



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIEL DE MOURA MARTINS

**Investigação *in vitro* da hemocompatibilidade e redução bacteriana
em superfícies de titânio tratado por plasma**

**Mossoró/RN
NOVEMBRO - 2022**

GABRIEL DE MOURA MARTINS

**Investigação *in vitro* da hemocompatibilidade e redução bacteriana
em superfícies de titânio tratado por plasma**

Projeto de monografia, apresentado à Banca Examinadora, como trabalho final da componente curricular Estágio Supervisionado Obrigatório III do Curso de graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura

Co-orientador: Prof. Dr. Clodomiro Alves Júnior

Mossoró/RN

NOVEMBRO – 2022

©Todos os direitos estão reservados à 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 tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) seja devidamente citado e mencionado os seus créditos bibliográficos.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas
da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M929i Moura Martins, Gabriel.
Investigação in vitro da hemocompatibilidade e
redução bacteriana em superfícies de titânio tratado
por plasma / Gabriel Moura Martins. - 2022.
47 f. : il.

Orientador: Carlos Eduardo Bezerra de Moura.
Coorientador: Clodomiro Alves Júnior.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de Biotecnologia,
2022.

1. Titânio. 2. Plasma. 3. Hemocompatibilidade.
4. Microrganismos. I. Eduardo Bezerra de Moura,
Carlos, orient. II. Alves Júnior, Clodomiro, co-
orient. III. 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

GABRIEL DE MOURA MARTINS

**INVESTIGAÇÃO IN VITRO DA HEMOCOMPATIBILIDADE E REDUÇÃO
BACTERIANA EM SUPERFÍCIES DE TITÂNIO TRATADO POR PLASMA**

Monografia apresentada a Universidade Federal
Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia.

Defendida em: 28 / 11 / 2022

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Janine Karla Franca Da Silva Braz (UFRN)
Membro Examinador

Dr. Jussier de Oliveira Vitoriano (UFRN)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família. Aos meus pais, **Aurileide Eduardo de Moura Martins e Gesivaldo Martins da Silva**, pelo suporte, dedicação, conselhos e incentivo para finalizar esse ciclo. Espero ser um profissional de quem vocês terão orgulho.

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor e conselheiro, **Carlos Eduardo Bezerra de Moura**, por esses 4 anos de aprendizado. Gratidão por ter-me apresentado o universo dos biomateriais e expandir a minha curiosidade. Obrigado por me ensinar e me encorajar a enfrentar os diversos desafios que surgiram durante esses anos de trabalho. Foram de suma importância para a minha formação profissional e pessoal.

Agradeço ao **Professor Doutor, Clodomiro Alves Júnior**, do Laboratório de Plasma Aplicado na Agricultura, Saúde e Meio Ambiente da UFERSA. Obrigado por me aceitar como seu co-orientando para desenvolver vários trabalhos durante esses anos, por sua preocupação e cuidado com a realização dos experimentos e dos resultados.

Agradeço a **Professora Doutora, Janine Karla Franca Da Silva Braz**, pelo suporte, correções e orientações. Obrigado por sempre buscar o melhor para mim, ter me proporcionado e incentivado a passar por experiências profissionais que foi de suma importância e contribuíram para o profissional que estou me tornando. Você me ensinou que independente dos acontecimentos sempre existe uma solução, e que é possível fazer ciência com companheirismo, honestidade e ética. Obrigado por tudo, você é uma grande amiga que a ciência me apresentou.

Agradeço aos amigos do LabPlasma UFERSA em especial a **Jussier Vitoriano**, obrigado por me acolher no laboratório, me socorrer e ensinar mesmo a distância. Aprendi muito com você sobre o universo dos biomateriais. Muito obrigado pela ajuda e pelo apoio durante todos esses anos.

Agradeço aos amigos do **Laboratório de Microbiologia Veterinária (LAMIV)** e aos amigos do **Grupo de Pesquisa e Inovação em Estudos Morfofuncionais (GPIEM - UFERSA)**. Através de vocês aprendi que para fazer ciência é necessário ter respeito, ética, compreensão e amizade.

RESUMO:

O titânio (Ti) é um material bastante utilizado para produção de implantes cardiovasculares e ósseos. Apesar disso, ainda à necessidade de buscar estratégias de tratamento para potencializar a superfície do Ti com a finalidade de aumentar a sua biocompatibilidade, hemocompatibilidade e prevenção da contaminação por microrganismos. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do plasma atmosférico a frio (CAP) e nitretação a plasma por baixa pressão (LPP) na hemocompatibilidade de implantes de titânio e prevenção da contaminação bacteriana. Para tanto, foram produzidas superfícies de titânio polidas, tratadas por CAP e nitretação. Após tratamento, as superfícies foram caracterizadas quanto à molhabilidade pelo método de gota séssil, rugosidade por microscopia de força atômica, estrutura cristalina por difração de raios-X e composição química por espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS). Para as análises de hemocompatibilidade foi coletado o sangue em citrato de sódio (1:9) exposto sobre os discos por 30min em estufa de CO₂ a 37°C, posteriormente foram avaliados os parâmetros sanguíneos, coagulação por meio do tempo de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa) e a adesão plaquetária por micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises microbiológicas foram realizadas utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) 50µL da solução bacteriana com densidade óptica de $0,150 \pm 0,003$ a 600 nm sobre as superfícies durante 4h a 37°C. Após a incubação foi realizado a coleta das soluções bacterianas sobre as superfícies para realizar a contagem das colônias e discos foram separados para realizar a fixação das bactérias e análise da formação de colônias bacterianas. O tratamento por CAP promoveu maior presença de (-OH) nas superfícies possibilitando a diminuição do ângulo de contato ($13^\circ \pm 1.8$) em comparação com superfícies nitretadas ($77^\circ \pm 2.4$). A rugosidade foi maior nas superfícies nitretadas. A estrutura cristalina das amostras tratadas por CAP não foram alteradas, enquanto na nitretação houve formação de nitretos de Ti (TiN). Os parâmetros sanguíneos não diferiram estatisticamente. Os TP e TTPa das amostras nitretadas foram maiores em relação as demais ($p < 0,0001$). As superfícies tratadas por CAP possui maior ativação plaquetária, densidade plaquetária, formação de trombos com maior tamanho quando comparado as amostras sem tratamento e nitretada. Além disso, as superfícies tratadas por CAP possuem baixa formação de colônias bacterianas quando comparada com as outras superfícies. Desta forma, o CAP demonstrou excelente potencial para evitar a contaminação microbiana e tratamento de implantes ósseos, enquanto a nitretação para dispositivos intravasculares.

PALAVRAS CHAVE: Plasma, titânio (Ti), hemocompatibilidade, microrganismo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 2 – Métodos de plasma para tratamento de superfícies. A) Aparelho de plasma de baixa pressão (LPP). B) Aparelho de plasma atmosférico a frio (CAP).

Figura 3 – Delineamento experimental da pesquisa.

Figura 4 - Aparelho de plasma atmosférico a frio (CAP) constituído por um tubo de quartz, diferencial de potência, fonte de energia e entrada de gases.

Figura 5 – Aparelho de plasma de baixa pressão (LPP) constituído por uma câmara hermética, diferencial de potência, fonte de energia e entrada e saída de gases.

Figura 6 – AFM das superfícies de titânio. A) superfície sem tratamento. B) nitretada. C) Superfície tratada com CAP.

Figura 7 – Difrátograma de raio x com ângulo rasante (1°) 2θ . Espectros de cor preta – superfícies de Ti nitretada, espectros de cor vermelha – superfície de Ti não tratada, espectros de cor azul – superfície de Ti tratada com plasma CAP.

Figura 8 –Análise da espectroscopia de fotoelétrons por raios X das superfícies de titânio tratadas sem tratamento e tratadas com CAP.

Figura 9 – A- Unidades formadoras de colônias de *P. aeruginosa* sobre as amostras de titânio tratados e não tratados. (B) Microscopia eletrônica de varredura das amostras sem tratamento, (C) CAP e (D) Nitretada.

Figura 10 – Histograma das áreas ocupadas por colônias bacterianas. (A) não tratadas, (B) cap e (C) nitretação. <1 bactérias isoladas e 1 – 5 colônias bacterianas.

Figura 11 – Análise dos tempos de coagulação sobre superfícies controle, polidas, CAP e nitretação. (A) Tempos de coagulação de protrombina (TP) e (B) tromboplastina parcialmente ativada (TTPa).

Figura 12 – Células sanguíneas cultivadas sobre amostras controle, cap, sem tratamento e nitretada. (A) hemácias, (B) leucócitos, (C) linfócitos e (D) neutrófilos.

Figura 13 – análise da adesão plaquetária por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sem tratamento (A), CAP (B) e nitretação (C).

Figura 14 – análise das plaquetas isoladas sobre as superfícies polidas, CAP e nitretadas. A) Contagem das plaquetas em $58 \times 58 \mu\text{m}$, B) Diâmetro de feret-max (μm), C) Perímetro das plaquetas, D) Área (μm^2), E) Circularidade.

Figura 15 – análise dos agregados plaquetários sobre as superfícies polidas, CAP e nitretada. A) Contagem dos agregados plaquetários em 58x58 μm , B) Perímetro dos agregados (μm), C) Diâmetro de feret-max, D) Circularidade, E) Área (μm^2).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – ângulos de contato das superfícies de Ti polida, CAP e nitretada.

Tabela 2 – Parâmetros de rugosidade (nm) das superfícies de titânio.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM - Microscopia de Força Atômica

ATCC - American Type Culture Collection

BHI - Brain Heart Infusion CE Broth

CAP - Plasma Atmosférico a Frio

DEIV - Detergente enzimático

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

H - Horas

L – Litro

LPP – Plasma de baixa pressão

M - Molar

mbar - Milésimos de bar

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

mL - Mililitro

mm - Milímetro

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide

Min - Minutos

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µm - Micrometro

nm - Nanometro

NaCl - Cloreto de sódio

PBS - Solução salina tamponada

PCA - Plate Count Agar

PPP - Plasma Pobre em Plaquetas

PRP - Plasma Rico em Plaquetas

pH - Potencial hidrogeniônico

Ra - Rugosidade média

Rp - Altura máxima do perfil de pico

RPM - Rotações por minuto

Rv - Altura máxima do perfil do vale

Rz - Altura máxima média do perfil

SiC - Carbetto de sílica

SFB - Soro fetal bovino

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TP - Tempo de Protrombina

TTPa - Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

Ti - Titânio

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Celsius

β - Beta

Δ - Delta

% - Porcentagem

π - Pi

μ - Micron

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Titânio, propriedades e suas aplicações na área biomédica	17
2.2 Bactérias mais frequentes em contaminações de implantes e seus impactos na saúde dos pacientes	18
2.3 Hemocompatibilidade em implantes	19
2.4 Plasma e suas aplicações no tratamento de superfícies metálicas.....	20
2.5 Plasma como uma nova alternativa de desinfecção para implantes cirúrgicos	21
3. HIPÓTESES	22
4. JUSTIFICATIVA	23
5. OBJETIVOS DA PESQUISA	23
5.1 OBJETIVO GERAL	23
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	23
6. MATERIAL E MÉTODOS	24
6.1 Preparação dos discos de titânio	24
6.2 Caracterização das superfícies dos discos de titânio.	26
6.3 Preparo e cultura bacteriana	26
6.3.1 Incubação das bactérias sobre os discos.....	26
6.3.2 Avaliação da morfologia e adesão bacteriana	27
6.4 Coleta e preparação do sangue:.....	27
6.4.1 Análise de alterações nos parâmetros sanguíneos:	28

6.4.2 Análise do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa):	28
6.4.3 Avaliação da Adesão de Plaquetas	29
6.5 Análise estatística	29
7. RESULTADOS	29
7.1 Caracterização das superfícies	29
7.2 Formação planctónico e adesão bacteriana	32
7.3 Análise dos parâmetros sanguíneos	33
7.3.1 Análise de adesão plaquetária	34
8 Discussão:	36
9 Conclusão:	39
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

Biofilmes bacterianos são comunidades aderidas a superfícies envolvidas em uma matriz polimérica extracelular. Esses biofilmes podem ser formados em diversos lugares, superfícies artificiais e naturais. Em ambientes clínicos por muitas vezes a contaminação e o combate a formação desses biofilmes são negligenciados. No entanto, mesmo com os cuidados e métodos de esterilização, os materiais e implantes utilizados são propensos a contaminação por bactérias e formação do biofilme (KOO et al., 2017). Os biofilmes possuem uma estrutura complexa e devido a isso possui proteção contra o sistema imunológico e resistência a antibióticos, sendo responsável pela falha precoce do implante causada por inflamações dos tecidos peri-implantares (MATOS et al., 2017).

