colônias
<	Menor que
>	Maior que
kV	quilovolt
Hz	Frequência
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
LigaC	Liga controle
LigaCapD0	Liga tratada com CAP no dia 0
LigaCapD1	Liga tratada com CAP no dia 1
LigaCapD3	Liga tratada com CAP no dia 3
LigaCapD5	Liga tratada com CAP no dia 5
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio - X
LC	Liga controle
LiCAP	Liga tratada com plasma atmosférico a frio
OH	Hidroxila
Ti-o-Ti	Titânio
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
A	Tratado
B	Controle

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Biomateriais metálicos.....	21
2.1.1	Titânio e suas ligas.....	21
2.2	Modificações de superfícies metálicas e seus benefícios	23
2.3	Molhabilidade	24
2.4	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raio – X (XPS)	25
2.5	Fungo <i>Candida albicans</i> e suas implicações em biomateriais metálicos	26
2.6	Osseointegração	27
2.7	Considerações gerais sobre o plasma	29
2.8	Tipos de plasma	30
2.8.1	Plasma de baixa pressão	30
2.8.2	Plasma atmosférico a frio (CAP).....	30
2.9	Efeito do CAP nas modificações em superfícies metálicas.....	32
2.10	A durabilidade do tratamento de superfícies	34
3.	OBJETIVOS	35
3.1	Geral	35
3.2	Específicos	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Preparação dos discos de titânio	36
4.1.1	Caracterização das superfícies dos discos de titânio	37
4.1.2	Composição química da superfície.....	37
4.2	Preparo e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's)	37
4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
4.4	Análise Estatística.....	38
5.	RESULTADOS	39
5.1	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x (XPS) em amostras da liga titânio-alumínio-vanádio.....	39
5.1.1	Efeito do CAP sobre o processo de oxidação da Liga Ti6Al4V	39
5.1.2	Efeito do plasma sobre as quebras de ligações e formação de novos grupos funcionais	40
5.2	Crescimento de cepas (ATCC 10231) de <i>C. albicans</i> sobre superfícies de Ti6Al4V ...	41

5.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	42
6.	DISCUSSÃO	44
7.	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O estudo com biomateriais mostra-se em crescente mundial. Isso se deve pela sua capacidade de interagir com os tecidos corporais e assim substituí-los parcialmente ou completamente. Um biomaterial se mostra como uma estrutura natural ou artificial e não farmacológica que apresenta aspectos morfológicos e favoráveis ao crescimento celular, como é caso do titânio e suas ligas (SARTORETTO *et al.*, 2015; TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021).

Mesmo apresentando condições propícias, os biomateriais são passíveis de contaminação com microrganismos em seus sítios, como é o caso do fungo *Candida albicans*. Esse processo se inicia com a adesão da levedura, seguindo para as etapas de proliferação de hifas e pseudohifas, formação de biofilme e dispersão de leveduras. Tais fatores são estão diretamente relacionados aos insucessos de implante (UPPULURI; PIERCE, 2009).

Sabe-se que o fungo *Candida albicans* tem afinidade pelo crescimento em superfícies de características hidrofóbicas (PONDE *et al.*, 2021) e que biomateriais como o titânio e a liga titânio-alumínio-vanádio (Ti6Al4V) podem se apresentar com tal padrão ou próximo disso (COUTINHO; ELIAS, 2009; HIERRO-OLIVA *et al.*, 2015) tornando-se propensos a instalação desse microrganismo.

O plasma atmosférico a frio é um gás ionizado desenvolvido em ambientes laboratoriais que apresenta capacidade de promover alterações em materiais (NASCIMENTO NETO *et al.*, 2015). Em sua composição observa-se as espécies reativas de oxigênio (ROS), como radical hidroxila (-OH), oxigênio atômico (O), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e Ozônio (O₃). Quando o CAP é direcionado sobre as superfícies, as ROS atuam melhorando seus aspectos hidrofílicos (molhabilidade) e podem bloquear a formação de biofilmes de microrganismos, como o *Candida albicans* (BRITO *et al.*, 2022).

A molhabilidade entre um líquido e uma superfície pode ser avaliada por análise do ângulo de contato que o líquido faz com essa superfície, enquanto que a inibição fúngica é comumente avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) (CHEN *et al.*, 2016; MAISCH *et al.*, 2012; MARMUR *et al.*, 2017).

Há relatos prévios que o ângulo de contato das superfícies que receberam o CAP são menores que as superfície que não receberam (Souza *et al.*, 2023). No entanto com o passar do tempo esse ângulo de contato tende a retornar ao seu estado normal (BERGER *et al.*, 2021).

Ainda não foram avaliados o tempo de manutenção do tratamento de CAP em superfícies metálicas previamente embaladas em grau cirúrgico. A inibição do biofilme de *Candida albicans* foi observada com a aplicação do CAP sobre elas em placas de ágar, sendo este protocolo comumente visto na literatura (KLÄMPFL *et al.*, 2012; MAISCH *et al.*, 2012; O'CONNOR *et al.*, 2014), no entanto seu efeito na prevenção de contaminação fúngica após tratamento de superfícies metálicas ainda não foi avaliado.

O presente trabalho buscou analisar a aplicabilidade do plasma atmosférico a frio para promover o aumento da molhabilidade em amostras da liga titânio-alumínio-vanádio previamente seladas em grau cirúrgico, além de sua capacidade em promover a redução do fungo *C. albicans* sobre as superfícies metálicas que previamente foram tratadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais metálicos

A pesquisa com biomateriais destaca-se atualmente a nível mundial. Tal fato ocorre pela sua capacidade de interliga-se com o organismo e assim substituí-los parcialmente ou completamente. Um biomaterial é uma estrutura natural ou artificial e de características não farmacêuticas que mostra aspectos anatômicos e biocompatíveis favoráveis ao desenvolvimento celular sobre eles. Biomateriais como o titânio e suas ligas vem se mostrando promissores por apresentar os aspectos citados neste parágrafo, bem como ser resistente a corrosão (OLIVEIRA *et al.*, 2010; PARITHIMARKALAINAN; PADMANABHAN, 2013; SARTORETTO *et al.*, 2015; TODROS; TODESCO; BAGNO, 2021).

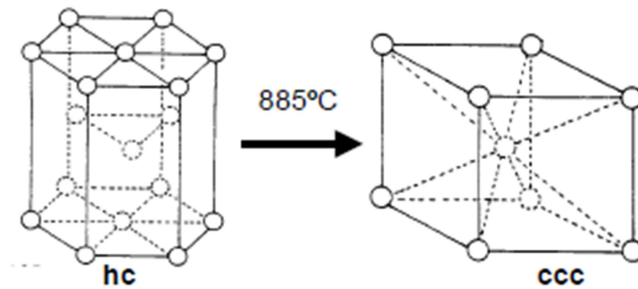
2.1.1 Titânio e suas ligas

Em 1791, Willian Gregor estudou a areia magnética e areia negra (FeTiO₃). Curiosamente ele decidiu retirar o ferro delas com um ímã, e após isso, tratá-las com ácido clorídrico chegando assim ao óxido de um novo elemento, antigamente nomeado por ele por mecanicista e hoje sendo denominado titânio. Quatro anos após grandioso feito o titânio também foi observado no rutilo (TiO₂) e cento e trinta e cinco anos após a honrosa descoberta finalmente o titânio migrou das prateleira laboratoriais e em fim chegou as indústrias (BARBOSA *et al.*, 2018).

O titânio (Ti) é o quarto material mais predominante na terra, ficando atrás somente do alumínio, ferro e magnésio. Atualmente é possível encontrar dois tipos de titânio: puro ou

suas ligas. Rotineiramente, o titânio puro apresenta-se com formato hexagonal, porém modifica-se para o aspecto cúbico quando atinge temperaturas superiores a 882°C (Figura 1) (SALIHU *et al.*, 2019).

Figura 1 - Imagem representativa do titânio nas fases hexagonal e cúbica. Ao atingir temperaturas superiores a 882°C a fase hexagonal do titânio modifica-se para cúbica.



Fonte: Alencar, 2002.

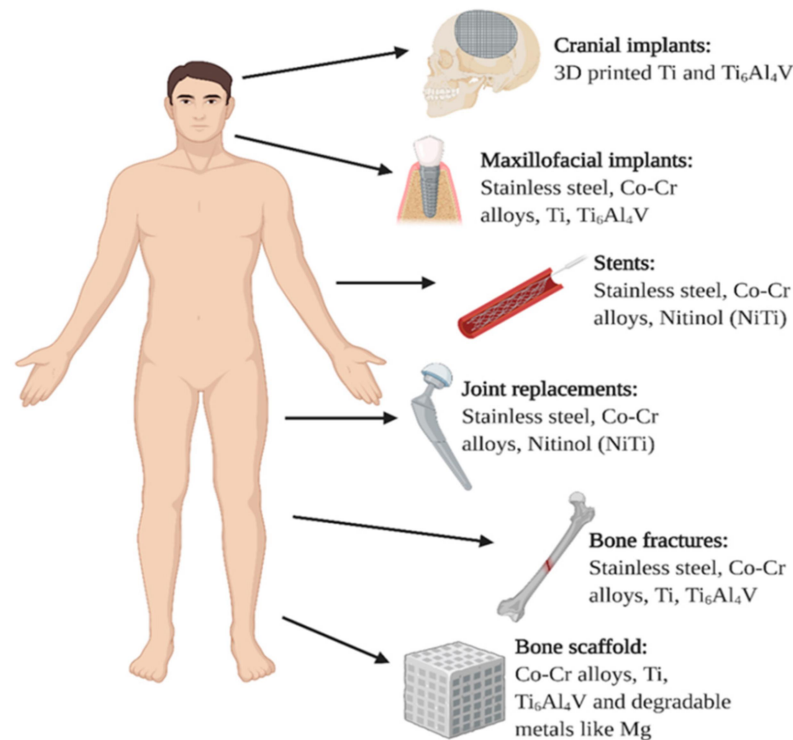
Ao observar suas propriedades, é possível encontrar no titânio pequena quantidade de ferro (Fe), oxigênio (O), nitrogênio (N), carbono (C) e hidrogênio (H). O oxigênio e o ferro tem um papel fundamental para o titânio, pois fornece a ele resistência contra possíveis deformidades (BAUER, 2007). Além disso, o titânio (Ti) possui uma alta capacidade de interagir com o oxigênio presente no ambiente. A sua ligação a ele tem capacidade de formar um filme extremamente aderente e contínuo sobre sua superfície, tornando-o altamente resistente a corrosões (ISHII; ODA; KANEKO, 2003).

Tradicionalmente no campo médico, o titânio é bastante utilizado sendo associado as suas ligas. A liga titânio – 6 alumínio – 4 vanádio (Ti6ALV4) apresenta-se em alta, pois quando comparada, por exemplo, a ligas de cobalto e aço inoxidável, a Ti6ALV4 encontra-se em vantagem por apresentar biocompatibilidade, leveza e alta resistência a corrosão, tornando-se essencial para o sucesso clínico, como por exemplo no o desenvolvimento de ossos e articulações artificiais e implantes dentários (AHMED *et al.*, 2014; JESUÍNO *et al.*, 2001; SALIHU *et al.*, 2019).

