



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

KALYNE DANIELLY SILVA DE OLIVEIRA

**TRATAMENTO TERMOQUÍMICO DE LIGA Ti6Al4V AUXILIADO POR PLASMA
ATMOSFÉRICO A FRIO VISANDO USO EM IMPLANTES**

MOSSORÓ

2025

KALYNE DANIELLY SILVA DE OLIVEIRA

**TRATAMENTO TERMOQUÍMICO DE LIGA Ti6Al4V AUXILIADO POR PLASMA
ATMOSFÉRICO A FRIO VISANDO USO EM IMPLANTES**

Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal da Universidade Federal Rural do
Semi-Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra
de Moura

MOSSORÓ

2025

© 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.

O48t OLIVEIRA, KALYNE DANIELLY SILVA.
TRATAMENTO TERMOQUÍMICO DE LIGA Ti6Al4V
AUXILIADO POR PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO VISANDO
USO EM IMPLANTES / KALYNE DANIELLY SILVA
OLIVEIRA. - 2025.
87 f. : il.

Orientador: CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em ,
2025.

1. Biocompatibilidade. 2. Modificação de
superfície. 3. Envelhecimento da superfície. 4.
Contaminação fúngica. I. BEZERRA DE MOURA, CARLOS
EDUARDO, 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.

KALYNE DANIELLY SILVA DE OLIVEIRA

TÍTULO:

**TRATAMENTO TERMOQUÍMICO DE LIGA Ti6Al4V AUXILIADO POR PLASMA
ATMOSFÉRICO A FRIO VISANDO USO EM IMPLANTES**

Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal da Universidade Federal Rural do
Semi-Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia Animal

Defendida em: 28 / 03/ 2025.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Carlos Augusto Galvão Barboza (UFRN)
Membro Examinador

Prof^a. Dra. Cibele dos Santos Borges (UFERSA)
Membro Examinador

Prof. Dr. Clodomiro Alves Júnior (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Finalizar esta tese representa não apenas a conclusão de uma etapa importante, mas também o resultado de uma caminhada que só foi possível graças ao apoio e colaboração de muitas pessoas e instituições.

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força, sabedoria e graça concedidas ao longo de toda a jornada. Cada conquista, aprendizado e superação foram possíveis graças à Sua bondade infinita.

Expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Carlos Eduardo “Cadu”, cuja orientação, paciência e incentivo foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua dedicação e expertise foram uma inspiração constante. O senhor é um verdadeiro exemplo, tanto como pessoa, como professor. Obrigada por tudo! Saiba que pode contar comigo sempre.

Agradeço aos membros da banca examinadora por suas valiosas contribuições, que enriqueceram este trabalho com suas análises e sugestões. Agradeço ao professor Moacir Franco por toda dedicação ao longo desse período, ao professor Clodomiro por sanar todas minhas dúvidas e ajuda com as análises. Agradeço também a professora Cíbele pela contribuição com os animais e ao professor Carlos Augusto por ter sido sempre tão solícito. Agradeço também a Caio pelos ensinamentos no laboratório de microbiologia.

Agradeço a empresa Titanium Fix por ter cedido os implantes e discos para a realização do estudo, e ao mesmo tempo gostaria de parabenizá-la pela qualidade do material.

Não poderia deixar de mencionar o apoio dos meus colegas e amigos ao longo desta jornada. Que graças a Deus, foram muitos! Compartilhar desafios e conquistas com vocês tornou este percurso mais leve e enriquecedor. Obrigada Giulia, Isabele Fernandes, Isaú, Márcio, Laura, Naftali, Natanael, Juliete e Vanesca. Agradeço também ao dentista Haniery, a Clínica SERES e ao técnico Bruno Fernandes do MEV. E não posso esquecer Jussier que também me ajudou muito com as análises e na interpretação dos resultados. Muito obrigada, a todos.

A minha família, dedico um agradecimento especial, pois nenhum passo desta jornada teria sido possível sem o amor, apoio e compreensão de vocês. Aos meus pais Antônio e Alzenir, pelo exemplo de resiliência e por sempre acreditarem em mim. Ao meu irmão Douglas, Érica, Ricardo, Brena, minha sogra Francisca e vovó Tica por me animarem nos momentos difíceis e celebrarem cada pequena conquista ao meu lado.