As infecções em dispositivos médicos representam cerca de 25,6% das infecções em ambientes hospitalares quando comparadas a outros tipos (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018a). As infecções ocorrem devido os materiais utilizados possuir condições de hidrofília, rugosidade e cargas elétricas ideais para uma rápida adesão bacteriana, ocorrendo o surgimento de novas colônias multirresistentes a antibióticos (MARTÍ et al., 2019). Implantes contaminados exigem a realização de procedimentos de revisão, normalmente invasivos ou danosos ao paciente. As estratégias são geralmente uma tentativa de limpar o dispositivo *in vivo* através de antibióticos, uma abordagem potencialmente perigosa ao longo prazo devido ao risco de seleção de microrganismos resistentes a medicamentos como também pode ser realizada a remoção e substituição completa do aparelho. Dessa forma, esses procedimentos fazem com que os indivíduos tenham um maior impacto em morbidade, mortalidade e custos médicos (MODIC et al., 2019).

Dentre as bactérias que estão associadas a contaminação em implantes com maior frequência a *Pseudomonas aeruginosa* como gram-negativa se destaca (SU et al., 2019). A *P. aeruginosa* é uma bacteria oportunista e possui a maior frequência de infecções em implantes por esta presente na microbiota humana, fossas nasais, em superfícies hospitalares como lavatórios, bancadas cirúrgicas e soluções antissépticas. (YADAV et al., 2017). Além disso, essa bactéria esta comumente relacionadas a quadros de resistência a antibióticos (HILTUNEN; VUORELA; FALLARERO, 2017; PINHEIRO et al., 2008), portanto se faz ainda necessário avanços nas pesquisas de engenharia de superfície de implantes, em busca de produzir implantes mais resistentes à colonização bacteriana através de métodos acessíveis e baratos.

O sangue é o tecido primário que entra em contato com a superfície do implante, dessa maneira, as características do material como molhabilidade, rugosidade, composição química e estrutura cristalina influenciam nas interações sangue-material, como por exemplo adsorção de proteínas, formação de plaquetas, ativação/adesão de leucócitos e coagulação (HUANG et al., 2022). A ativação dos processos de coagulação do sangue em superfícies metálicas de implantes biomédicos é um problema constante na medicina. Isso ocorre devido as superfícies metálicas não possuírem características adequadas para interagir com o sangue de acordo com a função do implante (YANG et al., 2012). Em implantes cardiovasculares, quando ocorre a formação de trombos o fluxo sanguíneo é interrompido causando oclusões ou embolias (TCHOUTA; BONDE, 2015). Já em implantes ortopédicos a formação de coágulos é crucial para ocorrer a neovascularização gerando um microambiente que garante o sucesso do implante. Desta forma, compreender a interação do implante com as células sanguíneas é de suma importância para o desenvolvimento de novas tecnologias para melhorar a bio e hemocompatibilidade, direcionando o implante para melhor aplicação biológica evitando os processos indesejáveis (WANG et al., 2014).

Atualmente o plasma atmosférico a frio (CAP) vem mostrando ser um método promissor de descontaminação, além de melhorar as propriedades dos biomateriais, como por exemplo, o titânio, comumente utilizado na produção de implantes devido possuir uma boa biocompatibilidade com o tecido, dureza e resistência à corrosão (MODIC et al., 2019). O plasma consiste em um gás ionizado por fótons UV, elétrons, íons, neutros e radicais livres que são gerados pela aplicação de descargas elétricas sob condições de temperatura ambiente ou em altas temperaturas a vácuo (ALVES JUNIOR et al., 2019; NAUJOKAT et al., 2019). O plasma pode inativar eficientemente bactérias e a formação de biofilmes (AIRES et al., 2017). Contudo esses mecanismos ainda não são completamente compreendidos, mas pesquisas mostram que o plasma além de descontaminar pode ser utilizado para funcionalizar simultaneamente a superfície do implante *in vivo*, removendo a infecção, e ao mesmo tempo melhorando a biocompatibilidade do implante com o tecido, promovendo a adesão de células importantes nessa integração do implante ao tecido e promovendo a inibição da colonização bacteriana (Frías et al., 2020).

Uma técnica de aplicação do plasma que é bastante comum para modificações de superfícies metálicas é o plasma de baixa pressão convencional. Porém, esta técnica possui algumas desvantagens como a necessidade de uso de sistemas de vácuo, maior tempo de tratamento e câmaras herméticas que possuem alto custo de fabricação (THANU et al., 2019). O plasma

atmosférico a fio (CAP) vem mostrando ser mais viável e acessível por não necessitar de um ambiente a vácuo para operar, tornando-o portátil e, seu baixo custo de fabricação quando comparado com os plasmas de alta pressão convencional (Kim et al., 2016).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Titânio, propriedades e suas aplicações na área biomédica

O titânio (Ti) e suas ligas nos últimos 50 anos vêm sendo amplamente utilizado como biomaterial devido as suas propriedades importantes que lhe conferem biocompatibilidade, entre elas, alta resistência a corrosão, resistência à tração, flexibilidade e resistência aos efeitos dos fluidos corporais (KULKARNI et al., 2015). Por possuir essas propriedades, o titânio é vastamente explorado para utilização na medicina para produção de dispositivos biomédicos. As aplicações mais comuns do titânio são em aparelhos ortopédicos, odontológicos, válvulas cardíacas artificiais, stents, bobinas de oclusão e como invólucro para marcapassos (BARTHES et al., 2018).

O titânio foi descoberto em 1791 pelo mineralogista inglês William Grego, é um dos elementos químicos de transição da tabela periódica com número atômico 22 e distribuição eletrônica $[Ar] 3d^2 4s^2$ (LYU et al., 2017). A distribuição eletrônica do titânio permite que este elemento tenha facilidade em interagir com nitrogênio, carbono, hidrogênio e oxigênio (BUETTNER; VALENTINE, 2012). As interações do titânio com o oxigênio permitem que ocorra a formação de uma camada natural de óxido sobre a superfície do metal, proporcionando maior estabilidade química (GURRAPPÀ, 2003).

Apesar das boas propriedades do Ti e sua vasta aplicação na área biomédica, problemas relacionados a infecção de implantes é um dos principais fatores que causam a falha do implante (ZHANG et al., 2021). Uma vez que um implante é infectado, uma cirurgia de revisão é necessária aumentando os custos do procedimento e levando o paciente novamente a outro processo cirúrgico (SOUZA et al., 2021). Essas complicações surgem porque os implantes à base de Ti, não possuem recursos antibacterianos e podem permitir que as bactérias proliferem facilmente no implante (HICKOK; SHAPIRO; CHEN, 2018; XU et al., 2021). Portanto, nos dias de hoje existe a necessidade da prevenção de infecções nesses dispositivos biomédicos para evitar a falha do implante e complicações posteriores aos pacientes.

2.2 Bactérias mais frequentes em contaminações de implantes e seus impactos na saúde dos pacientes

Infecções associadas a cuidados de saúde (IACs) são aquelas que os pacientes contraem enquanto recebem cuidados de saúde para outra doença, as complicações mais frequentes estão relacionadas ao uso de dispositivos biomédicos (APIFARMA, 2016). No Brasil, dados apresentados em 2019 pelo o ministério da saúde (MS), mostram que a taxa média de IACs corresponde 14% das internações, sendo a *Pseudomona aeruginosa* uma das bactérias que promove as maiores taxas de mortalidade e alto custo aos cofres públicos, por possuir resistência a antibióticos (OSME et al., 2020).

As infecções de implantes é uma das mais frequentes complicações associadas ao uso de biomateriais (XU et al., 2017). Ao mesmo tempo que os implantes biomédicos revolucionaram a medicina, também abriram espaço para infecções oportunistas durante o período intraoperatório, aumentando a taxa de falha do implante (LIU et al., 2018). A base da infecção de um implante ocorre com a interação entre os fatores do hospedeiro, material estranho e os agentes infecciosos bacterianos. Implantes biomédicos podem ser infectados de diferentes maneiras: Durante a implantação, o biomaterial pode ser colonizado pela ferida cirúrgica, pele, ar (aerossóis), pode haver colonização através do contato direto com um local infectado adjacente ou, finalmente, por meio de semente hematogênica ou linfогênica do patógeno (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018b; GEIPEL; HERRMANN, 2004).

Dentre as bactérias que causam infecções em implantes a *P. aeruginosa* (Fig 1) se destaca, causando cerca de 10–15% das infecções nosocomiais em todo o mundo (SHI et al., 2019). A *P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, possui uma membrana citoplasmática e uma membrana externa que gera barreira de permeabilidade (CHEVALIER et al., 2017). A *P. aeruginosa* possui a capacidade de colonizar diversos nichos como ambientes aquáticos, animais e locais com maior frequência de atividade humana como por exemplo ambientes hospitalares/clínicos (CRONE et al., 2020). A sua resistência aos antibióticos de última geração e antissépticos se deve aos seus genes de resistência e sua baixa permeabilidade de membrana. (MAH et al., 2003; PINHEIRO et al., 2008). Devido aos impactos causados por esta bactéria à saúde pública, existe a necessidade do desenvolvimento de novas formas de terapias antimicrobiana que sejam eficazes para superfícies dos implantes.



Figura 1 - *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: Center for disease control and prevention (CDC)

2.3 Hemocompatibilidade em implantes

A hemocompatibilidade é o estudo das interações dos dispositivos biomédicos com o sangue (WEBER et al., 2018). A composição do biomaterial hemocompatível deve possuir propriedades que ao entrar em contato com o sangue não cause quaisquer reações adversas clinicamente significativas (BLOK; ENGELS; VAN OEVEREN, 2016). Dentre as reações adversas pós-implante, a ocorrência de formação de trombos é a mais frequente, modulando a aceitação ou não em determinados tipos de implantes. O desenvolvimento de trombos ocorre quando o sistema circulatório identifica a presença do biomaterial que resulta na ativação do sistema de coagulação (KWAAN, 2018). Após a ativação do sistema de coagulação acontece a adesão das plaquetas no biomaterial que altera o endotélio vascular, ocorrendo à geração de microtrombos e trombose, assim, tornando necessário compreender a hemocompatibilidade do biomaterial, parâmetro bastante importante que define as limitações de um implante (KRÖGER et al., 2018).

O sucesso dos implantes ortopédicos depende totalmente da neovascularização promovida por fatores angiogênicos presentes nos coágulos formados. A formação de coágulos promove a estimulação de células endoteliais (CE) que formam novos vasos sanguíneos na interface implante/tecido (FAN et al., 2021). Garantindo o fornecimento de oxigênio, hormônios sistêmicos, nutrientes para o local da lesão e a migração de células-tronco mesenquimais que vão gerar o novo tecido ósseo (SIMUNOVIC; FINKENZELLER, 2021). Quando este processo não ocorre de maneira adequada, é formado uma capsula fibrosa, resultando em um afrouxamento do implante causando a falha (RAINES et al., 2010). Em contrapartida, implantes cardiovasculares como por exemplo stents, necessita de biomateriais que minimize a formação de coágulos pois podem causar

o interrompimento do fluxo sanguíneo, resultando em acidentes vasculares encefálicos (AVE), trombose pulmonar, infarto de órgãos, colapso circulatório completo e até morte (GODSCHALK et al., 2016; WANG et al., 2020).

Diferentes abordagens clínicas têm sido utilizadas para controlar a coagulação do sangue nas superfícies dos implantes cardiovasculares e ortopédicos. A abordagem mais comum é prescrever anticoagulantes para evitar a coagulação do sangue. No entanto, a utilização de anticoagulantes pode trazer riscos significativos como sangramento interno e resposta imunológica enfraquecida (SHOEB MARWA, 2014). Modificações químicas nas superfícies metálicas vem se tornando um método promissor para alterar as propriedades físico-químicas e assim, melhorar a hemocompatibilidade (LIU et al., 2016a). Estudos mostram que superfícies hidrofóbicas desempenham uma redução significativa na adsorção de proteínas do plasma sanguíneo e na coagulação do sangue total. Contudo, essas superfícies podem não ser estáveis por um período prolongado quando expostas ao sangue. Além disso, as superfícies hidrofóbicas não aderem às células endoteliais, que desempenham um papel importante na integração de muitos dispositivos médicos (MANIVASAGAM; POPAT, 2020). Assim, existe a necessidade de desenvolver superfícies que controlem a coagulação sanguínea e também tenham potencial para interagir de forma adequada com o tecido nativo sem comprometer a integração do implante.