O sucesso da liga Ti6ALV4 se deve as capacidades do alumínio e o vanádio estabilizarem as denominadas fases alfa (α) e beta (β) presentes no titânio, tornando-se então uma fase denominada alfa + beta (nesta liga) podendo assim ser utilizada em temperatura ambiente e conferindo todas as propriedades mencionadas no parágrafo anteriormente citado

(ALENCAR, 2002; BAUER, 2007). A figura 2 elenca diversos biomateriais usados no campo médico, dentre os o Ti e a Ti6Al4V.

Figura 2 – Aplicabilidade dos biomateriais em diversas regiões do corpo, desde o crânio até o pé.



Fonte: Bencina et al., (2021).

2.2 Modificações de superfícies metálicas e seus benefícios

As modificações das superfícies metálicas surgem no campo da ciência com o intuito de promover benefícios ao organismo humano, desde sua biocompatibilidade ao ser implantado, até a melhora da energia de superfície, facilitação na adsorção de proteínas, recepção e desenvolvimento celular, adesão e total ancoragem, controle de microrganismos. Todos esses fatores agem em favor da osseointegração (ABREU *et al.*, 2021; MENDES; DAVIES, 2016; KLÄMPFL, et al., 2012).

Atualmente, o titânio mostra-se em alta para utilização na clínica médica, pois apresenta alta capacidade de biocompatibilidade e capacidade de se adequar a osseointegração (COSTA *et al.*, 2015). O titânio ainda pode ser tratado por diversas formas, como por ataque-ácido, jateamentos associados a ataque ácido e plasma. Todos esses métodos, quando usados sobre ele favorecem ainda mais a sua compatibilidade com os tecidos corporais (ABREU *et al.*, 2021).

O ataque-ácido quando realizado sobre o titânio tem a capacidade de melhorar a adesão de células ósseas e sua formação. Isso acontece porque as superfícies tornam-se rugosas, com um maior padrão de molhabilidade e aumentam a sua energia de superfície, o que são fatores de grandiosa importância para o processo de osseointegração (VELASCO-ORTEGA *et al.*, 2019).

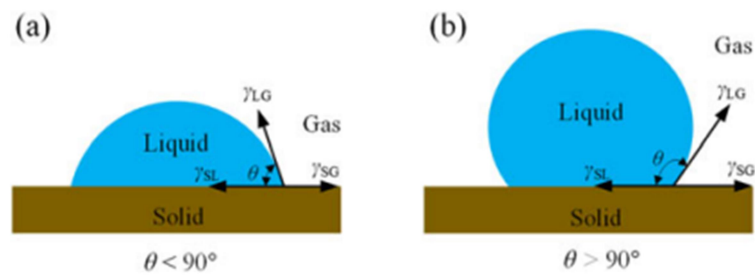
O jateamento associado ao ataque ácido também apresenta seus benefícios quando aplicados sobre o titânio. Ao atingir a superfície deste material, suas propriedades físico-químicas são alteradas. Nesse caso, a chegada da rugosidade e melhora na energia de superfície são pontos cruciais para a osseointegração. Tais fatores benéficos ocorrem pelo aumento da zona de contato (superfície-células ósseas), tornando assim a região jateada favorável ao crescimento ósseo. Apesar de sua atuação em superfícies, esta técnica requer alto custo e tempo para obtenção de sucesso (ABREU *et al.*, 2021; BASSI *et al.*, 2020).

O plasma, conhecido como o quarto estado da matéria e que pode ser gerado em ambientes laboratoriais apresenta-se como um grande método para promover uma melhora de biomateriais no campo médico. Suas ações, geradas pelo choque dos átomos com o oxigênio e o hidrogênio são promissoras, pois tem a capacidade de inativar bactérias, formar filmes finos sobre superfícies metálicas, além de modifica-las em condições favoráveis para o uso clínico (NASCIMENTO NETO, 2013; NISHIME, 2015). O tratamento por meio do plasma confere benefícios satisfatórios para estruturas como os biomateriais, pois tendo entrado em contato com eles terá a capacidade desinfetá-los, torna-los resistentes a corrosões (BRAZ, 2019) e melhorar a sua biocompatibilidade (JUNG *et al.*, 2010).

2.3 Molhabilidade

A capacidade de um líquido molhar determinado sólido é conhecida por molhabilidade. Isso significa que uma superfície pode atrair-se ou repelir-se ao meio hídrico. Essa capacidade de interação é comumente mensurada por meio do ângulo de contato, sendo esse caracterizado pela zona de interação sólido/líquido. Este ângulo pode ser classificado como de caráter superhidrofóbico ($> 150^\circ$), hidrofóbico ($> 90^\circ$), hidrofílico ($< 90^\circ$) (Figura 3) e superhidrofílica ($< 10^\circ$). Quanto maior o molhamento menor o ângulo de contato, indicando uma melhor hidrofiliabilidade da superfície (CHEN *et al.*, 2016; COUTINHO; ELIAS, 2009; DRELICH *et al.*, 2011; DRELICH; CHIBOWSKI, 2010; MARMUR *et al.*, 2017).

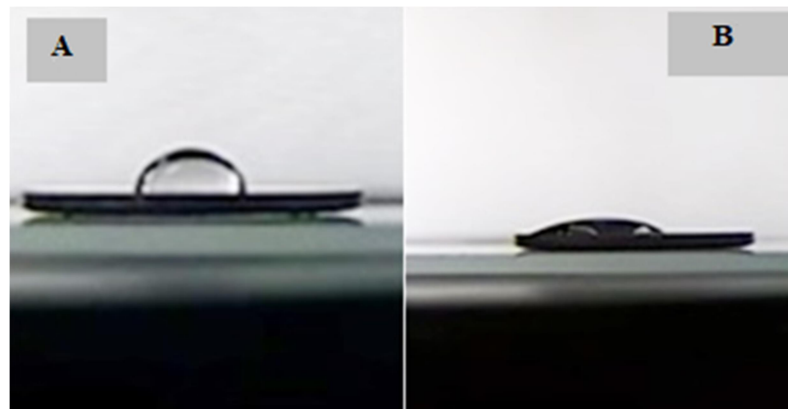
Figura 3 – Ângulo de contato das superfícies. A) Hidrofílica e B) Hidrofóbica.



Fonte: Chen *et al.*, (2016).

A literatura científica relata a importância da hidrofilicidade para sucessos clínicos como a clínica de implantes, uma vez que quanto maior a hidrofilicidade melhor a energia superficial do material. Tal fato repercute na formação de grupos funcionais com as hidroxilas (-OH), melhorando biocompatibilidades de células (DE SOUZA *et al.*, 2023) e reduzindo a contaminação de microrganismos como o fungo *Candida albicans*. O titânio e suas ligas são exemplos de materiais que podem melhorar a sua hidrofilicidade. O plasma atmosférico a frio se mostra como um método capaz de promover tal comportamento nessas superfícies (Figura 4) (JELIL, 2015; MAISCH *et al.*, 2012; TSUJITA *et al.*, 2021).

Figura 4 – Ângulo de contato sobre superfícies de titânio tratadas com plasma atmosférico a frio. A – superfície sem tratamento. B – superfície tratada.



Fonte: Autoria própria.

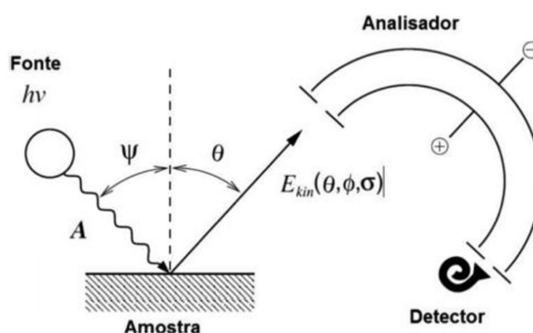
2.4 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raio – X (XPS)

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raio – X (XPS) é uma técnica comumente usada para a avaliação de uma superfície que baseia-se na interação de fótons com a matéria. Tal técnica foi primeiramente observada em 1894 pelo germânico Wilhelm Conrad Roentgen e consiste com a radiação eletromagnética originada da fonte de raios X que alcançam a superfície da amostra, repercutindo assim na ejeção de fotoelétrons, os quais são

selecionados através de um analisador (figura 5), que por final chegam ao detector e determinam assim a composição de uma superfície (NASCIMENTO-DIAS; ANJOS, 2021).

A técnica do XPS é comumente avaliada por meio de um gráfico, onde se observa um eixo horizontal expressado pela energia de ligação em elétrons-volts (eV) e outro vertical contendo a intensidade do pico de energia (BENIGNA, 2014). A partir daí é possível compreender a formação de estruturas elementares em um determinado material. Como exemplo de tal formação pode citar a ação do Plasma atmosférico a frio ao formar grupos hidroxilas sobre uma superfície metálica que recebeu suas espécies reativas de oxigênio (ROS). As hidroxilas são fundamentais para manter um material mais hidrofílico e reduzir a presença de microorganismos como *Candida albicans* (BENETOLI, 2011; JELIL, 2015; MAISCH et al., 2012).

Figura 5 - Ação do XPS sobre a amostra. A radiação eletromagnética alcança a amostra e promove a ejeção de elétrons para o analisador.



Fonte: (NASCIMENTO-DIAS; ANJOS, 2021).

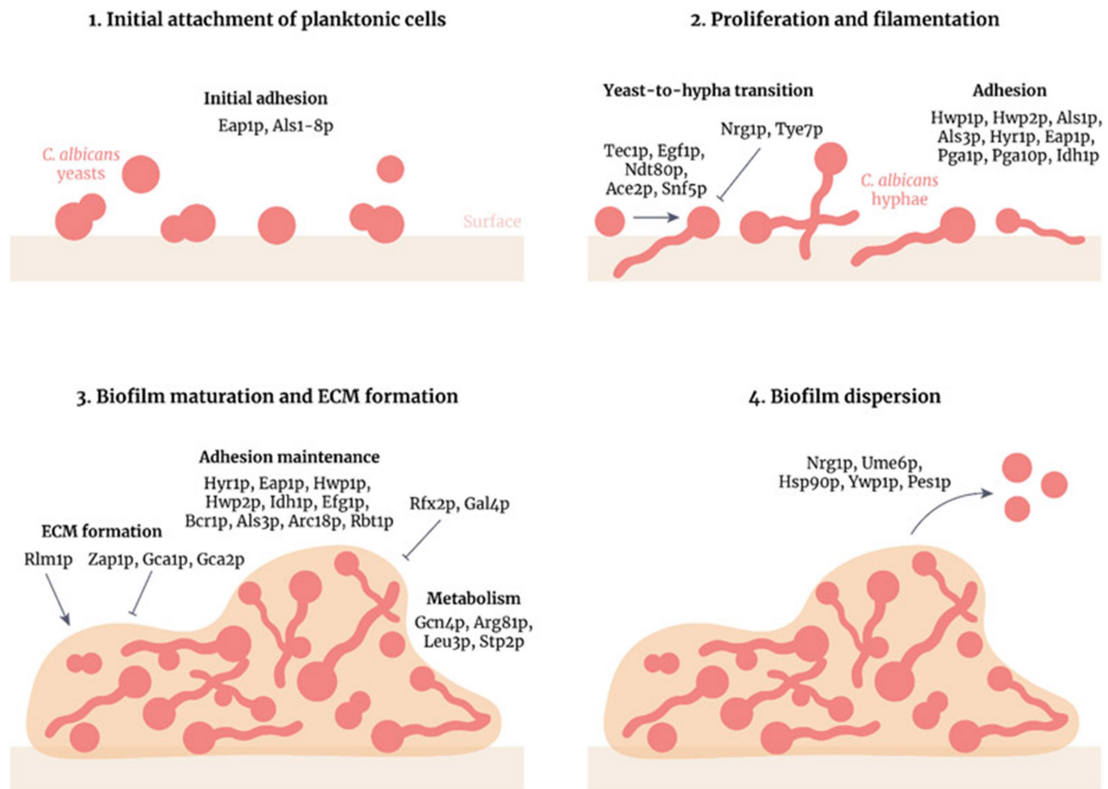
2.5 Fungo *Candida albicans* e suas implicações em biomateriais metálicos

Candida albicans é um fungo encontrado em diversas regiões do nosso corpo como boca, pele, sistema digestório e genital. Se em algum momento os mecanismos de defesa do nosso corpo estiverem fragilizados esse microrganismo crescerá de maneira anormal, repercutindo em uma doença chamada candidíase (ALTERATIONS et al., 2023; WANACHANTARARAK; SUANPOOT; NISOA, 2019).