Não poderia deixar de mencionar duas pessoas muito especiais que, embora não estejam mais entre nós, deixaram um impacto profundo em minha vida e no caminho que me trouxe até aqui. Sr Emilio (meu sogro) e Vovó Carmem, os exemplos que vocês deixaram foram e continuam sendo uma fonte de força e perseverança para mim. Que a memória de vocês continue a ser uma fonte de inspiração para todos que tiveram o privilégio de conhecê-los.

Agradeço ao meu querido esposo Renato Melo Torres, você foi meu porto seguro nos momentos de dificuldade, meu encorajamento quando as forças pareciam faltar e minha alegria em cada conquista. Sua paciência, apoio e amor incondicional me motivaram a seguir em frente e a dar o melhor de mim. Esta tese é tanto minha quanto sua, pois reflete o nosso esforço compartilhado. Obrigada por acreditar em mim e por estar sempre ao meu lado.

E, com o coração cheio de emoção, quero dedicar um agradecimento especial ao nosso filho Mateus, que está prestes a chegar ao mundo. A expectativa de sua chegada trouxe uma nova luz à minha vida e me inspirou a ser uma pessoa melhor a cada dia. Este trabalho é também um presente para você, um reflexo do amor e do desejo de construir um futuro repleto de possibilidades. Vocês são a minha base, meu porto seguro e minha maior motivação. Amo vocês.

Por fim, dedico este trabalho a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tese se tornasse realidade. A todos, meu sincero muito obrigado!

RESUMO

O Plasma Atmosférico Frio (CAP – *Cold Atmospheric Plasma*) é uma tecnologia não térmica capaz de modificar superfícies metálicas, promovendo a integração de osteoblastos e inibindo a colonização por patógenos. Este estudo avaliou os efeitos da aplicação simultânea do jato de plasma de argônio e aquecimento a 200 °C em superfícies de liga Ti6Al4V, visando reduzir a aderência de *Candida albicans* (CA) e melhorar a osseointegração. Para a caracterização da superfície e avaliação da adesão fúngica, foram utilizados discos (9 mm × 1 mm), com análises de molhabilidade (ângulo de contato), energia livre superficial, microestrutura por difração de raios X (DRX), e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As superfícies tratadas apresentaram redução significativa do ângulo de contato ($21,47 \pm 1,18^\circ$) em comparação ao controle ($52,88 \pm 2,59^\circ$, $p < 0,05$), aumento da energia superficial livre ($73,66 \text{ mJ/m}^2$ vs. $62,819 \text{ mJ/m}^2$) e do componente polar ($67,46 \text{ mJ/m}^2$ vs. $12,82 \text{ mJ/m}^2$). A DRX indicou formação de filme de dióxido de titânio (TiO_2) entre 35° e 40° . Em relação à adesão fúngica, observou-se redução significativa nas unidades formadoras de colônias (UFC) de CA nas superfícies tratadas (125.000 UFC/mL) em comparação ao controle (205.000 UFC/mL, $p < 0,05$), menor formação de pseudo-hifas e menor ocupação da superfície ($19,14 \pm 1,92\%$ vs. $31,99 \pm 4,94\%$). Para a análise da osseointegração, quatorze parafusos de Ti6Al4V (1,5 mm × 5 mm) submetidos ao mesmo tratamento foram implantados na região metafisária das tíbias de sete ratos Wistar. Após 30 dias, os animais foram eutanasiados para avaliação por tomografia computadorizada (TC) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na TC observou-se aumento significativo da densidade óssea na interface C dos implantes tratados ($p < 0,05$), sugerindo maior atividade mineral. A MEV evidenciou preenchimento completo das roscas e formação óssea contínua no grupo tratado. A análise por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) confirmou mineralização ativa, com razão cálcio/fósforo (Ca/P) de 1,57, próxima à da hidroxiapatita (Ca/P = 1,67). Conclui-se que o tratamento térmico associado ao CAP induziu alterações físico-químicas que favoreceram a osseointegração e reduziram significativamente a adesão de CA, representando uma alternativa promissora para otimização de implantes em contextos clínicos desafiadores.

Palavras-chave: Biocompatibilidade; Modificação de superfície; Envelhecimento da superfície; Contaminação fúngica.