2.4 Plasma e suas aplicações no tratamento de superfícies metálicas

O plasma é considerado o quarto estado da matéria e foi descoberto por William Crookes em 1879. O plasma é gerado quando um gás é exposto a uma alta voltagem e um diferencial de potencial entre dois eletrodos, acelerando os elétrons livres. Dessa forma, os elétrons livres colidem com as partículas neutras, permitindo a transferência de energia e liberação de elétrons, ocorrendo a ionização do gás (CHEN et al., 2022; DUBEY et al., 2022). Atualmente, as técnicas de plasma são amplamente exploradas para o tratamento de superfícies metálicas com a finalidade de funcionalizar e melhorar as propriedades das superfícies (ZHANG; CHEN; WANG, 2020). Existem diversos modelos de aplicação do plasma, porém, para modificação de superfícies metálicas os métodos de plasma de baixa pressão convencional e CAP se destacam (CHOI; UHM; KAUSHIK, 2021a; MOURA et al., 2019).

O plasma de pressão convencional (Fig 2A) pode ser produzido artificialmente através de uma câmara hermeticamente fechada, em baixa pressão entre 0,5 a 10 mbar quando um diferencial

de potencial é aplicado. Devido a influência do campo elétrico, os elétrons livres colidem com as partículas neutras, ocorrendo a ionização do gás (MAI-PROCHNOW et al., 2014; TURKOGLU SASMAZEL; ALAZZAWI; KADIM ABID ALSAHIB, 2021a). Apesar do desenvolvimento bem-sucedido, o plasma assim produzido possui algumas desvantagens, como por exemplo, necessita de sistemas a vácuo para geração do plasma, maior tempo de tratamento e possui um alto custo de fabricação, limitando as suas aplicações na clínica (TENDERO et al., 2006).

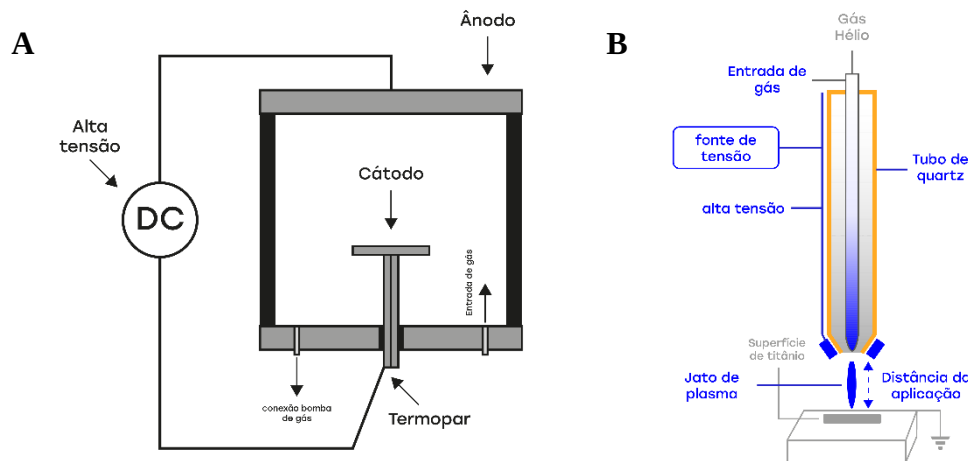


Figura 2 – Métodos de plasma para tratamento de superfícies. A) Aparelho de plasma de baixa pressão (LPP). B) Aparelho de plasma atmosférico a frio (CAP). (Fonte autor).

Ao contrário, o plasma atmosférico (Fig 2B) pode ser produzido sem a necessidade de ambientes a vácuo (YAN; SHERMAN; KEIDAR, 2017). Um dispositivo do plasma atmosférico pode ser constituído de um tubo de quartzo, um anodo e catodo como o cobre envolvendo o tubo de quartz e um gás de transporte, como hélio ou argônio para sustentar a formação de plasma atmosférico a frio (CAP) (GUIMARÃES et al., 2015). A geração do CAP pode superar as desvantagens do método de plasma convencional devido não necessitar de um ambiente a vácuo para operar, tornando-o portátil e, com baixo custo de fabricação quando comparado com os plasmas de alta pressão convencional, revelando ser uma técnica mais viável e acessível (SETSUHARA, 2016a).

2.5 Plasma como uma nova alternativa de desinfecção para implantes cirúrgicos

Diversos tipos de métodos para realizar o processo de esterilização para implantes de Ti podem ser utilizados nos dias de hoje. Os métodos comuns são o tratamento com gás de óxido de

etileno (EO), aquecimento a seco, irrigação por raios gama (GI) e autoclavagem (Reddy, et al. 2010). Mesmo com as variedades dos métodos, o processo de esterilização dos materiais ocorre antes do período intraoperatório, no qual é o período que pode acontecer a maior taxa de contaminação do implante no processo cirúrgico.

O uso de plasma para descontaminação microbiana é uma nova abordagem que está atualmente sob intensa investigação. Inúmeros trabalhos vêm utilizando o plasma para descontaminar tecidos, polímeros e superfícies metálicas (BÁRDOS; BARÁNKOVÁ, 2010; BERNHARDT et al., 2019; GAN et al., 2021; LIN et al., 2022). Atualmente, existem três hipóteses sobre os mecanismos que podem estar envolvidos na atividade antibacteriana do plasma: a) danos na parede celular e / ou membrana, b) danos em proteínas por meio de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) e c) danos UV no DNA (MAI-PROCHNOW et al., 2015). Além disso, estudos mostram que bactérias gram-negativas são mais sensíveis aos danos plasmáticos, sugerindo que a arquitetura da parede celular é importante para que ocorra a morte bacteriana (ERMOLAEVA et al., 2011; MAI-PROCHNOW et al., 2015). Apesar dos diversos estudos que destaca o potencial do plasma para descontaminar uma gama de patógenos importantes na assistência à saúde. Pouco se sabe sobre os mecanismos do tratamento de plasma CAP sobre superfícies de Ti contra *P. aeruginosa*, e as vantagens que este tratamento pode trazer quando comparado com o método de plasma convencional.

3. HIPÓTESES

H₀= O tratamento de plasma atmosférico a frio é incapaz de prevenir o crescimento bacteriano e melhorar a biocompatibilidade de implantes de titânio.

H₁= O tratamento de plasma atmosférico a frio possui a capacidade de prevenir o crescimento bacteriano.

H₂ = O tratamento de plasma atmosférico a frio possui a capacidade de melhorar a hemocompatibilidade de implantes de titânio.

H₃ = O tratamento de plasma atmosférico a frio pode causar a formação de trombos em implantes de titânio.

4. JUSTIFICATIVA

A adesão bacteriana e a baixa hemocompatibilidade dos implantes são os principais fatores responsáveis por falhas no uso de implantes biomédicos, as abordagens que são utilizadas atualmente para o tratamento dessas ocorrências é a utilização de antibióticos e drogas antiplaquetárias. No entanto, essas abordagens não são eficientes a longo prazo, podendo provocar complicações relacionadas a resistência bacteriana e diminuição da resposta imunológica do paciente. Devido a isto, é necessária a busca por novas tecnologias que sejam eficazes, seguras, econômicas e práticas no sentido de melhorar a hemocompatibilidade e prevenir a contaminação bacteriana. Desta forma, o plasma vem se tornando uma alternativa eficiente para o melhoramento de superfícies metálicas que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de implantes a partir de biomateriais, se tornando uma tecnologia que pode solucionar os problemas de infecção em implantes e ao mesmo tempo melhorar a hemocompatibilidade, proporcionando maior taxa de sucesso de implantação.

5. OBJETIVOS DA PESQUISA

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do plasma atmosférico a frio (CAP) e nitretação a plasma na hemocompatibilidade de implantes de titânio e prevenção de contaminação bacteriana.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Produzir superfícies de titânio tratados por CAP e nitretação a plasma.
- Caracterizar as superfícies de titânio tratadas por CAP e nitretação a plasma, quanto à molhabilidade, rugosidade e composição química.
- Analisar o crescimento bacteriano sobre discos de titânio tratados por CAP e nitretação a plasma.
- Avaliar a adesão de bactérias sobre as superfícies de titânio tratados por CAP e nitretação a plasma.
- Analisar o tempo de coagulação através do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), sobre as superfícies de titânio não tratadas, tratadas por CAP não térmico e nitretação.

- Compreender a adesão de plaquetas e morfologia das células sanguíneas cultivadas sobre os discos de Ti tratados e não tratados.
- Identificar as alterações dos parâmetros sanguíneos após a exposição do sangue sobre os discos de Ti tratados e não tratados.

6. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa utilizou dois tipos de tratamentos a plasma sobre as superfícies de titânio. Os discos foram produzidos e tratados pelo Laboratório de Plasma Aplicado à Agricultura, Saúde e Meio Ambiente da Universidade Federal Rural do Semi-árido. Após os tratamentos, os discos foram caracterizados quanto a sua molhabilidade, rugosidade, estrutura cristalina e composição química. Em seguida, os discos de titânio tratados e não tratados foram utilizados para o cultivo das bactérias e células sanguíneas com o objetivo de compreender o comportamento das bactérias e células sanguíneas sobre as superfícies como demonstrado na Fig 3.

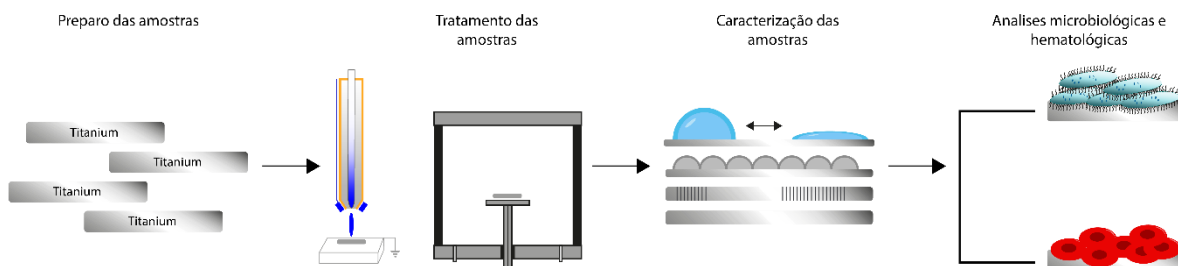


Figura 3 – Delineamento experimental da pesquisa. (Fonte autor).

6.1 Preparação dos discos de titânio

Foram utilizados discos de titânio com as dimensões pré-definidas de, 13 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. Os parâmetros como molhabilidade, rugosidade e composição química foram caracterizados para as superfícies modificadas por CAP e nitretação. Desta forma, foram utilizados três tipos de superfícies: polida, nitretada e tratada por hélio por meio de CAP. Primeiramente, os discos foram lixados de maneira gradual, com lixas de carvão de silício (SiC) com diferentes granulometrias, 220, 440, 600, 1500 e 2000 MESH e polidas em solução coloidal 40% Sílica (0,03 μ) e 60% de peróxido de hidrogênio à 30% durante 30 minutos. Após esse procedimento todas as amostras foram limpas onde os discos foram imersos em solução de 0,5% de detergente enzimático (DEIV) em água bidestilada em tratamento de ultrassom durante 10 minutos. Após duas lavagens, essas amostras foram lavadas em etanol absoluto, seguida da lavagem com água bidestilada e

submetidos a ultrassom por 10 minutos. Quando todos os discos estavam lavados e secos uma parte dos discos foram destinados a realizar o tratamento a CAP durante 15 minutos com uma distância de 20 ± 1 mm entre a amostra e o aparelho com tensão de 15Kv, frequência de 600Hz e 1 L/min de hélio sobre as amostras como ilustra a (Figura 4). Para o tratamento a plasma CAP ser realizado em toda a superfície o plasma foi aplicado em cinco pontos estratégicos dos discos, cada ponto foi tratado durante um tempo de 3mn, assim, realizando a varredura em toda a superfície do disco de titânio.

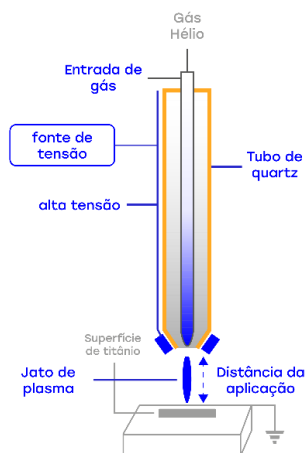


Figura 4 - Aparelho de plasma atmosférico a frio (CAP) constituído por um tubo de quartz, diferencial de potência, fonte de energia e entrada de gases. (Fonte autor).

Em outra parcela dos discos de titânio foi realizado o tratamento por nitretação. O tratamento a plasma de nitretação ocorreu por descarga de cátodo planar em atmosfera nitretante (36N24 e 24H2) com pressão de 2mbar a temperatura de 400°C, na (Figura 5) é ilustrado o aparelho de plasma de baixa pressão.