Além das regiões corporais citadas, *Candida albicans* é um dos principais microrganismos capazes de crescer em superfícies abióticas, com o caso de implantes médicos. O seu desenvolvimento vai desde a migração da levedura até o material, seguindo para um processo de adesão, com proliferação de hifas e pseudohifas, formação de biofilmes e

dispersão celular (UPPULURI; PIERCE, 2009). A figura 6 esquematiza a ação deste microrganismo.

Figura 6 – Fase de adesão, proliferação e formação de biofilme e dispersão de *Cândida albicans*.



Fonte: Ponde et al., (2021).

Uma vez que formado o biofilme, esta levedura se torna extremamente nociva, pois se mostra bastante resistente a antifúngicos, promovendo riscos de toxicidade medicamentosa aos pacientes. Em muitas ocasiões torna-se necessária a substituição do implante, gerando assim riscos cirúrgicos (PONDE *et al.*, 2021). Levando em consideração os possíveis riscos citados por este autor, o plasma atmosférico a frio se apresenta como uma estratégia favorável para refrear este microorganismo evitando assim as possíveis complicações clínica citadas (EBRAHIMI-SHAGHAGHI *et al.*, 2021).

2.6 Osseointegração

Desde 1952, pesquisadores das universidades de Lund e Goteberg já observavam a capacidade de um osso regenerar-se após sofrer um trauma. De maneira ainda mais significativa, em 1960, Branemark observou que o osso fraturado, ao entrar em contato com o titânio, se aderiu a ele e conseguiu regenerar-se nesta região. Hoje, sabe-se que este processo se remete a osseointegração (JAYESH; DHINAKARSAMY, 2015; PARITHIMARKALAINAN; PADMANABHAN, 2013; VAIDYA *et al.*, 2017). Para que a

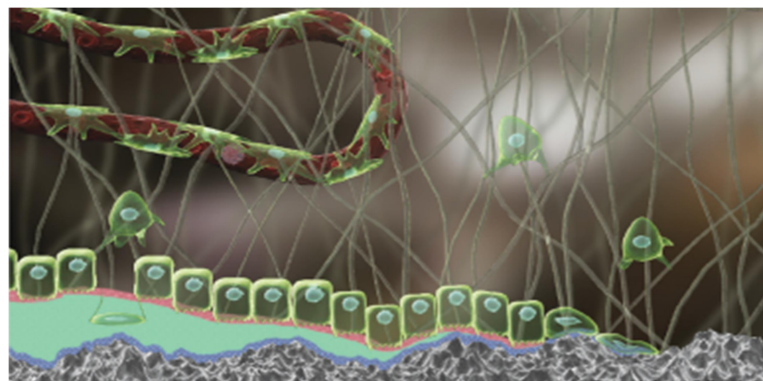
osseointegração aconteça com sucesso, é de suma importância que a mesma esteja livre de microrganismos como *Candida albicans*, uma vez que a chegada deste a sítios metálicos pode causar o processo de rejeição (UPPULURI; PIERCE, 2009).

A osseointegração pode ser definida como a ancoragem do tecido ósseo ao implante, de tal forma que se obtenha uma carga funcional. Para que essa conexão estrutural e funcional entre as células ósseas e a superfície aconteça de maneira significativa, fatores fisiológicos como a coagulação sanguínea no local do trauma, a angiogênese e presença de células perivasculares mostram-se como de suma importância (LIDDELL; AJAMI; DAVIES, 2017; MENDES; DAVIES, 2016).

A coagulação sanguínea ocorrerá como consequência da hecompatibilidade (interação entre o sangue e o implante). Este processo irá favorecer a adesão das plaquetas e trombogenicidade, bem como a ativação da cascata de coagulação seguida da ação do sistema completo, formando assim o coágulo, sendo ele de suma importância para as etapas subsequentes, como a formação de novos vasos sanguíneos (JAYESH; DHINAKARSAMY, 2015; REZENDE *et al.*, 2015).

A angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos se mostra como de suma importância para a osseointegração, pois é na periferia dos vasos onde se alojam as células peri-vasculares (Figura 7). São essas células que irão migrar até a superfície do implante e se diferenciar em osteoblastos secretoriamente ativos e assim produzir matriz óssea, iniciando assim o processo de adesão e ancoragem óssea presentes na osseointegração (MENDES; DAVIES, 2016).

Figura 7 – Angiogênese durante a osseointegração. Observar células perivasculares (cor verde) migrando dos vasos sanguíneos e diferenciam-se em osteoblastos sobre a superfície do implante. A partir daí se inicia o processo de osteogênese.



Fonte: Mendes; Davies, 2016.

Classicamente, o processo de osseointegração está dividido nas seguintes fases: osteocondução, formação óssea e remodelação óssea. A osteocondução refere-se à migração de células perivasculares antecessoras osteogênicas até a superfície do implante. Após sua chegada, elas se diferenciam em osteoblastos e inicia a secreção de matriz óssea. A formação óssea remete-se a composição do tecido ósseo, que é a matriz extracelular mineralizada de colágeno com presença de osteócitos. Os osteoblastos, antes de se diferenciar por inteiro, secretam matriz extracelular mineralizada sem a presença de colágeno denominada por linha cementante que irá ocupar a superfície do implante. Após a completa diferenciação osteoblástica, finalmente uma matriz extracelular mineralizada com colágeno será secretada sobre a linha cementante com consequente formação óssea. Por fim, a remodelação óssea remete-se a atividade osteoclástica seguida de ação osteoblástica, culminando na mineralização sobre a superfície do implante (MARCO *et al.*, 2005; MENDES; DAVIES, 2016).

Outros fatores de suma importância para que osseointegração aconteça é a biocompatibilidade e adsorção de proteínas. A biocompatibilidade refere-se ao implante fornecer condições ideais para que o crescimento e fixação óssea aconteçam. Das diversas amostras disponíveis no mercado, o titânio (Ti) e a liga titânio – 6 alumínio – 4 vanádio (Ti6AL4V) se apresentam como fundamentais para a osseointegração, pois demonstram boa resistência a corrosão, adequada rugosidade e hidrofiliabilidade, favorecendo assim adequado crescimento celular. A adsorção de proteínas refere-se a fixação de proteínas sobre o implante após o contato com fluídos fisiológicos. A adsorção de proteínas mostra-se de suma importância, desde a sua interação com as plaquetas até o processo de adesão, proliferação e diferenciação celular (HAO *et al.*, 2021; PARITHIMARKALAINAN; PADMANABHAN, 2013; REZENDE *et al.*, 2015). Vale salientar que para o sucesso clínico, é de suma importância que a mesma esteja livre de agentes invasores como *Candida albicans* (PONDE *et al.*, 2021).

2.7 Considerações gerais sobre o plasma

Em 1879, o inglês e graduado em física, Willian Crookes identificou o plasma pela primeira vez. Em 1929, Irving Langmuir foi ainda mais adiante quando enxergou o plasma como um gás ionizado (ALVES *et al.*, 2018).

Comumente um gás apresenta elétrons e íons livres. Se essas partículas estiverem em números significativos, haverá proximidade entre elas e consequentemente ocorrerão colisões

de tal forma em que haja uma reação coletiva, e como resultado, teremos a formação de um gás ionizado, como é o caso do plasma. Assim, o plasma pode ser definido como um ambiente composto por partículas carregadas e neutras que se comportam coletivamente (ALVES, 2018; BENETOLI, 2011).

O plasma é formado em descargas elétricas, na aurora boreal, nas estrelas, em nebulosas e ventos solares, mas também pode ser produzido em laboratório por meio de protótipos geradores de carga elétrica, com gás e direcionadores de fluxo (ALVES *et al.*, 2018).

2.8 Tipos de plasma

2.8.1 Plasma de baixa pressão

O plasma pode existir desde pressões muito baixas, como no espaço cósmico (10^{-10} torr), quanto altas pressões ($>10^3$ torr) (NISHIME, 2015). O seu gás ionizado é formado pela colisão entre os íons e elétrons. Como os elétrons possuem massa muito inferior às demais espécies, a temperatura do plasma dependerá da capacidade dos elétrons distribuir sua energia com as demais partículas. Geralmente, se a pressão é muito baixa, a frequência de colisão elétron-partícula é baixa e, assim, a diferença de energia dos elétrons será muito maior que do plasma. Se a pressão for alta, haverá maior frequência de colisão e, portanto, a energia cinética dos elétrons, ou temperatura do elétron, é aproximadamente igual à energia cinética média do plasma (FERREIRA, 2015). Assim, de maneira geral a temperatura do elétron é muito maior que a temperatura do plasma ($T_e > T_{\text{plasma}}$), para baixas pressões. Quando isso acontece dizemos que o plasma é frio.

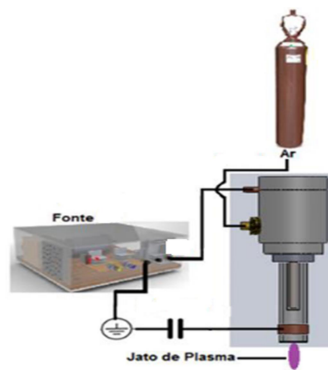
2.8.2 Plasma atmosférico a frio (CAP)

Nos últimos 25 anos começaram a surgir uma modalidade de plasma pouco convencional, denominado plasma atmosférico a frio (CAP). Esse tipo de plasma, apesar de estar em alta pressão, atende aos critérios acima de plasma frio, ou seja, $T_e > T_{\text{plasma}}$. A geração do mesmo deverá atender aos seguintes critérios: (a) suprimindo os “*streamers*” usando pulsos de tensão curtos (<10 ns); (b) usando descarga por barreira dielétrica; (c) utilizando altas taxas de fluxo de gás; (d) utilizando formatos especiais de eletrodo; (e) selecionando um gás apropriado. Atualmente, existem configurações que podem ser aplicadas ao plasma, e uma delas é a descarga por barreira dielétrica (DBD). Esta modalidade consiste em dois eletrodos metálicos, onde pelo menos um deles deve ser envolvido por uma camada

dielétrica. Vale salientar que para o plasma atmosférico funcionar estavelmente, o espaço entre os eletrodos deve ser milimétrico (ALVES JUNIOR, 2020).

Energeticamente, os estudos mostram que os plasmas são utilizados por meio de voltagens e frequências. As primeiras variam entre 5 e 40 Kv (NASCIMENTO NETO *et al.*, 2015), enquanto que as segundas podem chegar a 640 Hz (ALVES JUNIOR, 2020). A variação de tais parâmetros é benéficamente utilizada em inúmeros campos científicos, que varia desde a agricultura e segurança, até a medicina, como é o caso dos implantes metálicos em benefícios da osseointegração (CHOI; UHM; KAUSHIK, 2021). A figura 8 representa um modelo de CAP gerado em laboratório.