ABSTRACT

Cold Atmospheric Plasma (CAP) is a non-thermal technology capable of modifying metallic surfaces, promoting osteoblast integration and inhibiting pathogen colonization. This study evaluated the effects of simultaneous application of argon plasma jet and heating at 200 °C on Ti6Al4V alloy surfaces, aiming to reduce the adhesion of *Candida albicans* (CA) and improve osseointegration. For surface characterization and fungal adhesion analysis, discs (9 mm × 1 mm) were used, with evaluations of wettability (contact angle), surface free energy, microstructure via X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM). Treated surfaces showed a significant reduction in contact angle ($21.47 \pm 1.18^\circ$) compared to the control ($52.88 \pm 2.59^\circ$, $p < 0.05$), an increase in surface free energy (73.66 mJ/m² vs. 62.819 mJ/m²), and in the polar component (67.46 mJ/m² vs. 12.82 mJ/m²). XRD indicated the formation of a titanium dioxide (TiO₂) film between 35° and 40°. Regarding fungal adhesion, a significant reduction was observed in colony-forming units (CFU) of CA on treated surfaces (125,000 CFU/mL) compared to the control (205,000 CFU/mL, $p < 0.05$), with less pseudohyphae formation and lower surface coverage ($19.14 \pm 1.92\%$ vs. $31.99 \pm 4.94\%$). For the osseointegration analysis, fourteen Ti6Al4V screws (1.5 mm × 5 mm), subjected to the same treatment, were implanted in the metaphyseal region of the tibiae of seven Wistar rats. After 30 days, the animals were euthanized for evaluation by computed tomography (CT) and SEM. CT revealed a significant increase in bone density at the C interface of the treated implants ($p < 0.05$), suggesting greater mineral activity. SEM showed complete thread filling and continuous bone formation in the treated group. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis confirmed active mineralization, with a calcium/phosphorus (Ca/P) ratio of 1.57, close to that of hydroxyapatite (Ca/P = 1.67). It is concluded that the thermal treatment combined with CAP induced physicochemical changes that favored osseointegration and significantly reduced CA adhesion, representing a promising alternative for optimizing implants in challenging clinical settings.

Keywords: Biocompatibility; Surface modification; Surface aging; Fungal contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Implante de Titânio.....	20
Capítulo I -OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES Ti6Al4V AQUECIDOS A 200°C E FUNCIONALIZADAS POR PLASMA ATMOSFÉRICO EM RATOS WISTAR.	
Figura 1 - Esquema ilustrativo do sistema de jato de plasma atmosférico frio com controle térmico utilizado no tratamento das amostras de Ti6Al4V.....	39
Figura 2 - Ilustração do equipamento utilizado para determinação do ângulo contato.....	42
Figura 3 - Placas contendo Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol	43
Figura 4 - Análise do ângulo de contato das superfícies de Ti6Al4V aquecidas a 200° C e tratadas com plasma atmosférico a frio e superfícies não tratadas.	45
Figura 5 - Análise da energia livre superficial (γ S) e seus componentes polares (γ Sp) e dispersivo (γ Sd) das superfícies de Ti6Al4V tratadas com plasma atmosférico a frio e superfícies não tratadas.....	46
Figura 6 - Análise do Ângulo Rasante (DRX) de amostras tratadas com plasma atmosférico a frio e superfícies não tratadas.....	47
Figura 7 - Número médio de unidade formadoras de colônias de <i>Candida albicans</i> por ml (UFC/ml).....	48
Figura 8 - Área média (%) da superfície dos discos de Ti6Al4V aquecidos a 200°C e simultaneamente tratados com plasma atmosférico a frio.	48
Figura 9 - Morfologia da <i>C. albicans</i> aderida as sobre as superfícies de Ti6Al4V.....	50
Capítulo II - EFEITO DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE Ti6Al4V AQUECIDAS A 200 °C E TRATADAS SIMULTANEAMENTE COM PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO SOBRE A ADERÊNCIA DE <i>Candida Albicans</i> .	