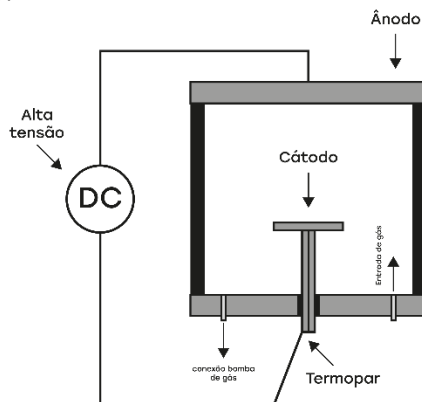


Figura 5 – Aparelho de plasma de baixa pressão (LPP) constituído por uma câmara hermética, diferencial de potência, fonte de energia e entrada e saída de gases. (Fonte: autor).

6.2 Caracterização das superfícies dos discos de titânio.

A molhabilidade consiste em mensurar o ângulo formado por uma gota de 20µl de água deionizada pipetada sobre as amostras (polidas, CAP e nitretadas), através de captura da imagem com uma câmera de vídeo do goniômetro e, utilizando o programa Suftens, foi possível captar as imagens da gota com a câmera de vídeo do goniômetro (BRAZ et al., 2019). Se o ângulo for $\theta < 10^\circ$ super hidrofílico, $\theta < 90^\circ$ hidrofílico, $\theta > 90^\circ$ hidrofóbico e $\theta > 150^\circ$ super hidrofóbico (ACHOUR et al., 2018). A topografia da superfície foi analisada baseada nos parâmetros de rugosidade (R_a , R_z , R_p e R_v) obtidos utilizando um Microscópio de Força Atômica (AFM, modelo SPM 9600, Shimadzu). As estruturas cristalinas das superfícies foram avaliadas através da técnica de difração de raios-X com o difratômetro (Modelo XRD-6000, Shimadzu, Japão) operando com tubo de alvo de cobre (radiação Cu-K α de $\lambda = 1,5406\text{\AA}$) em incidência rasante (GIXRD), em uma detecção de ângulo de incidência fixa (1°) com varredura de 2θ . As identificações das fases foram feitas com o auxílio do programa Match, baseado no International Centre for Diffraction Data (ICDD). Os grupos químicos dos discos tratados por CAP e controle foram avaliados 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 energia de passagem de 50 eV. Os espectros de alta resolução de regiões específicas foram adquiridos com uma energia de passagem de 10 eV. O sinal C 1s do carbono adventício em 285 eV foi usado como uma referência de energia interna.

6.3 Preparo e cultura bacteriana

O preparo da cultura bacteriana foi realizado utilizando cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As cepas foram cultivadas aerobiamente em meio sólido Brain Heart Infusion Broth (BHI, KASVI), a 37 °C em estufa bacteriológica, em 24 horas para formação das colônias. Após a formação das colônias, foram coletadas 4 colônias e diluídas em solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril para atingir uma densidade óptica de $0,150 \pm 0,003$, confirmada em leitor de microplacas a 600 nm (Leitora de Microplacas Multimodo Spectramax M2e, Molecular Devices, EUA).

6.3.1 Incubação das bactérias sobre os discos

Os discos foram acondicionados em placas de 24 poços com 50µL da solução bacteriana

sobre as superfícies durante 4h a 37°C em condições aeróbicas usando uma técnica adaptada de (ALVES et al., 2005). Após o tempo de incubação, foi executada a coleta da solução sobre as superfícies utilizando um swab estéril seguida de diluição com solução salina até a concentração 10^{-3} . Em seguida, foi utilizado 100 μ L das respectivas diluições em meio sólido Plate Count Agar (PCA) para plaquear e realizar a contagem das colônias.

6.3.2 Avaliação da morfologia e adesão bacteriana

Para avaliar a adesão das bactérias foi adicionado 1 mL de suspensão bacteriana 10^8 cels/mL sobre as superfícies, em seguida foram incubadas durante 2 horas a temperatura de 37°C em estufa bacteriológica. Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato (PBS) para remoção das bactérias não aderidas. A fixação foi realizada com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 (PBS), em temperatura ambiente durante 2 horas, seguida de pós-fixação com tetróxido de ósmio 1% em PBS por 2h. Por conseguinte, realizou-se uma 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 um filme de ouro 9 mm (Q150R ES, Quorum Technologies Ltd., Laughton, East Sussex, England) para permitir a visualização no microscópio eletrônico de varredura (SEM-SSX 550 Superscan, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão). As colônias bacterianas foram medidas utilizando Image J (NUNES FILHO et al., 2018). Para avaliar os resultados do estado de colonização das bactérias foi utilizado como ponto de corte o tamanho da *P. aeruginosa* que é de aproximadamente $0,5 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$ (comprimento x largura), esse tamanho foi adotado para medir a presença ou ausência de colônias (ALVES et al., 2005). Os histogramas de frequência de tamanhos colônias foram definidos na faixa de $<1 \mu\text{m}^2$ (bactérias individuais) e $1-5 \mu\text{m}^2$ (colônias), após 2h de cultivo (ALVES et al., 2005).

6.4 Coleta e preparação do sangue:

O projeto foi aprovado no comitê de ética e pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN (Nº 3.637.781). O procedimento de coleta de sangue foi conduzido em conformidade com as instruções do Manual de Técnicas de Coleta de Sangue do Ministério da Saúde (2001). O volume de 20 mL foi coletado de um participante voluntário maior de 18 anos, clinicamente saudável, sem doenças sistêmicas e/ou congênitas, que não estava em tratamento ou

fazendo uso de medicações para controle de patologias virais, bacterianas ou fúngicas, que desejou ser doador para o fim exclusivo deste experimento, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O sangue foi coletado por punção venosa e mantido no anticoagulante citrato de sódio 3,2% na proporção de 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante. Posteriormente, o sangue total foi fracionado para se obter o plasma pobre em plaquetas (PPP) e plasma rico em plaquetas (PRP) através da centrifugação do sangue a 3000 rpm por 15 minutos.

6.4.1 Análise de alterações nos parâmetros sanguíneos:

Os parâmetros hematológicos foram obtidos antes e depois da exposição do sangue sobre as superfícies dos discos com o controle sendo a superfície do poço da placa de cultura de 24 poços, utilizado um analisador hematológico automático MAXCEL VET (MEDMAX, Brasil). Foram avaliados os números de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e hemácias. Para tanto, foi utilizado 1mL de sangue total que foi aplicado sobre as superfícies dos discos de titânio tratados e não tratados (15) por 30 min em incubadora (CO₂) a 37°C. A cada 10mn foi realizado homogeneização do sangue nos discos. Os resultados foram comparados a amostra de sangue que não sofreu exposição a superfície de Ti e controle (poço da placa).

6.4.2 Análise do Tempo de Protrombina (TP) e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa):

Inicialmente, os discos foram distribuídos em quintuplicata nas placas de 24 poços e sobre a superfície distribuído o PPP de acordo com os tempos analisados, posteriormente foram incubados a 37°C por 30 min em atmosfera úmida. Após a incubação, as medidas do Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) foram realizadas utilizando coagulômetro semi-automatizado Max CLOT (MEDMAX, Brasil), sendo para o TP adicionado 100 µL do PPP e 200 µL do reagente TP Líquida (LabTest diagnóstica, Brasil) composto por extrato de cérebro de coelho (fator tecidual) e cloreto de cálcio, e obtido o tempo e a atividade de TP. Já para o TTPa, serão adicionados 100 µL do PPP, 100 µL do reagente cefalina TTPa Líquida (LabTest diagnóstica, Brasil) e adicionado 200 µL do cloreto de cálcio, e obtido o tempo de formação do coágulo.

6.4.3 Avaliação da Adesão de Plaquetas

Para a adesão plaquetária o sangue foi fracionado para se obter o plasma rico em plaquetas (PRP) através da centrifugação do sangue a 2000 rpm por 5 minutos. Foram distribuídos 800µL do PRP nos discos de cada grupo (triplicata) e incubado por 60 minutos a 37°C em atmosfera úmida (LIU et al., 2016b). Após a incubação, o plasma sobrenadante foi aspirado, os discos lavados com PBS para remoção das plaquetas não aderidas e em seguida fixados em glutaraldeído 2,5% em PBS em temperatura ambiente durante 6h. Na sequência, os discos foram pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% em PBS durante 1h, desidratação em concentrações crescentes de etanol e metalizados com uma camada de ouro de 9nm pela técnica de *sputtering* (Q150R ES, Quorum Technologies Ltd., Laughton, East Sussex, England) e observadas no microscópio eletrônico de varredura (SEM-SSX 550 Superscan, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japão). Com as micrografias obtidas foram selecionados 3 campos aleatórios por superfície e analisado os seguintes parâmetros nas plaquetas isoladas e nos agregados: número de plaquetas e agregados por área, tamanho e formação dos agregados, diâmetro de feret, perímetro e circularidade que foram determinados pelo software imageJ. A circularidade (relação diâmetro menor/diâmetro maior) indica o grau de ativação das plaquetas pela presença de pseudópodes e morfologia assimétrica, diâmetro de feret-max associa o diâmetro mínimo/máximo em relação ao eixo horizontal da imagem, indicando o quanto as plaquetas e agregados estão espalhados nas amostras ao longo de uma direção, o perímetro determina o tamanho dos agregados e plaquetas (BRAZ et al., 2022; DRAŽIĆ; SLADOJE; LINDBLAD, 2016).

6.5 Análise estatística

As análises de caracterização das superfícies foram realizadas em triplicata, os testes microbiológicos e hematológicos foram realizados em quintuplicata para superfície de Ti controle e superfícies tratadas utilizando placas de 24 poços. Os dados foram avaliados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Então, submetidos a análise de variância T-student e ANOVA, seguida pelo teste Tukey-Kramer com significância $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterização das superfícies

Os resultados dos ângulos de contato das superfícies (Tabela 1) indica que todas as superfícies são hidrofílicas $<90^\circ$. Porém, as superfícies tratadas por CAP possui um ângulo de contato menor quando comparado as amostras sem tratamento e nitretadas ($13^\circ \pm 1.8$ vs. $65^\circ \pm 4.3$; $77^\circ \pm 2.4$) respectivamente, ($p < 0,0001$).

Os dois tratamentos mostraram a formação de diferentes perfis de rugosidade (Tabela 2). Nas amostras tratadas por CAP e polidas a rugosidade média (Ra) foi, significativamente, menor quando comparada às nitretadas ($4,89 \times 27,72$). Porém houve a formação de picos e vales (Rp e Rz) maiores comparado as amostras sem tratamento. As formas dos picos avaliados pela razão $R_p / R_z > 0.5$ indicou que todas as amostras possuíam picos pontiagudos (Figura 6).

A GIXRD indicou que houve mudanças na estrutura cristalina das amostras nitretadas com incorporação do nitrogênio no titânio, formando nitretos de titânio (TiN) (Figura 7). Os espectros no XPS indicam que ocorreu redução de cátions de Ti^{4+} (56.1) para Ti^{3+} (43.9) em maiores quantidades nas amostras tratadas por CAP quando comparada as amostras sem tratamento Ti^{4+} (63.6) para Ti^{3+} (36.4) (Figura 8). Além disso, é possível observar nos espectros o aumento das ligações de OH^- nas amostras tratadas por CAP. As superfícies nitretadas não foram caracterizadas pelo XPS devido a análise de GIXRD ter mostrado as modificações em sua estrutura.

Tabela 1 – ângulos de contato das superfícies de Ti polida, CAP e nitretada.

Sem tratamento	CAP	Nitretada
$65^\circ \pm 4,3^a$	$13^\circ \pm 1,8^b$	$77^\circ \pm 2,4^c$

^{a-b-c} diferenças entre as superfícies. Teste one-way ANOVA $p < 0,0001$.

Tabela 2 – Parâmetros de rugosidade (nm) das superfícies de titânio.