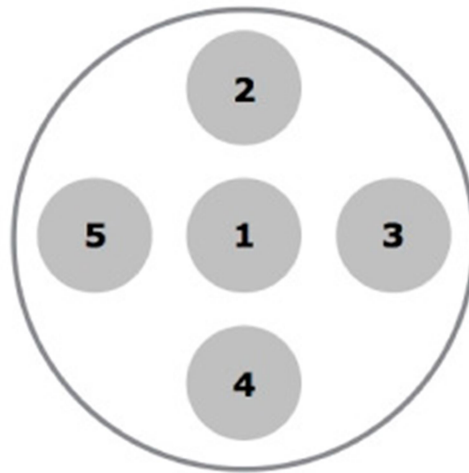
Figura 8 – Protótipo de plasma atmosférico a frio criado em laboratório ligado a uma fonte. Observa-se na figura: fonte de energia, cilindro de gás, tubo direcionador de fluxo e o jato de plasma.



Fonte: Adaptado de Nascimento et al., 2015.

Becker *et al.*, (2020) apresenta em sua publicação uma estratégia para aplicação do plasma atmosférico em uma superfície metálica. Com uma amostra de titânio localizada no centro do CAP, a varredura seguirá um formato de cruz, totalizando 5 pontos esquematizando-se da seguinte forma: Ponto 1 (centralizado); Ponto 2 (sobre o ponto 1); Ponto 3 (a direita do campo de visão do aplicador); Ponto 4 (inferior ao ponto 1); Ponto 5 (a esquerda do campo de visão do aplicador). A seguir, a figura 9 simplifica este caminho percorrido com o CAP pelo autor.

Figura 9 – Aplicação do CAP seguindo um processo de varredura por toda a amostra.

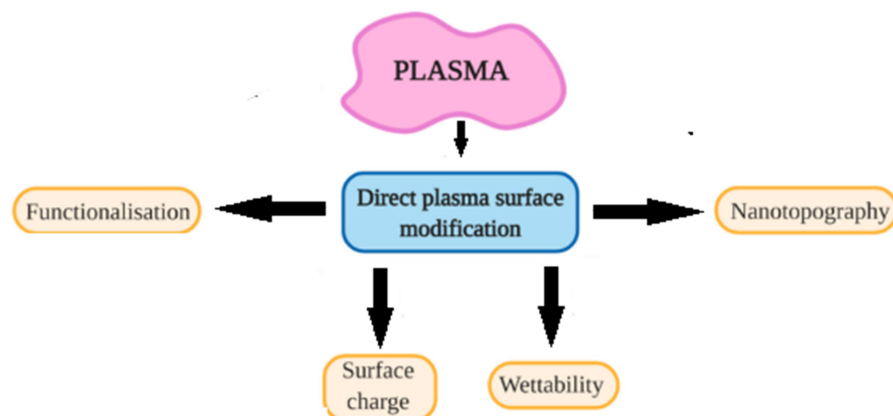


Fonte: Becker et al., (2020).

2.9 Efeito do CAP nas modificações em superfícies metálicas

O plasma quando direcionado a uma superfície metálica pode trazer a ela vários benefícios, que variam desde a promoção da rugosidade, hidrofiliabilidade, ao aumento da energia de superfície (Figura 10). Todos esses fatores favorecem para que os implantes tornem-se biocompatíveis (CHOI; UHM; KAUSHIK, 2021; MAISCH *et al.*, 2012; NASCIMENTO NETO *et al.*, 2015).

Figura 10 – Efeitos do plasma sobre superfícies.



Fonte: Adaptado de Bencina et al., (2021).

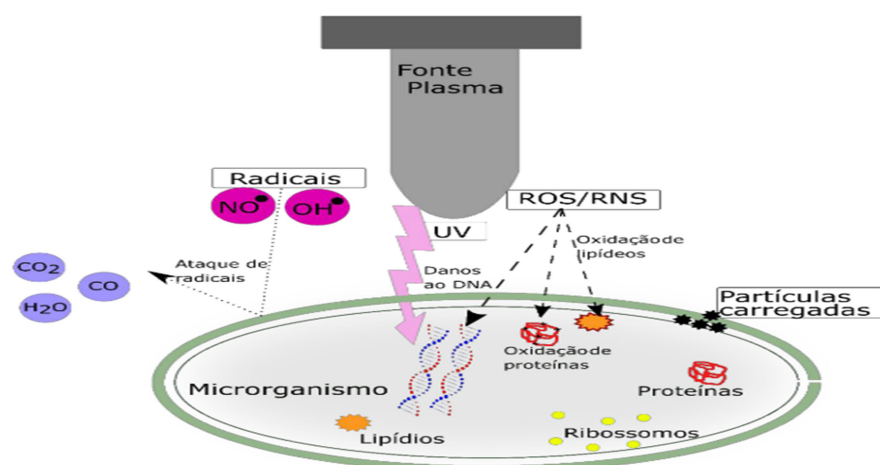
Quando o plasma incide numa superfície metálica, ele tem a capacidade de promover nanoestruturações, ou seja, promover rugosidades. As rugosidades são de suma importância em implantes como Ti6AlV4, pois influenciará diretamente na adesão, crescimento e

proliferação celular, fator de suma importância para uma significativa implantação (BENČINA *et al.*, 2021).

A aplicação do CAP em superfície de implantes altera a molhabilidade dos mesmos e, como consequência a hidrofiliabilidade. Tais fatores mostram-se como fundamentais para ações como adsorção de proteínas e aumento da energia de superfície, repercutindo assim em boas adesões celulares e inibição de leveduras. Como consequência positiva tem-se uma melhora da interação entre a célula, como por exemplo, a célula óssea e a superfície, favorecendo assim a uma regeneração óssea adequada pelo fato de se ter um material livre de microrganismos (BRANÝ *et al.*, 2020; KLÄMPFL *et al.*, 2012; REZENDE *et al.*, 2015; SHON *et al.*, 2014).

Bactérias, fungos e seus biofilmes mostram-se como fundamentais na interferência de uma plena implantação. O plasma a frio apresenta em sua composição radical hidroxila ($-OH$), oxigênio atômico (O), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e Ozônio (O_3), sendo em conjuntos denominados espécies reativas de oxigênio (ROS). Quando o CAP é aplicado sobre microrganismos, as ROS presentes nele apresentam ação bactericida e fungicida pela sua capacidade de romper suas paredes celulares. Como consequência, bactérias e fungos destruídos pelo plasma não evoluem com a formação de biofilmes e assim não interferem na funcionalização do implante (ALTERATIONS *et al.*, 2023; BENČINA *et al.*, 2021; BRITO *et al.*, 2022; JUNG *et al.*, 2010). A figura 11 mostra o efeito do Plasma sobre microrganismos.

Figura 11 – Efeitos das propriedades do plasma sobre microrganismos. O plasma quando direcionado tem a capacidade de danificar a parede celular, gerando danos ao conteúdo interno.



Fonte: Brito *et al.*, (2022).

2.10 A durabilidade do tratamento de superfícies

A durabilidade de uma superfície que recebeu algum tratamento é raramente investigada, porém é um fator muito importante para o campo médico, uma vez que a manutenção das suas propriedades físico-químicas são primordiais para possíveis interações (ATT *et al.*, 2009).

O estudo citado no parágrafo anterior demonstrou que o envelhecimento da superfície, ou seja, a perda da sua vida útil acontece ao longo de tempo. Nele, osteoblastos foram cultivados em superfícies de titânio tratadas com ataque ácido imediatamente após tal acontecimento, 3 dias depois, 2 semanas e 4 semanas após tratamento. Assim, foi observado que aspectos como capacidade de adsorção de proteínas e a migração, fixação, disseminação, proliferação e mineralização de osteoblastos diminuíram substancialmente em superfícies de titânio antigas.

BENČINA *et al.* (2021) demonstra que superfícies tratadas com plasma de revestimento também apresentaram envelhecimento. Uma ocorrência atribuída por ele a sobrevida das amostras é a exposição ao carbono atmosférico que fará com que aconteça o enfraquecimento da espécime tratada com o gás ionizado. Ele também cita que materiais armazenados em recipientes selados tendem a apresentar um envelhecimento retardado, porém não há relatos sobre a vida útil de ligas de titânio que foram seladas com papel de grau cirúrgico e tratadas com o plasma atmosférico a frio.

No que se refere ao envelhecimento, as superfícies metálicas estão vulneráveis a tal ocorrência, uma vez que, independente do plasma utilizado elas tendem a retornar ao seu estado normal devido aos hidrocarbonetos se infiltrarem nos sítios metálicos, reduzindo assim a resposta alcançada pelo plasma (BERGER *et al.*, 2021; PRYSIAZHNYI *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a capacidade do plasma atmosférico a frio sobre o aumento da hidrofilicidade e prevenção de contaminação fúngica em superfícies de Ti6Al4V previamente seladas em grau cirúrgico.

3.2 Específicos

- Caracterizar a molhabilidade em superfícies da liga Ti6Al4V tratadas e não tratadas pelo CAP.
- Analisar o tempo de envelhecimento do tratamento de CAP sobre superfícies metálicas da liga Ti6Al4V.
- Analisar a composição química das superfícies da liga Ti6Al4V tratadas pelo CAP.
- Analisar a adesão e o crescimento de cepas (ATCC 10231) de *Candida albicans* sobre superfícies da liga Ti6Al4V controle e tratadas pelo CAP seladas em grau cirúrgico.
- Compreender a influência do CAP sobre a prevenção de contaminação pelo fungo de cepas (ATCC 10231) de *C. albicans*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizados discos da liga titânio – 6 alumínio – 4 vanádio (Ti6AlV4). Os discos foram serão fornecidos pela empresa Titaniumfix A.S. Technology Componentes Especiais Ltda. Esta pesquisa utilizou o método de tratamento por plasma atmosférico a frio (CAP). Os discos foram tratados no Laboratório de Processamento de Plasma da UFERSA e selados em grau cirúrgico no Laboratório de tecnologias reprodutivas e inovações em modelo animal (TRIMA). Os discos foram às superfícies para o cultivo de cepas de *C. Albicans* (ATCC 10231) e avaliação da molhabilidade. O cultivo das cepas ocorreram no Laboratório de Microbiologia Veterinária (LAMIV).

4.1 Preparação dos discos de titânio

Neste trabalho foram utilizados 25 discos da liga Ti6Al4V com 9mm de diâmetro e 1mm de espessura. Inicialmente, os discos foram lixados de maneira gradual, com lixas de carbeto de silício (SiC) com diferentes granulometrias, 220, 400, 600, 1500 e 2000 MESH e polidas em solução coloidal 40% Sílica (0,03 μ) e 60% de peróxido de hidrogênio à 35%, durante 30 minutos. Após esse procedimento todas as amostras foram limpas por imersão dos discos na cuba de ultrassom em solução de 0,5% de detergente enzimático (DEIV), seguida pelo etanol absoluto e lavagem com água bidestilada. Cada lavagem durou 10 minutos. Depois de lavados e secos, os discos foram selados em grau cirúrgico. 20 discos foram destinados a realizar o tratamento a plasma CAP durante 15 minutos com uma distância de 20 ± 1 mm entre a amostra e a saída do plasma. Foram utilizados os seguintes parâmetros do plasma: Tensão de 13 kV, frequência de 600vHz e 1,5 L/min de hélio sobre as amostras. O tratamento com CAP foi aplicado em cinco pontos estratégicos nos discos selados em grau cirúrgico. Cada ponto recebeu um tempo de 3min de tratamento, realizando assim a varredura em toda a superfície do disco.