Superfície	Ra	Rp	Rz	Rp/Rz
Sem tratamento	$5,74 \pm 2,46^a$	$70,73 \pm 37,26^a$	$99,11 \pm 46,68^a$	$0,71 \pm 0,04$
Nitretada	$27,72 \pm 1,3^b$	$140,14 \pm 23,50^b$	$220,44 \pm 18,20^b$	$0,63 \pm 0,10$
CAP	$4,89 \pm 3,11^a$	$103,70 \pm 54,70^a$	$144,91 \pm 69,09^a$	$0,70 \pm 0,07$

^{a-b} diferenças entre as superfícies. Teste one-way ANOVA $p < 0,0001$

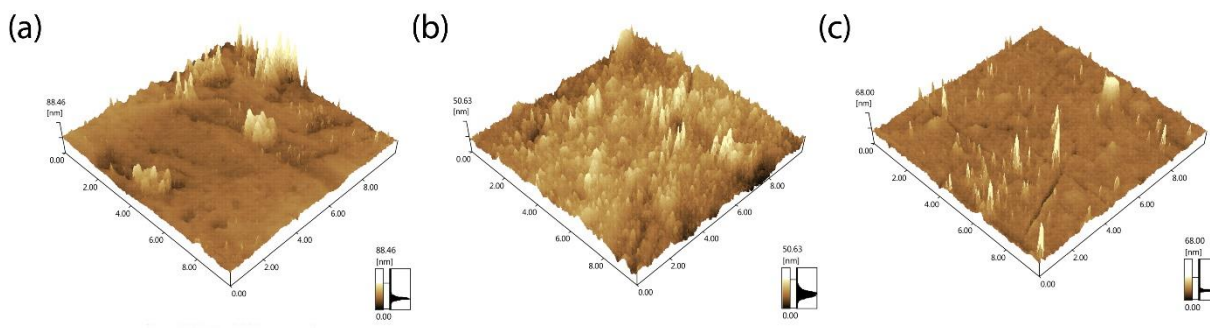


Figura 6 – AFM das superfícies de titânio. A) superfície sem tratamento. B) nitretada. C) Superfície tratada com CAP.

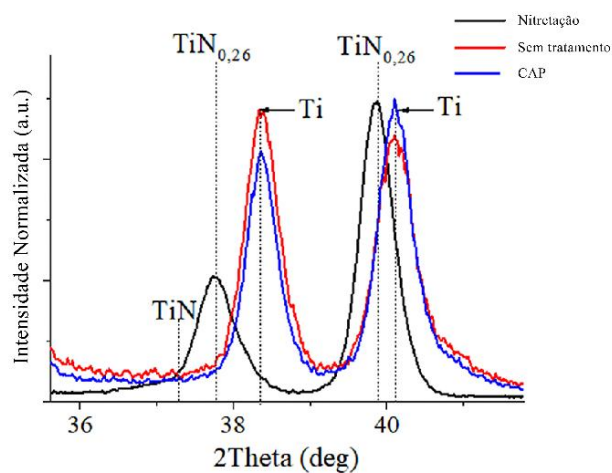


Figura 7 – Difratoograma de raio x com ângulo rasante (1°) 2 Theta. Espectros de cor preta – superfícies de Ti nitretada, espectros de cor vermelha – superfície de Ti não tratada, espectros de cor azul – superfície de Ti tratada com plasma CAP.

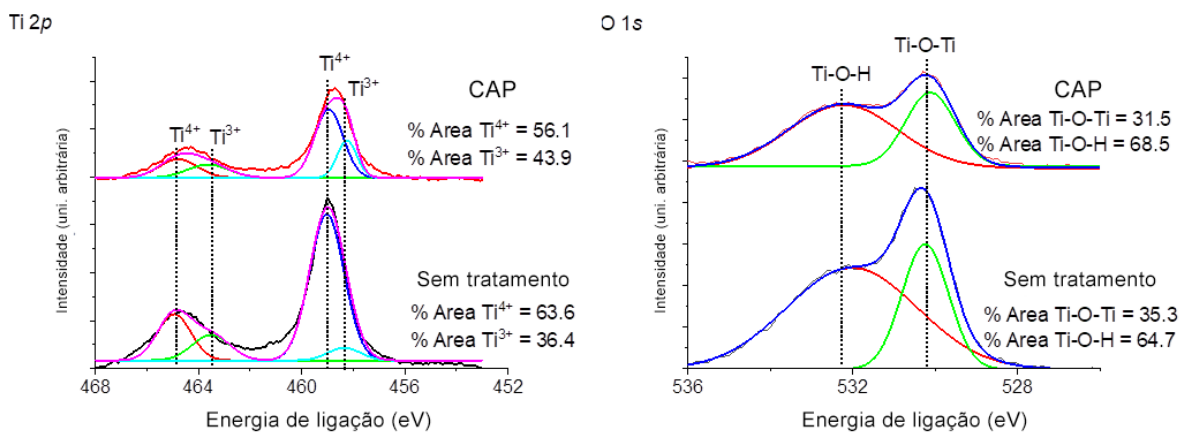


Figura 8 –Análise da espectroscopia de fotoelétrons por raios X das superfícies de titânio tratadas sem tratamento e tratadas com CAP.

7.2 Formação planctônico e adesão bacteriana

A capacidade da formação das colônias bacterianas após incubação diferiu em relação a cada superfície. As superfícies tratadas por CAP apresentaram menor número de unidades formadoras de colônias (324 ± 2.19 CFUs) quando comparado as superfícies sem tratamento e nitretadas (548 ± 2.19 CFUs) e (609 ± 1.38 CFUs) respectivamente (Figura 9A).

As amostras tratadas por CAP há ocorrência de bactérias, com pouca agregação entre as bactérias, sem formação de um biofilme primário, baixa adesão bacteriana e com poucos debris (Figura 9C). Já as superfícies sem tratamento e nitretadas, possuem um menor desempenho contra a adesão inicial das bactérias, pois tem a presença de uma concentração de início de formação de colônias bacterianas com debris celular (Figura 9 B e D).

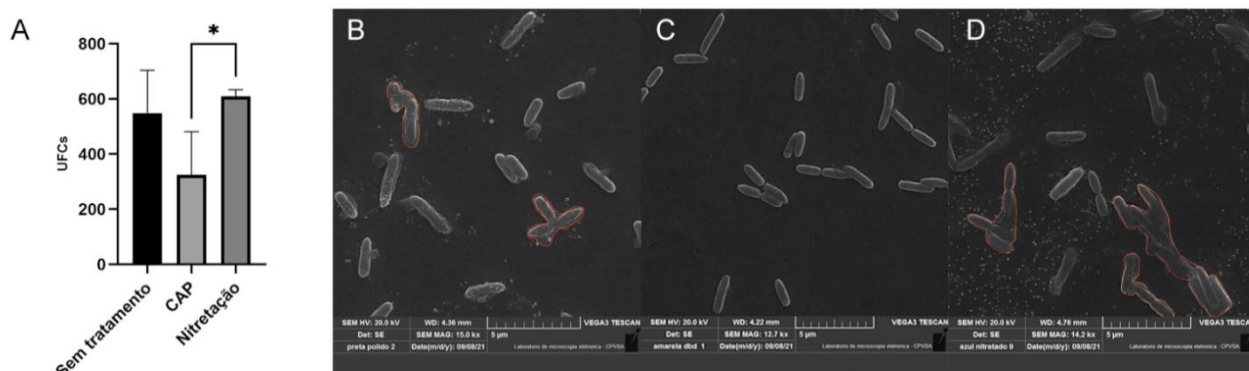


Figura 9 – A- Unidades formadoras de colônias de *P. aeruginosa* sobre as amostras de titânio tratados e não tratados. (B) Microscopia eletrônica de varredura das amostras sem tratamento, (C) CAP e (D) Nitretada. As linhas vermelhas mostram a formação de colônias e biofilme. * indica diferença entre os grupos. One-way ANOVA $p < 0,0001$.

Os resultados do estado de aglomeração das bactérias Fig.10 mostram que as superfícies tratadas por CAP (Fig.10B) possuem menor formação de colônias bacterianas <1 ($0,393$) quando comparado as amostras sem tratamento 1 - 5 ($1,316$) e nitretação 1 - 5 ($2,178$) (Fig.10A e C, respectivamente).

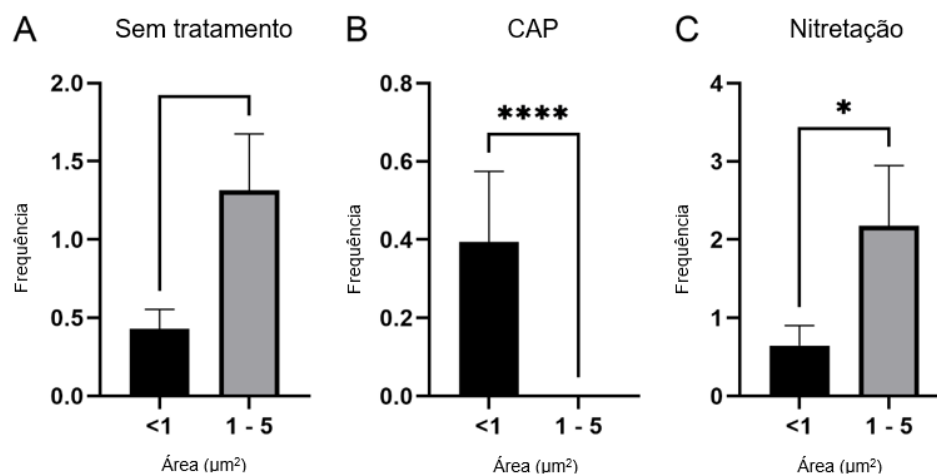


Figura 10 – Histograma das áreas ocupadas por colônias bacterianas. (A) não tratadas, (B) cap e (C) nitretação. <1 bactérias isoladas e 1 – 5 colônias bacterianas. * indica diferença entre os grupos. T-student $p < 0,05$.

7.3 Análise dos parâmetros sanguíneos

Os dados demonstram que nos tempos de protrombina (TP) as amostras tratadas por CAP e nitretação formaram coágulos mais rápidos comparado a amostra sem tratamento 11, 15 e 100 sec ($p < 0,0005$) respectivamente (Figura 11A). Já nos tempos de (TTPa) as amostras tratadas por CAP formaram coágulos mais rápidos em contraste com as amostras nitretadas e sem tratamento 8, 120 e 100 respectivamente ($p < 0,0005$) (Figura 11B). Não foram identificadas alterações significativas no hemograma (Figura 12).

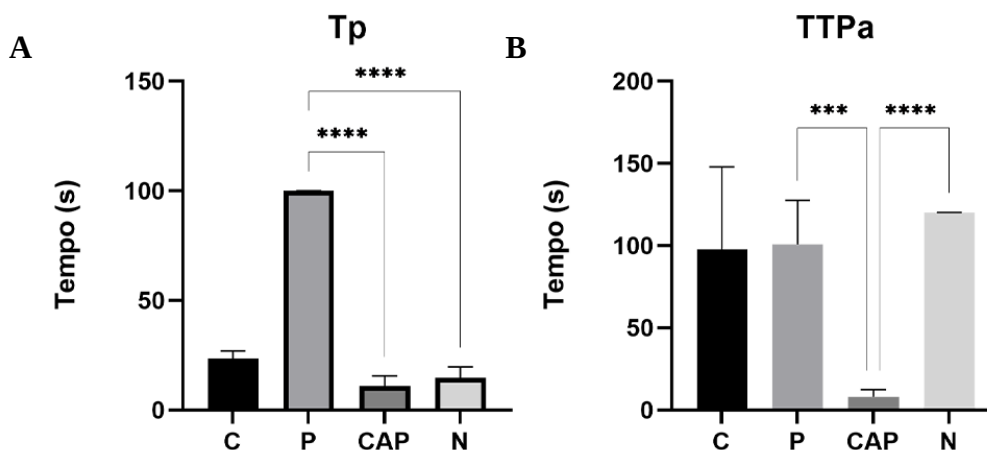


Figura 11 – Análise dos tempos de coagulação sobre superfícies controle, polidas, CAP e nitretação. (A) Tempos de coagulação de protrombina (TP) e (B) tromboplastina parcialmente ativada (TTPa). * indica diferença entre os grupos. one-way ANOVA $p < 0,0001$.

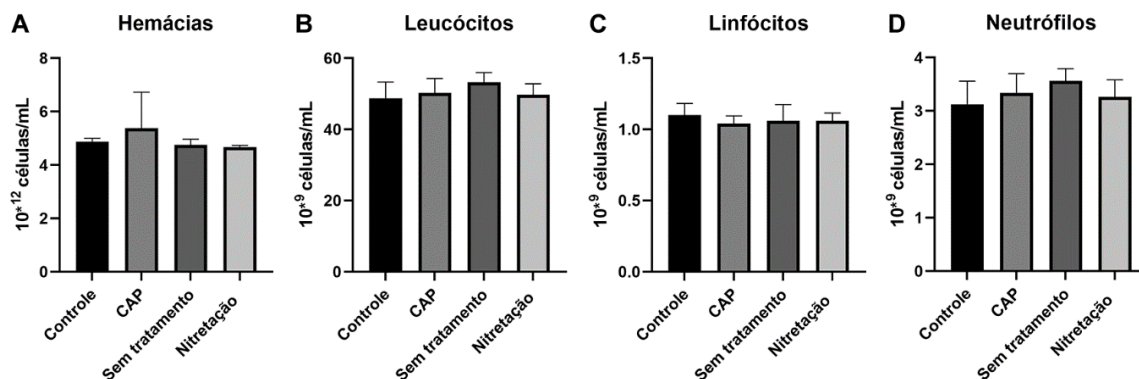


Figura 12 – Células sanguíneas cultivadas sobre amostras controle, cap, sem tratamento e nitretada. (A) hemácias, (B) leucócitos, (C) linfócitos e (D) neutrófilos. One-way ANOVA $p < 0,05$.

7.3.1 Análise de adesão plaquetária

As eletromicrografias das plaquetas cultivadas sobre as amostras revelaram a formação de trombos plaquetários distintos fig 13. As amostras de Ti tratadas por CAP apresentaram maior tamanho de trombo, ativação plaquetária e número de plaquetas aderidas (Figura 13B) quando comparado as amostras sem tratamento (Figura 13A e nitretada Figura 13C), respectivamente.

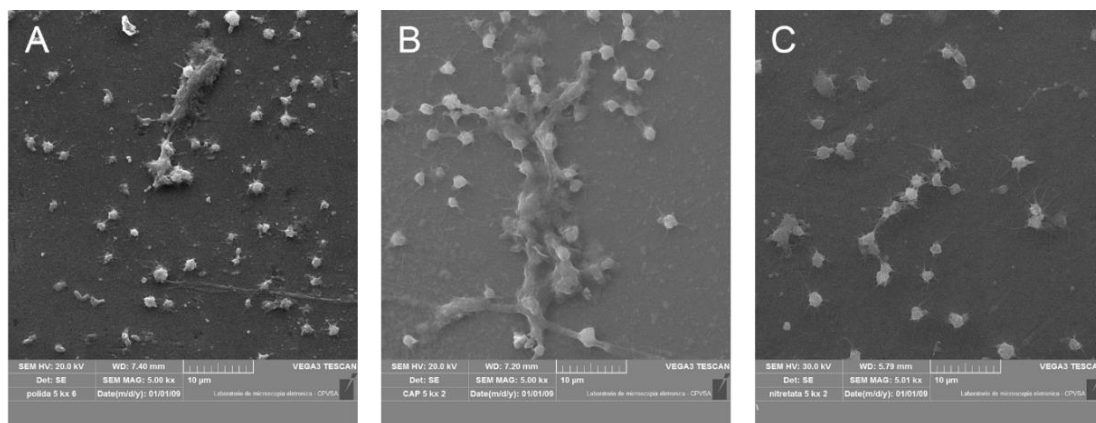


Figura 13 – análise da adesão plaquetária por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sem tratamento (A), CAP (B) e nitretação (C).

Os resultados das análises das micrografias da adesão plaquetária na Fig 14 mostram os seguintes achados. Nos parâmetros avaliados nas plaquetas isoladas a contagem das plaquetas em uma área de $58 \times 58 \mu\text{m}$ mostra maior número de plaquetas nas amostras polidas (44.111), quando comparado as amostras nitretadas (41.777) e CAP (39.400) (Fig 14.A). O diâmetro de feret indica que as superfícies tratadas por CAP ($2,98 \mu\text{m}$) permitem que as plaquetas possam ter uma maior

espraiamento/aderência sobre as superfícies, em comparação com as amostras nitretadas (2,64 μm) e polidas (2,12 μm) (Fig 14.B). Os resultados do tamanho das plaquetas avaliadas pelo perímetro mostram que as superfícies tratadas por CAP (10,7 μm) ativam as plaquetas aumentando o tamanho do citoplasma quando comparado aos valores das superfícies tratadas por nitretação (9,4 μm) e polidas (7,9 μm) (Fig 14.C). A área em μm^2 ocupada pelas plaquetas foram maiores para as superfícies tratadas por CAP (2,43 μm^2), e as amostras nitretadas (2,33 μm^2) e polidas (1,52 μm^2) ocupam áreas menores (Fig 14.D). A circularidade das plaquetas é maior para as superfícies nitretadas (0,39) e polidas (0,39) e menores valores para superfícies tratadas por CAP (0,27) (Fig 14.E).

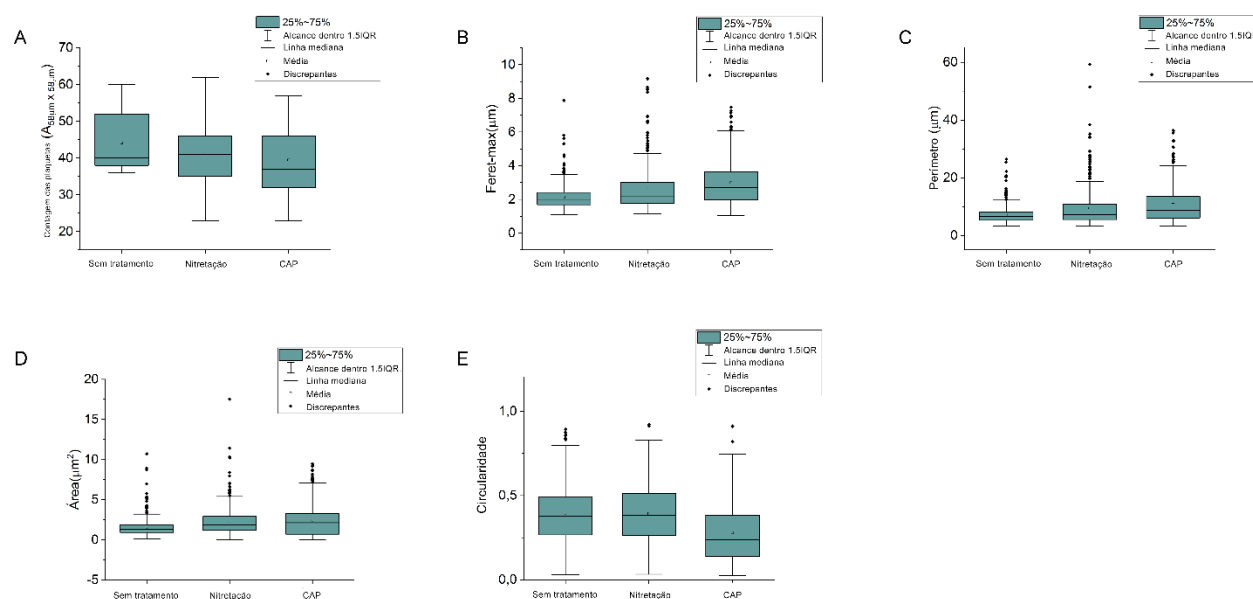


Figura 14 – análise das plaquetas isoladas sobre as superfícies polidas, CAP e nitretadas. A) Contagem das plaquetas em 58x58 μm , B) Diâmetro de feret-max (μm), C) Perímetro das plaquetas, D) Área (μm^2), E) Circularidade.

Os resultados dos parâmetros avaliados dos agregados são mostrados na Fig 15. Nos agregados formados em 58x58 μm sobre as superfícies mostram que as amostras tratadas por CAP (3,22 μm) possuem maior quantidade de agregados plaquetários quando comparado as amostras nitretadas (0,55 μm) e polidas (0 μm) (Fig 15.A). O perímetro mostra que as superfícies tratadas por CAP (85,12 μm) possuem agregados com maior tamanho quando comparado as amostras nitretadas (69,85 μm) (Fig 15.B). O feret-max indica que os agregados das amostras de CAP (14,204 μm) e nitretadas (14,191 μm) possuem espraiamento semelhante (Fig 15.C). A circularidade mostrou que as superfícies tratadas por CAP (0,10) possuem agregados com maior circularidade quando comparado as superfícies nitretadas (0,79) (Fig 15.D). A área em μm^2 que os

aglomerados ocupam são maiores para superfícies tratadas por CAP ($39,05 \mu\text{m}^2$) quando comparado a superfícies nitretadas ($34,22 \mu\text{m}^2$) (Fig 15.E).

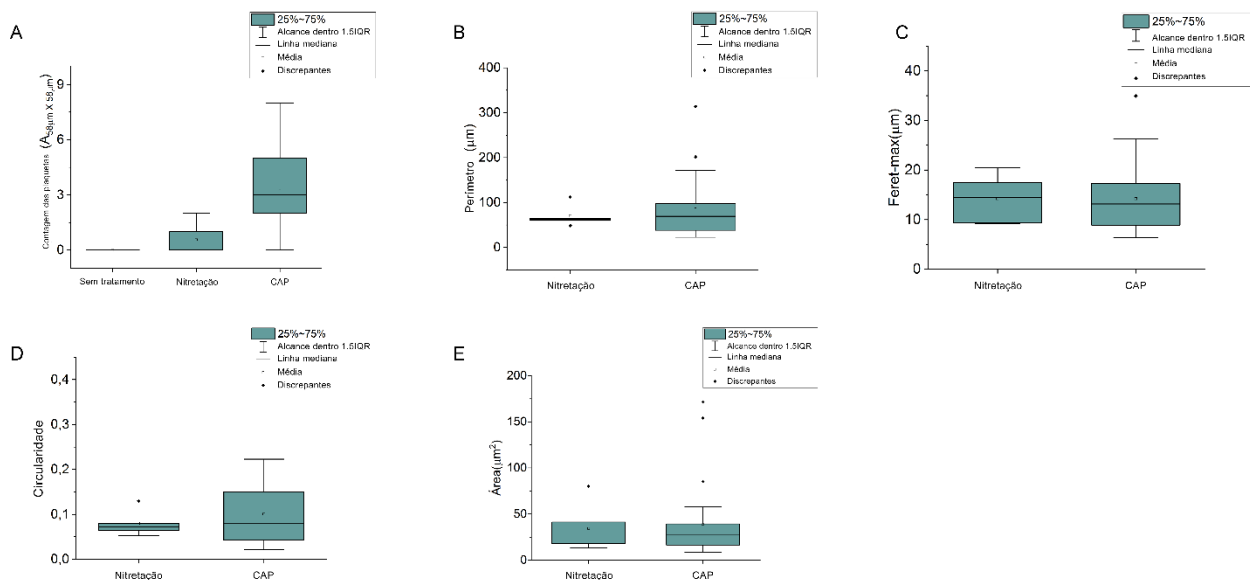


Figura 15 – análise dos agregados plaquetários sobre as superfícies polidas, CAP e nitretada. A) Contagem dos agregados plaquetários em $58 \times 58 \mu\text{m}$, B) Perímetro dos agregados (μm), C) Diâmetro de feret-max, D) Circularidade, E) Área (μm^2).

8 Discussão:

As propriedades das superfícies dos biomateriais como características morfológicas, composição química, propriedades elétricas e molhabilidade regulam a adsorção das proteínas e o ancoramento celular, sendo fatores cruciais para biocompatibilidade e que influencia a adesão bacteriana, coagulação e/ou ativação plaquetária (WANG et al., 2021). Por isso, utilizamos CAP e nitretação por método LPP para aprimorar as propriedades superfície de Ti a fim de reduzir a adesão bacteriana e aumentar seu potencial biocompatível. Dentre as propriedades das superfícies as análises dos espectros do XPS mostraram-se distintos entre os tratamentos.

Nas superfícies tratadas por CAP, os espectros do XPS revelaram a formação de defeitos que são imperfeições no arranjo regular dos átomos. Os defeitos são causados quando o tratamento CAP é aplicado sobre as superfícies ocorrendo a redução dos cátions Ti (IV) ao estado Ti (III) ejetando os átomos de oxigênio da superfície ocorrendo a formação de vacâncias (HASHIMOTO; TANAKA, 2002). Dessa maneira, as moléculas de água presentes na umidade atmosférica podem ocupar essas lacunas de oxigênio, produzindo grupos -OH, tornando a superfície hidrofílica

(HORLYCK et al., 2019; KUSCER et al., 2008; SÉBASTIEN, 2012). Logo, quanto mais hidrofílica a superfície, maior contato com a água vai ocorrer e mais moléculas orgânicas podem ser ligadas à superfície aumentando a adesão, proliferação e comunicação celular (JEONG et al., 2017). Já no tratamento por nitretação é possível identificar a cristalinidade das superfícies de Ti indicando as fases de nitreto TiN e TiN_{0.26}. A formação do filme de TiN pode melhorar propriedades como alta dureza, resistência ao desgaste e resistência à corrosão, e isso implica diretamente na melhora da biocompatibilidade (SUCIU et al., 2021; VAN HOVE et al., 2015). Logo, esse tratamento pode melhorar o processo de mimetização do ambiente tecidual em que as células se encontram in vivo (RAFIEE; NAFFAKH-MOOSAVY; TAMJID, 2020).