Para avaliação do efeito do CAP sobre a molhabilidade os discos selados em grau cirúrgico foram avaliados imediatamente após o tratamento (n=5), 1(n=5) dia, 3 (n=5) dias e 5(n=5) dias após o tratamento. 5 discos foram usados como grupo controle para fins de comparação. Para a realização da molhabilidade os discos foram retirados do grau cirúrgico somente nos seus respectivos dias de análise.

4.1.1 Caracterização das superfícies dos discos de titânio

A molhabilidade foi avaliada ao mensurar o ângulo formado por uma gota de 20 µL de água deionizada pipetada sobre as amostras que foram retiradas do grau cirúrgico somente em seus dias de análise. Através de captura da imagem com uma câmera de vídeo do goniômetro e foi possível captar as imagens da gota (BRAZ *et al.*, 2019). O software ImageJ foi utilizado para medir o ângulo de contato.

4.1.2 Composição química da superfície

O estado de elétrons na superfície da liga Ti6Al4V com e sem tratamento com CAP foi determinada através de espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) com uso de radiação Al K α (1486.6 eV) em uma estação Omicron-SPHERA. Os espectros de pesquisa foram adquiridos com uma resolução de 50 eV. Os espectros de alta resolução de regiões específicas foram adquiridos com uma resolução de 10 eV. O sinal C 1s do carbono adventício em 285 eV foi usado como uma referência de energia interna.

4.2 Preparo e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC's)

O preparo do inóculo foi realizado utilizando uma cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 10231) cultivada aerobicamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI, KASVI) a 37 °C em incubadora por 48 horas. Após incubadas, a suspensão foi ajustada em solução estéril de cloreto de sódio a 0,85% até atingir uma absorbância de 0,08 a 0,1, equivalente a uma concentração de 10⁶/mL (padrão de turbidez 0,5 da escala de McFarland), confirmado utilizando espectrofotômetro a 530 nm. Aliquotas de 500 µL da suspensão de *C. albicans* foram, em seguida, inoculadas sobre os corpos de prova tratados em grau cirúrgico (n=7) e não tratados em grau cirúrgico (controle, n=7), dispostos em uma placa estéril de 24 poços, seguido de incubação aerobicamente por 90 minutos (fase de adesão) a 37 °C (PONDE *et al.*, 2021). Posteriormente, a suspensão foi retirada de cada poço e estes gentilmente lavados duas vezes com solução salina (0,85%) estéril para remover células não aderentes. 10 amostras foram submetidas à sonicação em 9ml solução de NaCl (0,85%) (diluição 10⁻¹) para desprender as células leveduriformes aderidas e em seguida a suspensão obtida foi submetida a diluição seriada até 10⁻⁶. De cada diluição, foram inoculadas microgotas de 10 µL, em duplicata, sobre placas contendo Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol, as quais foram incubadas por 48 horas à 37 °C. Foi então realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) das diluições de 10⁻² e 10⁻³, seguida de média, sendo os dados expressos em UFC/mL.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Discos de Ti6Al4V somente polidos e tratados com CAP, após inoculação e incubação com cepas de *C. albicans*, conforme descrito acima, foram embebidos em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato pH 7,4 em temperatura ambiente durante 2 horas para fixação celular, seguida de pós-fixação com tetróxido de ósmio por 1 hora. Por conseguinte, foi realizada lavagem com água destilada e desidratação em uma série de etanol em concentrações crescentes (25, 50 e 75%) durante 20 min cada e em etanol absoluto durante 60 min. Após a desidratação, as amostras foram metalizadas com filme de ouro 9nm para permitir a visualização no microscópio eletrônico de varredura (SEM-SSX 550 Superscan, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão). Ao MEV foram realizadas 6 imagens por amostra - 3 campos em aumento de x1000 e 3 em aumento de x2000 - sendo a contagem de pseudo-hifas realizada manualmente na magnitude de x2000 por um de nossos colaboradores e confirmada por dois pesquisadores independentes às cegas.

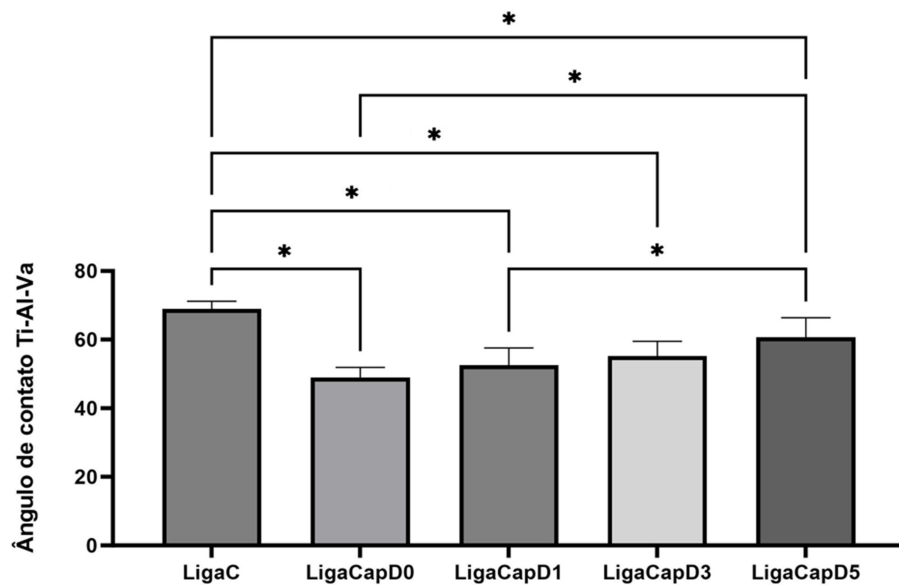
4.4 Análise Estatística

Os dados da molhabilidade foram submetidos à análise de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Após encontrada a presença de normalidade realizou-se à análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey's. O teste T foi realizado para o grupo controle e tratado das amostras que receberam a inoculação de *Candida Albicans*. Para essas análises foi utilizando software GraphPAD prism versão 10.1.

5. RESULTADOS

Os ângulos de contato das superfícies da liga titânio-alumínio-vanádio tratadas com CAP seladas em grau cirúrgico se apresentaram significativamente menores em relação ao grupo controle selado em grau cirúrgico (Figura 12).

Figura 12 - Ângulo de contato nas superfícies de Ti6Al4V tratadas com plasma atmosférico a frio, imediatamente após tratamento (D0), 24 horas depois (D1), 72h (D3) e 120h (D5).

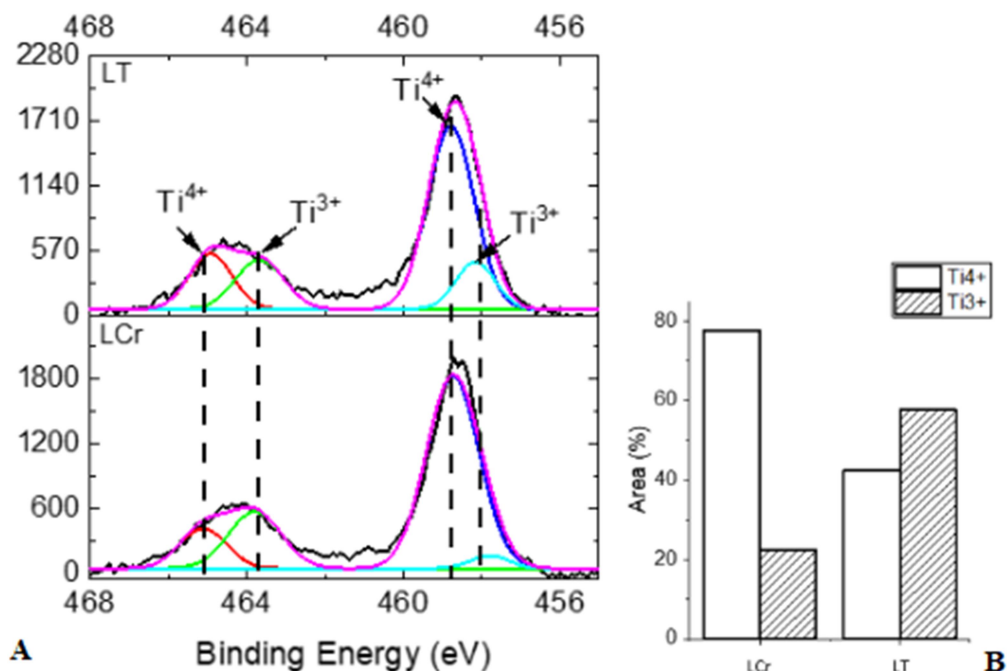


5.1 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-x (XPS) em amostras da liga titânio-alumínio-vanádio

5.1.1 Efeito do CAP sobre o processo de oxidação da Liga Ti6Al4V

Nas representações gráficas dos resultados do XPS observa-se a capacidade do plasma atmosférico a frio promover a oxidação das amostras da liga titânio-alumínio-vanádio seladas em grau cirúrgico. De uma maneira geral, nota-se que a exposição das amostras da Liga Ti6Al4V ao CAP promoveu a oxidação na composição do titânio que em seu estado normal se mostrava como $Ti4^{+}$ e que após tratamento reduziu para $Ti3^{+}$, resultando em um processo de oxidação (Figura 13).

Figura 13 - Análise de XPS de superfícies de Ti6Al4V tratadas por CAP. A – Curvas da análise. B – Histogramas representativos da quantificação da área de Ti.

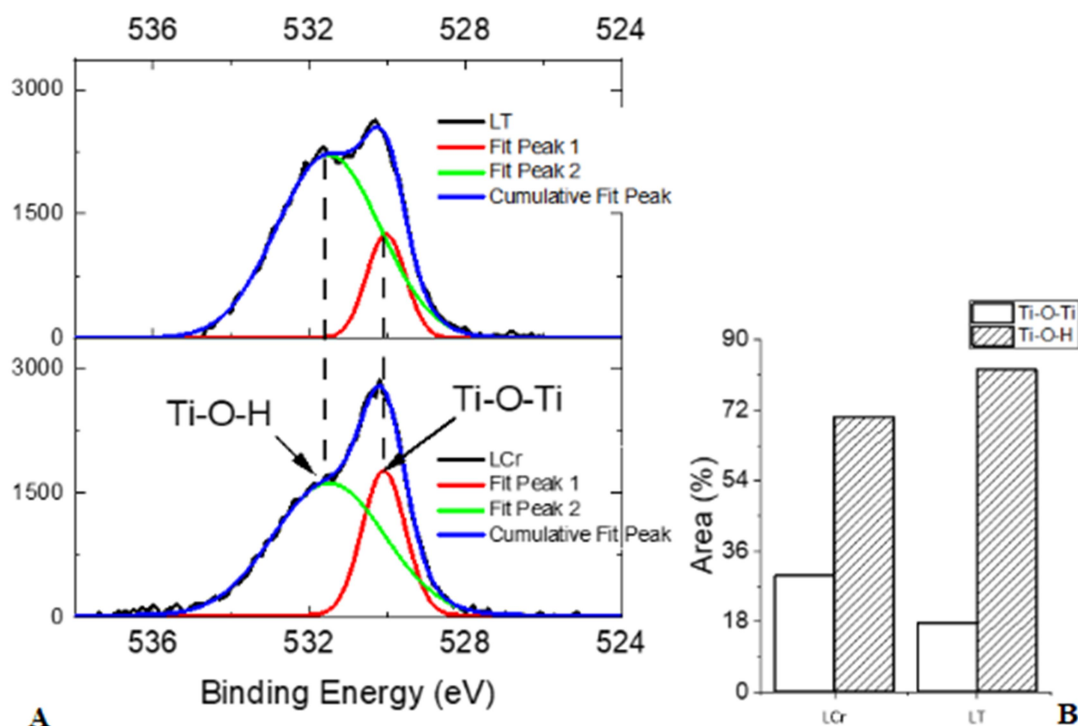


5.1.2 Efeito do plasma sobre as quebras de ligações e formação de novos grupos funcionais

As figuras representativas da análise de XPS evidenciaram a ação do plasma atmosférico a frio sobre amostras da Liga Ti6Al4V seladas em grau cirúrgico promovendo quebra de ligações e formação de novos grupos funcionais.