Esse microambiente semelhante ao tecidual também pode ser influenciado pelos parâmetros de molhabilidade e rugosidade das superfícies dos materiais (MAJHY; PRIYADARSHINI; SEN, 2021). A molhabilidade obtida das medições do ângulo de contato formado nas amostras, confirmam que todos os tratamentos geraram superfícies hidrofílicas ($\theta^* < 90^\circ$). No entanto, as amostras tratadas por CAP ($13^\circ \pm 1.8$) possuem um ângulo de contato próximo ao de superfícies super hidrofílicas ($\theta^* < 10^\circ$) devido ao aumento de grupos -OH na sua estrutura após o tratamento por CAP (SÁNCHEZ-BODÓN et al., 2022). A alta hidrofiliabilidade das superfícies de CAP pode estar envolvida em dois mecanismos que impede proliferação e adesão bacteriana. O primeiro mecanismo é relacionado ao bloqueio da ativação da proteína WspA para formação do biofilme inicial (RUPP et al., 2018). A formação do biofilme ocorre quando a bactéria *P. aeruginosa* expressa a proteína de adesão WspA (LEE; YOON, 2017). Essa proteína ao detectar o ambiente produz o biofilme bacteriano, que permite a adesão e proliferação bacteriana nas superfícies. O segundo mecanismo está relacionado a diferença de pressão do meio celular externo para o meio interno causado pela alta hidrofiliabilidade pode causar choque osmótico (desidratação, reidratação) ocorrendo modificações na estrutura fosfolipídica da membrana celular causando a morte (SOCHOCKA; BORATYŃSKI, 2011).

A topografia da superfície nitretada demonstrou um perfil de maior rugosidade quando comparado ao CAP. Em contrapartida, as amostras tratadas por CAP possuem perfil de rugosidade média baixa (R_a) e padronizadas em nanoescala. A formação das unidades formadoras de colônias e colônias bacterianas (Figura 9) nos mostra que as superfícies tratadas por CAP possuem baixa formação de colônias bacterianas (Fig. 9C) quando comparada com as outras superfícies (Fig. 9B e D). A alta rugosidade nas amostras nitretada pode implicar em uma maior adesão bacteriana pois

existe sulcos, arranhões e depressões que aumentam a superfície de contato das bactérias com o material (HADJESFANDIARI et al., 2016). Já a baixa rugosidade nas amostras de CAP induziu as bactérias a permanecer em um estado planctônico por possuir pouca superfície de contato (BAZAKA; CRAWFORD; IVANOVA, 2011; CRAWFORD et al., 2012). Devido as superfícies de CAP possuir uma alta hidrofiliabilidade e padrões de rugosidade em nanoescala as bactérias não conseguem se comunicar e ativar proteínas de adesão, entrando em estado planctônico. (CONNOR et al., 2013; INOUE-SAKAMOTO et al., 2018).

Além da redução de bactérias o sucesso das superfícies dos implantes ortopédicos requer a formação de coágulos (SHIU et al., 2014). Os resultados dos tempos de coagulação revelaram que as duas condições de tratamento nas amostras iniciam a cascata de coagulação ativando a via extrínseca (Tp). A ativação dessa via é dependente da biodisponibilidade de fatores ativadores orgânicos presentes no sangue, como o fator tecidual. Porém, somente as amostras tratadas por CAP possuem a capacidade de ativar a via intrínseca (TTPa) e finalizar a formação do coágulo (HUNG et al., 2016; KARAGKIOZAKI et al., 2009). A presença de OH^- na superfície tratada pelo CAP pode aumentar a sua negatividade o que favorece a ativação da via intrínseca (HUNG et al., 2016). Logo, não apenas a presença de proteínas como fibrinogênio, globulina e albumina como também as características das superfícies dos materiais são responsáveis por controlar a taxa de adsorção que favorece o processo de formação do coágulo completo (LI; ZHANG; HUANG, 2017; MANIVASAGAM et al., 2021).

Além disso, os resultados da adesão plaquetária mostraram que as superfícies tratadas por CAP apresentaram aumento da ativação plaquetária, densidade plaquetária, formação de trombos com maior tamanho quando comparado as amostras sem tratamento e nitretada. O que permite a criação de um microambiente com fatores pró-angiogênico (VEGF) que induzirão a formação de novos vasos sanguíneos aumentando a osteocondução, formação óssea e remodelação melhorando a integração do implante ósseo no tecido (BURKHARDT et al., 2017; HU; OLSEN, 2016; STREET et al., 2002). No entanto, as amostras nitretadas demonstraram ter baixa adesão e densidade plaquetária e baixa formação de coágulos consistentes. As propriedades antitrombogênicas apresentadas pelas amostras nitretadas estão relacionadas com a sua rugosidade, formação do filme de TiN e seu valor de hidrofiliabilidade. Tais propriedades demonstram ser um tratamento promissor para o desenvolvimento de implantes cardiovasculares como stents, já que não é interessante que ocorra a formação de coágulos que impedem o fluxo sanguíneo (LIU, 2018;

NAYAK et al., 2018; STURTZEL, 2017).

Além das diferenças significativas apresentadas pelos métodos de plasma os mesmos possuem diferenças em custos e praticidade para aplicação clínica (BÁRDOS; BARÁNKOVÁ, 2008). Para o funcionamento do dispositivo de plasma de baixa pressão é necessário um laboratório planejado para o seu funcionamento, pois, necessita de uma câmara hermeticamente fechada, tubulações de gases, bombas a vácuo, grandes fontes de energia e altas temperaturas como também uma mão de obra especializada (FRASCIO et al., 2019; KURUP; DHATRAK; KHASNIS, 2020; SETSUHARA, 2016b). Devido a esses fatores, o custo para desenvolvimento e aplicação do dispositivo de baixa pressão em ambientes clínicos possui maior custo e é de difícil aplicação.

Diferente do plasma de baixa pressão o dispositivo de CAP possui vantagens para aplicações clínicas (SETSUHARA, 2016b). Sua estrutura consiste em um tubo de quartzo que pode ser adaptado a uma caneta, fonte de energia, gás de empuxo, eletrodos e pode ser aplicado pelo próprio profissional que está dentro do ambiente cirúrgico, sendo mais acessível e econômico quando comparado ao método de baixa pressão (CHOI; UHM; KAUSHIK, 2021b; TURKOGLU SASMAZEL; ALAZZAWI; KADIM ABID ALSAHIB, 2021b). Pensando nisso, este trabalho propôs desenvolver uma logística para aplicação do método de CAP, realizando o tratamento das superfícies dentro do grau cirúrgico após a autoclavagem, trazendo maior biossegurança e aumentando a biocompatibilidade do implante de Ti durante o processo de implantação.

9 Conclusão:

Superfícies de titânio foram tratadas por plasma de baixa pressão e CAP obtendo diferentes características influenciando na resposta de adesão bacteriana e formação de coágulos. As superfícies tratadas por CAP possuem a capacidade de evitar adesão e proliferação bacteriana e tem a capacidade de formar coágulos de forma rápida. As amostras tratadas por nitretação tiveram um tempo maior para formação de coágulos e uma baixa capacidade de evitar a adesão bacteriana quando comparada ao tratamento de CAP. O tratamento por CAP é um método utilizado em ambientes clínicos por ser acessível e econômico. Revelando ser uma nova abordagem promissora para aumentar a biossegurança e melhorar a biocompatibilidade de implantes de Ti.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUR, A. et al. Influence of plasma functionalization treatment and gold nanoparticles on surface chemistry and wettability of reactive-sputtered TiO₂ thin films. **Applied Surface Science**, v. 458, p. 678–685, 15 nov. 2018.
- AIRES, M. DE M. et al. Minimizing *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to titanium surfaces by a plasma nitriding process. **AIMS Biophysics**, v. 4, n. 1, p. 19–32, 2017.
- ALVES, C. et al. Nitriding of titanium disks and industrial dental implants using hollow cathode discharge. **Surface and Coatings Technology**, v. 194, n. 2–3, p. 196–202, 2005.
- ALVES JUNIOR, C. et al. Changing the characteristics of the nitrided layer using three different plasma configurations. **Revista Materia**, v. 24, n. 2, p. 0–7, 2019.
- APIFARMA. Infecções associadas a cuidados de saúde- Contributo da indústria de meios de diagnóstico in vitro para o seu Controlo. n. June, p. 79, 2016.
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 397–409, 2018a.
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: Adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 397–409, 2018b.
- BÁRDOS, L.; BARÁNKOVÁ, H. Plasma processes at atmospheric and low pressures. **Vacuum**, v. 83, n. 3, p. 522–527, 2008.
- BÁRDOS, L.; BARÁNKOVÁ, H. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 23, p. 6705–6713, 2010.
- BARTHES, J. et al. Review: the potential impact of surface crystalline states of titanium for biomedical applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 423–437, 2018.
- BAZAKA, K.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness? **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 9, p. 1103–1114, set. 2011.
- BERNHARDT, T. et al. **Plasma Medicine: Applications of Cold Atmospheric Pressure Plasma in Dermatology. Oxidative Medicine and Cellular Longevity** Hindawi Limited, , 2019.
- BLOK, S. L. J.; ENGELS, G. E.; VAN OEVEREN, W. In vitro hemocompatibility testing: The importance of fresh blood . **Biointerphases**, v. 11, n. 2, p. 029802, 2016.
- BRAZ, D. C. et al. Effect of the ratio of oxygen to nitrogen on the physicochemical and biocompatibility properties of titanium oxynitride. **Materials Chemistry and Physics**, v. 278, n. November 2021, 2022.
- BRAZ, J. K. F. S. et al. Plasma nitriding under low temperature improves the endothelial cell

biocompatibility of 316L stainless steel. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 4–5, p. 503–510, 1 maio 2019.

BUETTNER, K. M.; VALENTINE, A. M. Bioinorganic chemistry of titanium. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 3, p. 1863–1881, 2012.

BURKHARDT, M. A. et al. Clot-entrapped blood cells in synergy with human mesenchymal stem cells create a pro-angiogenic healing response. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 10, p. 2009–2023, 2017.

CHEN, Z. et al. **Cold atmospheric plasma delivery for biomedical applications**. **Materials Today** Elsevier B.V., 1 abr. 2022.

CHEVALIER, S. et al. **Structure, function and regulation of Pseudomonas aeruginosa porins**. **FEMS Microbiology Reviews** Oxford University Press, 1 set. 2017.

CHOI, E. H.; UHM, H. S.; KAUSHIK, N. K. Plasma bioscience and its application to medicine. **AAPPS Bulletin**, v. 31, n. 1, 2021a.

CHOI, E. H.; UHM, H. S.; KAUSHIK, N. K. Plasma bioscience and its application to medicine. **AAPPS Bulletin**, v. 31, n. 1, 2021b.

CONNOR, J. R. O. et al. production. v. 86, n. 3, p. 720–729, 2013.

CRAWFORD, R. J. et al. **Surface topographical factors influencing bacterial attachment**. **Advances in Colloid and Interface Science**, 1 nov. 2012.

CRONE, S. et al. The environmental occurrence of Pseudomonas aeruginosa. **APMIS**, v. 128, n. 3, p. 220–231, 1 mar. 2020.

DRAŽIĆ, S.; SLADOJE, N.; LINDBLAD, J. Estimation of Feret’s diameter from pixel coverage representation of a shape. **Pattern Recognition Letters**, v. 80, p. 37–45, 1 set. 2016.

DUBEY, S. K. et al. **Cold atmospheric plasma therapy in wound healing**. **Process Biochemistry** Elsevier Ltd, 1 jan. 2022.

ERMOLAEVA, S. A. et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 75–83, 2011.

FAN, Q. et al. Implantable blood clot loaded with BMP-2 for regulation of osteoimmunology and enhancement of bone repair. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 11, p. 4014–4026, 1 nov. 2021.

FRASCIO, M. et al. The use of low pressure plasma surface modification for bonded joints to assembly a robotic gripper designed to be additive manufactured. **Procedia Structural Integrity**, v. 24, p. 204–212, 2019.

FRÍAS, E. et al. Evaluation of Cold Atmospheric Pressure Plasma (CAPP) and plasma-activated water (PAW) as alternative non-thermal decontamination technologies for tofu: Impact on microbiological, sensorial and functional quality attributes. **Food Research International**, v. 129, p. 108859, 2020.

GAN, L. et al. **Cold atmospheric plasma applications in dermatology: A systematic review**. *Journal of Biophotonics* Wiley-VCH Verlag, , 1 mar. 2021.

GEIPEL, U.; HERRMANN, M. Das infizierte implantat: Teil 1. Bakteriologie. *Orthopade*, v. 33, n. 12, p. 1411–1428, 2004.

GODSCHALK, T. C. et al. Fibrin clot formation and fibrinolysis in patients with a history of coronary stent thrombosis. *Thrombosis Research*, v. 143, p. 58–62, 1 jul. 2016.