Observa-se que a interação do CAP com a superfície da amostra citada promoveu a quebra de Ti-O-Ti, liberando radicais livres que puderam interagir com umas das espécies reativas do plasma, que é a hidroxila. Tal contato resultou em picos dos grupos Ti-O-H que se perduraram como energéticos nas amostras que receberam a intervenção plasmática (Figura 14).

Figura 14 – Análise de XPS de superfícies de Ti6Al4V tratadas por CAP. A – Curvas da análise. B – Histogramas representativos da quantificação da área dos grupamentos formados.



5.2 Crescimento de cepas (ATCC 10231) de *C. albicans* sobre superfícies de Ti6Al4V

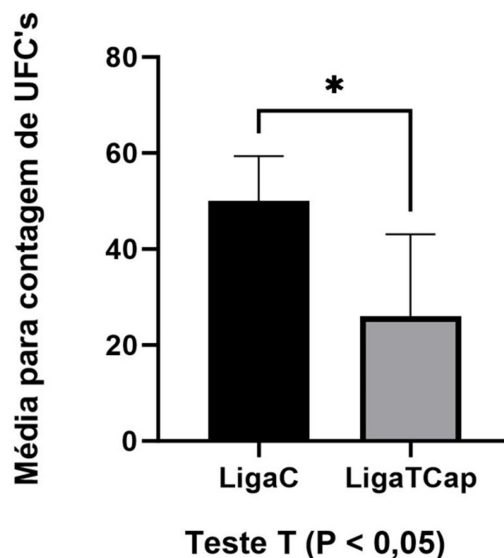
Na tabela 1 verifica-se a média e desvio padrão para UFC's de *Candida albicans* em amostras previamente seladas em grau cirúrgico da liga de titânio-alumínio-vanádio controle e tratadas com plasma atmosférico (CAP).

Tabela 1 – Média e desvio padrão (DP) da contagem expressa em unidade formadora de colônia (UFC) de *Candida albicans* ATCC 10231 aderidas sobre superfícies de Ti6Al4V controle (LC) e tratadas com plasma atmosférico a frio (LiCap)

	Contagem média $\pm$ DP
LC	50000 $\pm$ 9,35
LiCAP	26000 $\pm$ 17,10

Nota-se na tabela acima uma redução significativa na contagem de UFC das amostras que receberam o bombardeio do plasma em relação aquelas do grupo controle ($p < 0,05$). A significância foi confirmada pelo teste T (Figura 15).

Figura 15 - Contagem de UFC de cepas (ATCC 10231) de *Candida albicans* sobre superfícies de Ti6Al4V tratadas (LigaTcap) ou não (LigaC) com plasma atmosférico a frio.



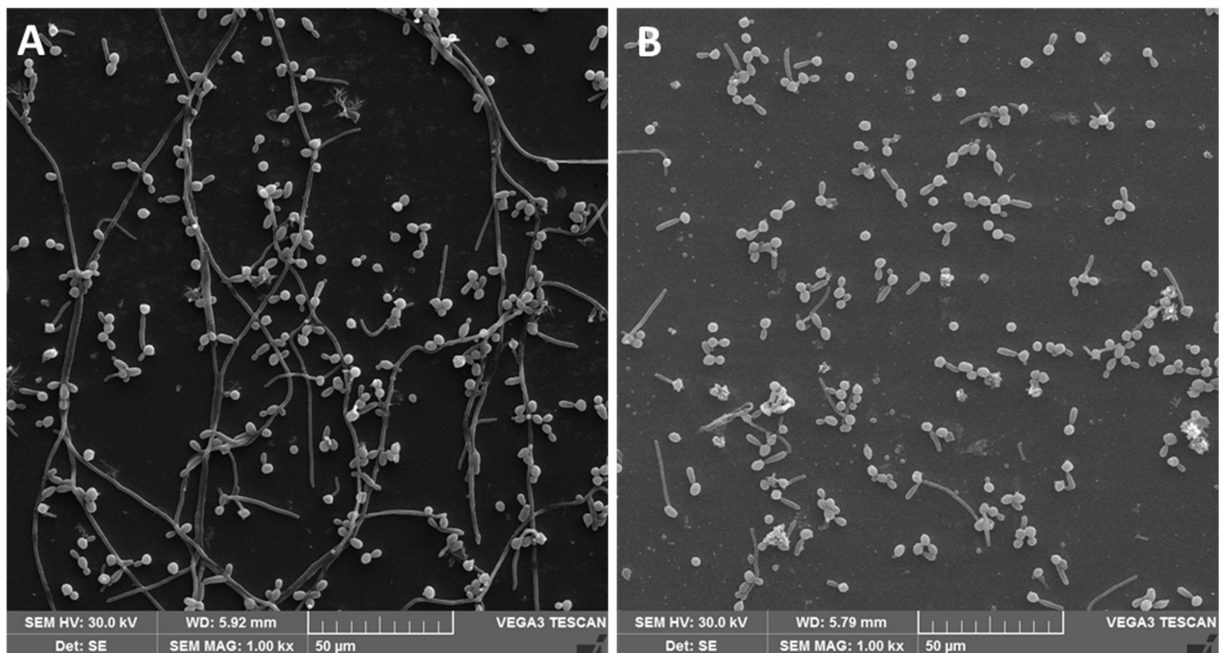
5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na análise morfológica ao MEV (figura 16), observou-se que mesmo as leveduras aderidas tiveram sua capacidade de ativação reduzida na liga tratada pelo CAP, evidenciado pela redução no número de pseudohifas formadas (tabela 2) bem como redução de agregados leveduriformes.

Tabela 2 - Número de pseudohifas (média $\pm$ desvio padrão) formadas sobre superfícies de Ti6Al4V tratadas com plasma atmosférico a frio.

Amostras	Média/Campo	Média Geral e DP
LigaC1	31,6 $\pm$ 22,50	27,66 $\pm$ 16,31
LigaC2	23,6 $\pm$ 10,50	
LigaCAP1	12,6 $\pm$ 1,15	13,17 $\pm$ 3,31
LigaCAP2	10,6 $\pm$ 5,03	

Figura 16 - Morfologia de *C. albicans* sobre as superfícies de Ti6Al4V controle (A) e tratadas com CAP (B).



6. DISCUSSÃO

No presente trabalho demonstrou-se a capacidade do plasma atmosférico a frio para promover melhora na molhabilidade em superfícies de Ti6Al4V seladas em grau cirúrgico. Os ângulos de contato das amostras tratadas se mantiveram significativamente menores por até cinco dias após o tratamento. Além disso, este estudo também evidenciou a sua capacidade de prevenir o crescimento e formação de pseudohifas de cepas do fungo *Candida albicans* depositados sobre superfícies de Ti6Al4V tratadas em grau cirúrgico. A relação entre a molhabilidade da liga Ti6Al4V e a redução fúngica também deve ser levada em consideração, uma vez que as amostras que se apresentaram com melhor hidrofilicidade juntamente exibiram menor UFC's.

Segundo Leite *et al.*, (2020), a molhabilidade é capacidade do líquido molhar o sólido, a qual é medida através do ângulo de contato do líquido com a superfície do material. A estratégia mais frequente para se aplicar esta variável visa atuar em amostras com suas superfícies lisas, e a gota séssil é uma delas (GITTENS *et al.*, 2013). No presente trabalho, as amostras de Ti6Al4V foram produzidas e polidas ao ponto de apresentarem suas superfícies lisas, permitindo assim a avaliação da molhabilidade por meio de gota séssil.

A molhabilidade pode ser avaliada pelo o ângulo de contato, sendo este último definido como o ângulo formado na zona de interação sólido/líquido (MARMUR *et al.*, 2017). Conforme Chen *et al.*, (2016) este ângulo pode ser de caráter superhidrofóbico ($> 150^\circ$), hidrofóbico ($> 90^\circ$), hidrofílico ($< 90^\circ$) e superhidrofílico ($< 10^\circ$). Quanto maior o molhamento menor o ângulo de contato, indicando uma melhor hidrofilicidade da superfície (COUTINHO; ELIAS, 2009). No presente trabalho, todas as amostras da liga Ti6Al4V apresentaram-se com padrão hidrofílico ($< 90^\circ$), no entanto o tratamento com CAP nas amostras seladas com grau cirúrgico foi capaz de potencializar essa molhabilidade, com ângulos de contato em média de $48,9^\circ$ para amostras logo após o tratamento.

O tratamento com CAP mostrou sua capacidade para promover o aumento da hidrofilicidade nas amostras de Ti6Al4V seladas em grau cirúrgico até o quinto dia após sua intervenção. A manutenção da hidrofilicidade destas amostras se mostra primordial para manutenção de sua vida útil bem como para torna-la livre de microrganismos. Também se observou em relação ao tratamento com CAP, que, com o passar do tempo o ângulo de contato das amostras que receberam tratamento tendem a aumentar, gerando assim um padrão

de envelhecimento, no entanto até cinco dias esses ângulos foram significativamente menores que as superfícies controle.

No que se refere ao envelhecimento, as superfícies metálicas estão vulneráveis a tal ocorrência, uma vez que, independentemente do plasma utilizado elas tendem a retornar ao seu estado normal devido aos hidrocarbonetos se infiltrarem nos sítios metálicos, reduzindo assim a resposta alcançada pelo plasma (BERGER *et al.*, 2021). BENČINA *et al.*, (2021) também demonstraram este fato e complementa que esta ocorrência é retardada quando os materiais são armazenados em ambientes selados. Nesta dissertação, observou-se que o envelhecimento das amostras de Ti6Al4V tratadas com CAP e seladas em grau cirúrgico ocorreram com o passar do tempo, no entanto as superfícies se mantiveram mais hidrofílicas que o controle até o quinto dia após tratamento.

O plasma atmosférico a frio (CAP) é uma modalidade de plasma de baixa temperatura e do tipo não térmico. A geração do seu meio acontece em ambientes laboratoriais onde são desenvolvidas estratégias para produzir este gás com características ionizadas, dentre elas tem-se os protótipos capazes de gerar este meio (BÁRDOS; BARÁNKOVÁ, 2010; NASCIMENTO NETO *et al.*, 2015; NISHIME, 2015). O CAP apresenta em sua composição as espécies reativas de oxigênio (ROS), como radical hidroxila (OH) e Ozônio (O₃) (ANUNTAGOOL *et al.*, 2023; DOMONKOS *et al.*, 2021; SCHOLTZ *et al.*, 2015). Quando direcionado a uma superfície metálica pode trazer a ela vários benefícios, que variam entre a promoção da rugosidade, hidrofiliabilidade, melhora da energia de superfície, e bloqueio na formação biofilmes. Todos esses fatores favorecem para que os implantes tornem-se biocompatíveis (ALVES JUNIOR, 2020; CHOI; UHM; KAUSHIK, 2021; NASCIMENTO NETO *et al.*, 2015).

Ao atingir uma superfície, o plasma atmosférico a frio tem a capacidade de quebrar suas ligações, gerando radicais livres, que por sua vez interagem com o CAP formando novos grupos funcionais, como as hidroxilas (-OH) que são fundamentais para melhorar a energia superficial de um material, repercutindo diretamente em aspectos como melhora da molhabilidade e redução de microrganismos (BENETOLI, 2011; JELIL, 2015; MAISCH *et al.*, 2012).

O tratamento com CAP realizado no presente estudo sobre as amostras de Ti6Al4V seladas em grau cirúrgico foi capaz de aumentar a molhabilidade destas superfícies através da formação dos seus grupos funcionais (hidroxilas), além de mantê-las por até cinco dias após

tratamento. Desta forma, o CAP mostra-se de suma importância para preservação de um meio mais hidrofílico nestas superfícies, tornando mais funcionais e livres de microrganismos.

Candida albicans é um dos principais microrganismos capazes de crescer em superfícies abióticas, como é o caso de implantes médicos. O seu desenvolvimento vai desde a migração da levedura até o material, seguindo para um processo de adesão, com proliferação de hifas e pseudohifas e formação de biofilmes (UPPULURI; PIERCE, 2009). Tal fato se torna de grande risco, uma vez que formado o biofilme, esta levedura se mostra bastante resistente a antifúngicos, sendo muitas vezes necessária a substituição do implante (PONDE *et al.*, 2021). Ainda segundo Ponde e cols (2021) a formação de biofilme sobre superfícies de implantes predispõe esses pacientes a riscos cirúrgicos relacionados a osteomielite e de toxicidade medicamentosa, com uso prolongado de antifúngicos. No presente trabalho, o plasma atmosférico a frio se apresentou como uma fonte favorável para refrear a adesão e crescimento desses microrganismos, evitando assim as possíveis complicações clínicas citadas.

Estudos prévios realizados por Maisch *et.*, (2012), Klampfl *et al.*, (2012) e Brun *et al.*, 2012 demonstraram o efeito da aplicação direta do CAP sobre biofilmes de *C. Albicans*, no entanto, o presente estudo é pioneiro em demonstrar que o tratamento de superfícies de Ti6Al4V previamente seladas em grau cirúrgico que receberam tratamento com CAP a 13Kv e 600Hz, em fluxo de gás hélio 1,5 litros min. durante 15 min, foi capaz de inibir a adesão e o crescimento de cepas de *Candida albicans* incubadas sobre as superfícies.

Por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível observar a ação do CAP sobre *C. albicans*, evidenciando sua eficácia na redução deste fungo. Segundo Ponde *et al.*, (2021), este microrganismo tem afinidade por crescer em materiais de características mais hidrofóbicas, fato esse comprovado pela contagem de UFC's nas amostras controle que não receberam o plasma. Em contrapartida, aquelas espécimes que foram tratadas com CAP apresentaram um menor número na contagem de colônias. Tal fato se deve as propriedades do plasma em interagir com as superfícies e formar grupos hidroxilas (-OH) que promovem uma melhor hidrofilicidade deste material e consequente redução fungica (JELIL, 2015; MAISCH *et al.*, 2012; TSUJITA *et al.*, 2021).

A MEV realizada no presente estudo mostrou a eficácia do plasma ao reduzir a média de pseudohifas nas amostras que receberam sua intervenção. Tal achado evidencia sua

importância ao promover um ambiente mais hidrofílico e assim reduzir a adesão e consequente crescimento deste microrganismo sobre as superfícies de Ti6Al4V.

A formação dos grupos hidroxilas (-OH) sobre as amostras da liga Ti6Al4V deste trabalho foram observadas através da espectroscopia de foto elétrons excitados por raio-X, onde a interação do CAP com as superfícies citada promoveu a quebra de Ti-O-Ti, liberando radicais livres que puderam interagir com umas das propriedades do plasma, que é a hidroxila. Tal contato resultou em picos dos grupos Ti-O-H que se perduraram como energéticos nas amostras que receberam a intervenção plasmática. Além do efeito de molhabilidade do CAP aqui citado, Ademais, os ROS do plasma atmosférico a frio apresentam êxito sobre esta levedura também quando promove dano em sua parede celular (ALTERATIONS *et al.*, 2023).

7. CONCLUSÕES

As análises do presente estudo evidenciaram os benefícios do plasma atmosférico a frio sobre o aumento da hidrofilicidade das amostras da liga Ti6Al4V além de sua capacidade para reduzir a adesão e crescimento do fungo *C. albicans* sobre as superfícies tratadas. Dessa forma, conclui-se que:

- As amostras de Ti6Al4V seladas em grau cirúrgico e tratadas com CAP apresentaram-se mais hidrofílicas que aquelas do grupo controle;
- À medida que os dias passaram as amostras de Ti6Al4V seladas em grau cirúrgico e tratadas com CAP apresentaram envelhecimento do tratamento, evidenciado pela redução da sua hidrofilicidade. No entanto, as superfícies se mantiveram mais hidrofílicas que as controle até pelos menos o quinto dia após tratamento;
- A formação dos grupos hidroxilas e a oxidação do Ti mostraram-se de suma importância para o aumento da molhabilidade e redução fúngica nas amostras da Liga Ti6Al4V;
- A morfologia das superfícies seladas em grau cirúrgico e tratadas por plasma mostrou-se com menor colonização fúngica em relação as do grupo controle;
- O tratamento com CAP sobre as amostras de Ti6Al4V seladas em grau cirúrgico foi capaz de prevenir o crescimento de cepas do fungo *C. albicans*.
- A melhoria da hidrofilicidade relaciona-se com a redução do fungo *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, E. C. R. de; MACEDO, D. S. de; PEJÃO, S.; COSIMATO, P. L.; SENDYK, W. R.; MARÃO, H. F.; PIMENTEL, A. C. Tratamentos de superfícies de implantes de titânio e zircônia: Revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, p. e37810918197, 2021.
- AHMED, Y. M.; SALLEH, K.; SAHARI, M.; ISHAK, M.; KHIDHIR, B. A. Titanium and its Alloy. v. 3, n. 10, p. 1351–1361, 2014.
- ALENCAR, A. Estudo das modificações na superfície do Ti cp titânio comercialmente puro e da liga Ti-6Al-4V usados como biomateriais utilizando-se deposição por plasma spray. **Unesp**, p. 71, 2002.
- ALTERATIONS, B.; ROVETTA-NOGUEIRA, S. D. M.; BORGES, A. C.; OLIVEIRA, D.; KOGA-ITO, C. Y. Helium Cold Atmospheric Plasma Causes Morphological and. 2023.
- ALVES JUNIOR, C. **Plasma frio atmosférico – novas oportunidades de pesquisa numa plataforma versátil e portadora de futuro**Revista **Materia**Laboratório de Hidrogênio, Coppe - Universidade Federal do Rio de Janeiro, em cooperação com a Associação Brasileira do Hidrogênio, ABH2, 11 dez. 2020. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/rmat/a/n3GFS3PR8DK9C8SjVNWKqzr/?lang=pt>>. Acesso em: 14 ago. 2022.
- ALVES, D. P.; PINHEIRO, C. J. G.; MOISES, C. R.; PASSAMAI, J. L.; MELO, D. C. A. Gerador de Plasma Frio de Baixo Custo. *Blucher Proceedings*, v. 3, 2018.
- ANUNTAGOOL, J.; SRANGSOMJIT, N.; THAWEEWONG, P.; ALVAREZ, G. A review on dielectric barrier discharge nonthermal plasma generation, factors affecting reactive species, and microbial inactivation. **Food Control**, v. 153, n. May, p. 109913, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109913>>.
- ATT, W.; HORI, N.; TAKEUCHI, M.; OUYANG, J.; YANG, Y.; ANPO, M.; OGAWA, T. Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity: An implication of biological aging of implant materials. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5352–5363, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.040>>.
- BARBOSA, L. W. G.; GUIMARÃES, M. C. R.; TAVARES, R. P.; HASSUI, A.; DINIZ, A. E. Usinabilidade do titânio e suas ligas : uma revisão teórica. n. November, p. 6, 2018.
- BÁRDOS, L.; BARÁNKOVÁ, H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 23, p. 6705–6713, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2010.07.044>>.
- BASSI, M. A.; LOPEZ, M. A.; CONFALONE, L.; GAUDIO, R. M.; LOMBARDO, L.; LAURITANO, D. **Enhanced Reader.pdf**Nature2020.
- BAUER, J. R. D. O. Propriedades mecânicas do titânio comercialmente puro e da liga Ti-6Al-4V fundidos em diferentes ambientes. p. 62, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23140/tde-02012008-153128/>>.

BENČINA, M.; RESNIK, M.; STARIČ, P.; JUNKAR, I. Use of plasma technologies for antibacterial surface properties of metals. **Molecules**, v. 26, n. 5, 2021.

BENETOLI, L. O. de B. Desenvolvimento e aplicação de reator de plasma frio na degradação do corante azul de metileno em meio aquoso. 2011. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/95044>>.

BECKER, M. et al. Single-cell adhesion of human osteoblasts on plasma-conditioned titanium implant surfaces in vitro. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 109, p. 8, 2020.

BERGER, M. B.; BOSH, K. B.; COHEN, D. J.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Benchtop plasma treatment of titanium surfaces enhances cell response. **Dental Materials**, v. 37, n. 4, p. 690–700, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.01.026>>.

BENIGNA, J. Photoelectron Spectroscopy in Advanced Placement Chemistry. *Journal of Chemical Education*, v. 91, p. 1299–1305, 2014.

BRANÝ, D.; DVORSKÁ, D.; HALAŠOVÁ, E.; ŠKOVIEROVÁ, H. Cold atmospheric plasma: A powerful tool for modern medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, 2020.

BRITO, A. C.; SILVA, L. D. da; VIANNA, P. C. B.; PAIVA, A. D.; GONÇALVES, L. D. dos A.; NAVES, E. A. A. Estudo da tecnologia de plasma frio por meio da utilização do software VOSviewer. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e24211528107, 2022.

BRUN, P.; BRUN, P.; VONO, M.; VENIER, P.; TARRICONE, E.; DELIGIANNI, V.; MARTINES, E.; ZUIN, M.; SPAGNOLO, S.; CAVAZZANA, R.; CARDIN, R.; CASTAGLIUOLO, I.; LA GLORIA VALERIO, A.; LEONARDI, A. Disinfection of ocular cells and tissues by atmospheric-pressure cold plasma. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

CHEN, F.; XU, W.; HUANG, S.; LIU, J.; SONG, J.; LIU, X. Plasma Hydrophilization of Superhydrophobic Surface and Its Aging Behavior: The Effect of Micro/nanostructured Surface. **Surface and Interface Analysis**, v. 48, n. 6, p. 368–372, 2016.

CHOI, E. H.; UHM, H. S.; KAUSHIK, N. K. **Plasma bioscience and its application to medicineAAPPS Bulletin**2021.