GUIMARÃES, I. P. et al. Double barrier dielectric plasma treatment of leucaena seeds to improve wettability and overcome dormancy. *Seed Science and Technology*, v. 43, n. 3, p. 526–530, 2015.

GURRAPPA, I. Characterization of titanium alloy Ti-6Al-4V for chemical, marine and industrial applications. *Materials Characterization*, v. 51, n. 2–3, p. 131–139, 2003.

HADJESFANDIARI, N. et al. Effect of texture of platelet bags on bacterial and platelet adhesion. *Transfusion*, v. 56, n. 11, p. 2808–2818, 1 nov. 2016.

HASHIMOTO, S.; TANAKA, A. Alteration of Ti 2p XPS spectrum for titanium oxide by low-energy Ar ion bombardment. *Surface and Interface Analysis*, v. 34, n. 1, p. 262–265, 2002.

HICKOK, N. J.; SHAPIRO, I. M.; CHEN, A. F. The Impact of Incorporating Antimicrobials into Implant Surfaces. *Journal of Dental Research*, v. 97, n. 1, p. 14–22, 2018.

HILTUNEN, A. K.; VUORELA, P. M.; FALLARERO, A. Bisphosphonates offer protection against prosthetic joint infections caused by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, v. 40, p. 136–141, 2017.

HORLYCK, J. et al. Plasma treating mixed metal oxides to improve oxidative performance via defect generation. *Materials*, v. 12, n. 7, p. 1–14, 2019.

HU, K.; OLSEN, B. R. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *Journal of Clinical Investigation*, v. 126, n. 2, p. 509–526, 2016.

HUANG, H. H. et al. Blood Coagulation on Titanium Dioxide Films with Various Crystal Structures on Titanium Implant Surfaces. *Cells*, v. 11, n. 17, 1 set. 2022.

HUNG, W. C. et al. Oxygen-implanted induced formation of oxide layer enhances blood compatibility on titanium for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, v. 68, p. 523–529, 2016.

INOUE-SAKAMOTO, K. et al. Characterization of extracellular matrix components from the desiccation-tolerant cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 64, n. 1, p. 15–25, 2018.

JEONG, W. S. et al. Bacterial attachment on titanium surfaces is dependent on topography and chemical changes induced by nonthermal atmospheric pressure plasma. *Biomedical Materials (Bristol)*, v. 12, n. 4, 2017.

KARAGKIOZAKI, V. et al. Atomic force microscopy probing platelet activation behavior on titanium nitride nanocoatings for biomedical applications. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 64–72, 2009.

KIM, K. N. et al. Atmospheric pressure plasmas for surface modification of flexible and printed electronic devices: A review. **Thin Solid Films**, v. 598, p. 315–334, 2016.

KOO, H. et al. Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740–755, 2017.

KRÖGER, N. et al. Hemocompatibility of plasma electrolytic oxidation (PEO) coated Mg-RE and Mg-Zn-Ca alloys for vascular scaffold applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 92, n. November 2017, p. 819–826, 2018.

KULKARNI, M. et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 26, n. 6, 2015.

KURUP, A.; DHATRAK, P.; KHASNIS, N. Surface modification techniques of titanium and titanium alloys for biomedical dental applications: A review. **Materials Today: Proceedings**, v. 39, n. xxxx, p. 84–90, 2020.

KUSCER, D. et al. The effect of the valence state of titanium ions on the hydrophilicity of ceramics in the titanium-oxygen system. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 28, n. 3, p. 577–584, 2008.

KWAAN, H. C. Complications of Implanted Nonbiologic Devices--An Overview. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v. 44, n. 1, p. 7–11, 2018.

LEE, K.; YOON, S. S. Pseudomonas aeruginosa Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 1053–1064, 2017.

LI, J.; ZHANG, K.; HUANG, N. **Engineering Cardiovascular Implant Surfaces to Create a Vascular Endothelial Growth Microenvironment**. [s.l.: s.n.]. v. 12

LIN, S. P. et al. **Applications of atmospheric cold plasma in agricultural, medical, and bioprocessing industries**. **Applied Microbiology and Biotechnology** Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, , 1 dez. 2022.

LIU, H. et al. Improving hemocompatibility and accelerating endothelialization of vascular stents by a copper-titanium film. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 1175–1182, dez. 2016a.

LIU, H. et al. Improving hemocompatibility and accelerating endothelialization of vascular stents by a copper-titanium film. **Materials Science and Engineering: C**, v. 69, p. 1175–1182, dez. 2016b.

LIU, H. Q. **Improving the hemocompatibility of stents**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2018.

LIU, Z. et al. Intraoperative interventions for preventing surgical site infection: An overview of Cochrane Reviews. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2018, n. 2, 2018.

LYU, S. et al. Titanium as a beneficial element for crop production. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 1–19, 2017.

MAH, T. F. et al. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 306–310, 2003.

MAI-PROCHNOW, A. et al. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 6, p. 508–517, 2014.

MAI-PROCHNOW, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–16, 2015.

MAJHY, B.; PRIYADARSHINI, P.; SEN, A. K. Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth-facile surface modification for enhanced cell culture. **RSC Advances**, v. 11, n. 25, p. 15467–15476, 2021.

MANIVASAGAM, V. K. et al. Surface modification strategies to improve titanium hemocompatibility: A comprehensive review. **Materials Advances**, v. 2, n. 18, p. 5824–5842, 2021.

MANIVASAGAM, V. K.; POPAT, K. C. In Vitro Investigation of Hemocompatibility of Hydrothermally Treated Titanium and Titanium Alloy Surfaces. 2020.

MARTÍ, M. et al. Calcium alginate/graphene oxide films: Reinforced composites able to prevent *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* infections with no cytotoxicity for human keratinocyte HaCaT cells. **European Polymer Journal**, v. 110, p. 14–21, 2019.

MATOS, A. O. et al. Three-species biofilm model onto plasma-treated titanium implant surface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 354–366, 2017.

MODIC, M. et al. Targeted plasma functionalization of titanium inhibits polymicrobial biofilm recolonization and stimulates cell function. **Applied Surface Science**, v. 487, n. December 2018, p. 1176–1188, 2019.

MOURA, C. E. B. et al. Effect of plasma-nitrided titanium surfaces on the differentiation of pre-osteoblastic cells. **Artificial Organs**, v. 43, n. 8, p. 764–772, 2019.

NAUJOKAT, H. et al. Surface conditioning with cold argon plasma and its effect on the osseointegration of dental implants in miniature pigs. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 3, p. 484–490, 2019.

NAYAK, S. K. et al. Insight into point defects and impurities in titanium from first principles. **npj Computational Materials**, v. 4, n. 1, 2018.

NUNES FILHO, A. et al. Titanium Surface Chemical Composition Interferes in the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. **Artificial Organs**, v. 42, n. 2, p. 193–199, 2018.

OSME, S. F. et al. Costs of healthcare-associated infections to the Brazilian public Unified Health System

in a tertiary-care teaching hospital: a matched case–control study. **Journal of Hospital Infection**, v. 106, n. 2, p. 303–310, 2020.

PINHEIRO, M. R. S. et al. Pseudomonas aeruginosa infections: Factors relating to mortality with emphasis on resistance pattern and antimicrobial treatment. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 6, p. 509–515, 2008.

RAFIEE, K.; NAFFAKH-MOOSAVY, H.; TAMJID, E. The effect of laser frequency on roughness, microstructure, cell viability and attachment of Ti6Al4V alloy. **Materials Science and Engineering C**, v. 109, n. January, 2020.

RAINES, A. L. et al. Regulation of angiogenesis during osseointegration by titanium surface microstructure and energy. **Biomaterials**, v. 31, n. 18, p. 4909–4917, 1 jun. 2010.

RUPP, F. et al. Surface characteristics of dental implants: A review. **Dental Materials**, v. 34, n. 1, p. 40–57, 2018.

SÁNCHEZ-BODÓN, J. et al. Bioactive Coatings on Titanium: A Review on Hydroxylation, Self-Assembled Monolayers (SAMs) and Surface Modification Strategies. **Polymers**, v. 14, n. 1, 2022.

SÉBASTIEN, S. Les soignants face à la mort. **Revue de l’Infirmiere**, v. 1, n. 180, p. 39–41, 2012.

SETSUHARA, Y. Low-temperature atmospheric-pressure plasma sources for plasma medicine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 605, p. 3–10, 2016a.

SETSUHARA, Y. Low-temperature atmospheric-pressure plasma sources for plasma medicine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 605, p. 3–10, 2016b.

SHI, Q. et al. A retrospective analysis of Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: Prevalence, risk factors, and outcome in carbapenem-susceptible and -non-susceptible infections. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2019.

SHIU, H. T. et al. Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 20, n. 6, p. 697–712, 1 dez. 2014.

SHOEB MARWA, F. M. C. NIH Public Access. v. 35, n. 3, p. 312–319, 2014.

SIMUNOVIC, F.; FINKENZELLER, G. **Vascularization strategies in bone tissue engineering**. **CellsMDPI**, , 1 jul. 2021.

SOCHOCKA, M.; BORATYŃSKI, J. Osmoregulacja – ważny parametr rozwoju bakterii. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 65, p. 714–724, 2011.

SOUZA, J. G. S. et al. Targeting implant-associated infections: titanium surface loaded with antimicrobial. **iScience**, v. 24, n. 1, 2021.

STREET, J. et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis

- and bone turnover. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 9656–9661, 2002.
- STURTZEL, C. Endothelial cells. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1003, p. 71–91, 2017.
- SU, S. et al. In vitro and in vivo anti-biofilm activity of pyran derivative against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection and Public Health**, 2019.
- SUCIU, V. et al. Structural, mechanical, and decorative properties of sputtered tin and ti (N, c) films for orthodontic applications; an in vitro study. **Materials**, v. 14, n. 18, 2021.
- TCHOUTA, L. N.; BONDE, P. N. The quest for nonthrombotic surface modifications to achieve hemocompatibility of implantable devices. **ASAIO Journal**, v. 61, n. 6, p. 623–634, 2015.
- TENDERO, C. et al. Atmospheric pressure plasmas: A review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 1, p. 2–30, 2006.
- THANU, D. P. R. et al. **Fundamentals and Applications of Plasma Cleaning**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 11
- TURKOGLU SASMAZEL, H.; ALAZZAWI, M.; KADIM ABID ALSAHIB, N. Atmospheric Pressure Plasma Surface Treatment of Polymers and Influence on Cell Cultivation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 6, p. 1–25, 2021a.
- TURKOGLU SASMAZEL, H.; ALAZZAWI, M.; KADIM ABID ALSAHIB, N. Atmospheric Pressure Plasma Surface Treatment of Polymers and Influence on Cell Cultivation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 6, p. 1–25, 2021b.
- VAN HOVE, R. P. et al. Titanium-Nitride Coating of Orthopaedic Implants: A Review of the Literature. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- WANG, L. et al. Modeling Clot Formation of Shear-Injured Platelets in Flow by a Dissipative Particle Dynamics Method. **Bulletin of Mathematical Biology**, v. 82, n. 7, 1 jul. 2020.
- WANG, X. et al. Extracellular matrix inspired surface functionalization with heparin, fibronectin and VEGF provides an anticoagulant and endothelialization supporting microenvironment. **Applied Surface Science**, v. 320, p. 871–882, 2014.
- WANG, Z. et al. Hierarchically hybrid biocoatings on Ti implants for enhanced antibacterial activity and osteogenesis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, n. February, p. 111802, 2021.
- WEBER, M. et al. Blood-Contacting Biomaterials : In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. v. 6, n. July, 2018.
- XU, D. et al. Materials & Design Novel Ti-based alloys prepared with different heat treatment strategies as antibacterial biomedical implants. **Materials & Design**, v. 205, p. 109756, 2021.
- XU, Y. et al. Microbiological diagnosis of device-related biofilm infections. **Apmis**, v. 125, n. 4, p. 289–

303, 2017.

YADAV, M. K. et al. In vitro multi-species biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and their host interaction during in vivo colonization of an otitis media rat model. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–21, 2017.

YAN, D.; SHERMAN, J. H.; KEIDAR, M. Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15977–15995, 2017.

YANG, Z. et al. Direct thrombin inhibitor-bivalirudin functionalized plasma polymerized allylamine coating for improved biocompatibility of vascular devices. **Biomaterials**, v. 33, n. 32, p. 7959–7971, 2012.

ZHANG, E. et al. Bioactive Materials Antibacterial metals and alloys for potential biomedical implants. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 8, p. 2569–2612, 2021.

ZHANG, L.; CHEN, L.; WANG, L. Surface Modification of Titanium and Titanium Alloys : Technologies , Developments , and Future Interests. v. 1901258, p. 1–37, 2020.