COSTA, L. J. da; SOUSA, E. T. de; LUCENA, F. L. de; SOUZA, R. C. V. de. Superfície De Implantes De Titânio E Sua Capacidade De Estímulo Na Formação Óssea: Uma Revisão De Literatura. **Odontol. clín.-cient**, v. 14, n. 4, p. 797–800, 2015.

COUTINHO, M. P.; ELIAS, C. N. Rugosidade e molhabilidade do titânio usado em implantes dentários com superfícies tratadas. **Rev. bras. odontol**, v. 66, n. 2, p. 234–238, 2009.

DE SOUZA, A. M. T.; DA SILVA BRAZ, J. K. F.; MARTINS, G. M.; VITORIANO, J. de O.; NETO, A. G. A.; NERY, D. M.; SABINO, V. G.; LUCENA, E. E. d. S.; ROCHA, H. A. de O.; BARBOZA, C. A. G.; JÚNIOR, C. A.; DE MOURA, C. E. B. Comparative analysis of

the biocompatibility of endothelial cells on surfaces treated by thermal plasma and cold atmospheric plasma. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 95, n. 3, p. 1–11, 2023.

DOMONKOS, M.; TICHÁ, P.; TREJBAL, J.; DEMO, P. Applications of cold atmospheric pressure plasma technology in medicine, agriculture and food industry. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 11, n. 11, 2021.

DRELICH, J.; CHIBOWSKI, E. Superhydrophilic and superwetting surfaces: Definition and mechanisms of control. **Langmuir**, v. 26, n. 24, p. 18621–18623, 2010.

DRELICH, J.; CHIBOWSKI, E.; MENG, D. D.; TERPILOWSKI, K. Hydrophilic and superhydrophilic surfaces and materials. **Soft Matter**, v. 7, n. 21, p. 9804–9828, 2011.

EBRAHIMI-SHAGHAGHI, F.; NOORMOHAMMADI, Z.; ATYABI, S. M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Inhibitory effects of cold atmospheric plasma on the growth, virulence factors and HSP90 gene expression in *Candida albicans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 700, n. November 2020, p. 108772, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108772>>.

GITTENS, R. A.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; CHENG, A.; ANDERSON, D. M.; MCLACHLAN, T.; STEPHAN, I.; GEIS-GERSTORFER, J.; SANDHAGE, K. H.; FEDOROV, A. G.; RUPP, F.; BOYAN, B. D.; TANNENBAUM, R.; SCHWARTZ, Z. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 4, p. 6268–6277, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.12.002>>.

FERREIRA, Lauro Mariano. Nitretação por plasma em baixa temperatura dos aços inoxidáveis martensíticos: estudo da influência da composição química do aço na cinética de tratamento. 2015. 90 páginas. Tese de doutorado em Engenharia Mecânica - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

HAO, C. P.; CAO, N. J.; ZHU, Y. H.; WANG, W. The osseointegration and stability of dental implants with different surface treatments in animal models: a network meta-analysis. **Scientific Reports** **2021 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 5 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-021-93307-4>>. Acesso em: 27 jul. 2022.

HIERRO-OLIVA, M.; GALLARDO-MORENO, A. M.; RODRÍGUEZ-CANO, A.; BRUQUE, J. M.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. L. Experimental approach towards the water contact angle value on the biomaterial alloy Ti6Al4V. **Annales UMCS, Chemia**, v. 70, n. 1, p. 1–13, 2015.

ISHII, M.; ODA, T.; KANEKO, M. Titanium and its alloys as key materials for corrosion protection engineering. **Nippon Steel Technical Report**, n. 87, p. 49–56, 2003. JAYESH, R. S.; DHINAKARSAMY, V. Osseointegration. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 7, n. April, p. S226–S229, 2015.

JELIL, R. A. **A review of low-temperature plasma treatment of textile materials**. [s.l.] Springer US, 2015. v. 505913–5943 p.

JESUÍNO, G. A.; RIBEIRO, L. M. F.; NAKAZATO, R. Z.; CODARO, E. N.; HEIN, L. R. de

O. Propriedades mecânicas e resistência à corrosão da liga Ti-4Al-4V obtida da reciclagem da liga Ti-6Al-4V. **Materials Research**, v. 4, n. 2, p. 63–69, 2001.

JUNG, H.; KIM, D. B.; GWEON, B.; MOON, S. Y.; CHOE, W. Enhanced inactivation of bacterial spores by atmospheric pressure plasma with catalyst TiO₂. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 93, n. 3–4, p. 212–216, 2010.

KLÄMPFL, T. G.; ISBARY, G.; SHIMIZU, T.; LI, Y. F.; ZIMMERMANN, J. L.; STOLZ, W.; SCHLEGEL, J.; MORFILL, G. E.; SCHMIDT, H. U. Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5077–5082, 2012.

LEITE, G. B.; FONSECA, Y. R.; GOMES, A. V.; ELIAS, C. N. Relação entre os parâmetros de rugosidade 3D e a molhabilidade do titânio com grãos micrométricos e sub-micrométricos. **Matéria**, v. 25, n. 2, p. 8, 2020.

LIDDELL, R.; AJAMI, E.; DAVIES, J. Tau (τ): A New Parameter to Assess the Osseointegration Potential of an Implant Surface. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 32, n. 1, p. 102–112, 2017.

MAISCH, T.; SHIMIZU, T.; ISBARY, G.; HEINLIN, J.; KARRER, S.; KLÄMPFL, T. G.; LI, Y. F.; MORFILL, G.; ZIMMERMANN, J. L. Contact-free inactivation of *Candida albicans* biofilms by cold atmospheric air plasma. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4242–4247, 2012.

MARCO, F.; MILENA, F.; GIANLUCA, G.; VITTORIA, O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. **Micron**, v. 36, n. 7–8, p. 630–644, 2005.

MARMUR, A.; VOLPE, C. Della; SIBONI, S.; AMIRFAZLI, A.; DRELICH, J. W. Contact angles and wettability: Towards common and accurate terminology. **Surface Innovations**, v. 5, n. 1, p. 3–8, 2017.

MENDES, V. C.; DAVIES, J. Uma nova perspectiva sobre a biologia da osseointegração. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent**, v. 70, n. 2, p. 166–171, 2016.

NASCIMENTO NETO, A. B. do. Desenho e construção de um protótipo gerador de jato de plasma frio à pressão atmosférica para aplicações biomédicas. p. 77, 2013.

NASCIMENTO NETO, A. B. do; SOUZA, I. A. de; FERNANDES, C. A.; VALENTIM, R. A. de M.; COUTINHO, K. D.; GUERRA NETO, C. L. de B. Uso De Jato De Plasma a Pressão Atmosférica Para Realizar Modificações De Superfície Do Titânio. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde - ISSN:2236-1103**, p. 74–84, 2015.

NISHIME, T. M. C. Jato de plasma frio em pressão atmosférica para tratamento de materiais e esterilização. p. 112, 2015.

NASCIMENTO-DIAS, B. L.; ANJOS, V. de C. Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X: Conceitos Físicos e os Processos Experimentais. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 43, p. 5, 2021.

O'CONNOR, N.; CAHILL, O.; DANIELS, S.; GALVIN, S.; HUMPHREYS, H. Cold

atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? **Journal of Hospital Infection**, v. 88, n. 2, p. 59–65, 2014.

OLIVEIRA, L. S. de A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 37, 2010.

PARITHIMARKALAINAN, S.; PADMANABHAN, T. V. Osseointegration: An update. **Journal of Indian Prosthodontist Society**, v. 13, n. 1, p. 2–6, mar. 2013.

PEREIRA, E. V.; FERREIRA, P. Aplicação de titânio e suas ligas na construção - Estudo da corrosão galvânica do par aço inoxidável/titânio em meio alcalino. **Laboratório Nacional de Engenharia Civil**, p. 62, 2007. Disponível em: <<http://repositorio.lnec.pt:8080/jspui/handle/123456789/16129>>.

PONDE, N. O.; LORTAL, L.; RAMAGE, G.; NAGLIK, J. R.; RICHARDSON, J. P. Candida albicans biofilms and polymicrobial interactions. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91–111, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>>.

PRYSIAZHNYI, V.; ZAPOROJCHENKO, V.; KERSTEN, H.; ČERNÁK, M. Influence of humidity on atmospheric pressure air plasma treatment of aluminium surfaces. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 14, p. 5467–5471, 2012.

REZENDE, M. C. R. R. A.; WADA, C. M.; LOPES, M. R. A. N. E.; CAPALBO, L. C.; GONÇALVES, V. M.; VALENTE, A. D. B.; DE OLIVEIRA, J. A. G. O papel da adsorção de proteínas na osseointegração. **Arch Health Invest**, v. 4, n. 3, p. 2015, 2015.

SALIHU, S. A.; SULEIMAN, Y. I.; EYINAVI, A. I.; USMAN, A. Classification , Properties and Applications of titanium and its alloys used in aerospace , automotive , biomedical and marine industry- A Review. **International Journal of Precious Engineering Research and Applications (IJPERA)**, v. 4, n. 3, p. 23–36, 2019.

SARTORETTO, S. C.; ALVES, A. T. N. N.; RESENDE, R. F. B.; CALASANS-MAIA, J.; GRANJEIRO, J. M.; CALASANS-MAIA, M. D. Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 3, p. 272–278, 28 jul. 2015.

SOUZA, A. M. T. et al. Comparative analysis of the biocompatibility of endothelial cells on surfaces treated by thermal plasma and cold atmospheric plasma. **An Acad Bras Cienc**, v. 95, n. 3, 2023.

SCHOLTZ, V.; PAZLAROVA, J.; SOUSKOVA, H.; KHUN, J.; JULAK, J. Nonthermal plasma - A tool for decontamination and disinfection. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1108–1119, 2015.

SHON, W. J.; CHUNG, S. H.; KIM, H. K.; HAN, G. J.; CHO, B. H.; PARK, Y. S. Peri-implant bone formation of non-thermal atmospheric pressure plasma-treated zirconia implants with different surface roughness in rabbit tibiae. **Clinical Oral Implants Research**, v. 25, n. 5, p. 573–579, 2014.

TODROS, S.; TODESCO, M.; BAGNO, A. Biomaterials and their biomedical applications:

From replacement to regeneration. **Processes**, v. 9, n. 11, 2021.

TSUJITA, H.; NISHIZAKI, H.; MIYAKE, A.; TAKAO, S.; KOMASA, S. Effect of plasma treatment on titanium surface on the tissue surrounding implant material. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, 2021.

UPPULURI, P.; PIERCE, C. G. Candida albicans formação de biofilme e suas consequências clínicas. v. 4, p. 1235–1237, 2009.

VAIDYA, P.; MAHALE, S.; KALE, S.; PATIL, A. Osseointegration- A Review. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 16, n. 01, p. 45–48, 2017.

VELASCO-ORTEGA, E.; ORTIZ-GARCÍA, I.; JIMÉNEZ-GUERRA, A.; MONSALVE-GUIL, L.; MUÑOZ-GUZÓN, F.; PEREZ, R. A.; GIL, F. J. Comparison between sandblasted acid-etched and oxidized titanium dental implants: In vivo study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, 1 jul. 2019.

WANACHANTARARAK, P.; SUANPOOT, P.; NISOA, M. Inhibitory activity of cold atmospheric plasma on candida albicans. **Walailak Journal of Science and Technology**, v. 16, n. 6, p. 401–408, 2019.