Figura 1 - Esquema ilustrativo do sistema de jato de plasma atmosférico frio com controle térmico utilizado no tratamento das amostras de Ti6Al4V.....	62
Figura 2 - Animal sob manutenção da anestesia, utilizando máscara de oxigênio adaptada com seringa e com o fluxo de isoflurano via inalatória.	64
Figura 3 - Tíbias de rato preparadas para procedimento cirúrgico. Linha demonstra a localização da incisão cirúrgica.	65
Figura 4 - Tíbias de rato em 3D fixadas em blocos de cera, imagem produzida com aparelho de tomografia computadorizada.....	66
Figura 5 - A imagem demonstra os pontos das interfaces avaliadas A, B, C e D através de Tomografia computadorizada de Tíbia de rato com parafuso na região de metáfise proximal.....	67
Figura 6 - Relação entre a densidade da interface osso-implante e a cortical óssea em diferentes regiões (A, B, C, D), comparando grupos tratadas com plasma atmosférico aquecido a 200° e parafusos não tratados avaliados através de tomografia computadorizada.....	69
Figura 7 - Micrografia eletrônica mostrando as interfaces osso-parafuso tratado simultaneamente com Jato tratado por plasma e aquecido a 200 °C, inserido em Tíbia de Rato Wistar	70
Figura 8 - Imagens obtidas da avaliação de Espectroscopia de energia dispersiva de eletrons (EDS) acoplada ao MEV.....	71
Figura 9 - Figura 09 - Imagens obtidas da avaliação de Imagens obtidas da avaliação de Espectroscopia de energia dispersiva de eletrons (EDS) acoplada ao MEV	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Cold Atmospheric Plasma (CAP):	15
2.2 Utilização do Plasma Atmosférico Frio na Medicina Humana	16
2.3 Aplicações do CAP na Medicina Veterinária	17
2.4 Aplicação do Plasma Atmosférico a frio em implantes ortopédicos	19
2.5 Osseointegração: Plasma x Tecido ósseo	20
2.6 Plasma atmosférico a frio x <i>Candida albicans</i>.....	21
3. JUSTIFICATIVA	24
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	25
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo geral:	26
5.2 Objetivos Específicos:	26
REFERÊNCIAS	27
6. Capítulo I.....	35
EFEITO DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE Ti6Al4V AQUECIDAS A 200 °C E TRATADAS SIMULTANEAMENTE COM PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO SOBRE A ADERÊNCIA DE <i>Candida Albicans</i>.	35
Capítulo II.....	58
TRATAMENTO TERMOQUÍMICO DE LIGA Ti6Al4V AUXILIADO POR PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO, VISANDO USO EM IMPLANTES.	58
14. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
ANEXOS I – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA PVB.....	82

ANEXOS II – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO PARA REVISTA CIÊNCIA RURAL	83
ANEXO III - CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	84
ANEXO IV. RESUMO APRESENTADO EM IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ORTOPEDIA DE CÃES E GATOS	85
ANEXO V. RESUMO APRESENTADO EM IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ORTOPEDIA DE CÃES E GATOS	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(CP-Ti) - Titânio Puro

CAP - Cold Atmospheric Plasma (Plasma Atmosférico a frio)

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DBD - Descarga de barreira dielétrica

DEIV- Detergente enzimático

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DRX - Difractograma de Raios X (DRX)

EDS - Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X

HA - Hidroxiapatita

IAPs - Infecções periprotéticas de articulação

MEV - Microscopia de Varredura

O₃ - Ozônio

SiC – Carbetto de Silício

Ti6Al4V - Liga de Titânio

TiO₂ - Dióxido de Titânio

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-Árido

1. INTRODUÇÃO

As ligas de titânio, especialmente o Ti6Al4V, são amplamente empregadas como materiais de escolha em implantes ortopédicos e odontológicos, sendo utilizadas na confecção de placas, parafusos, hastes, pinos e próteses articulares. Essa preferência se deve às suas propriedades físico-químicas notáveis, como baixa densidade, alta resistência mecânica, excelente resistência à corrosão, biocompatibilidade, ausência de reatividade tecidual e compatibilidade com exames por imagem (BALTATU et al., 2021).

Apesar dessas vantagens, sabe-se que superfícies de titânio sofrem alterações ao longo do tempo devido à adsorção de hidrocarbonetos atmosféricos, fenômeno conhecido como envelhecimento da superfície. Esse processo leva à perda da hidrofobicidade inicial e à diminuição da atividade osteoblástica, comprometendo a osseointegração (JANG et al., 2021; WANG et al., 2020). A partir de quatro semanas após a fabricação, já se observa um aumento significativo de carbono na superfície (de 20% para 63%), comprometendo a adesão celular (ATT et al., 2009; ESPOSITO et al., 2009).

Vários fatores podem impactar negativamente a osseointegração, incluindo sobrecarga mecânica, características do biomaterial, desenho do implante e variáveis cirúrgicas, como infecções ou técnica operatória. Ademais, fatores intrínsecos ao paciente — como idade, doenças sistêmicas, qualidade óssea, deficiência de vitamina D, uso de medicamentos como anti-hipertensivos e inibidores da bomba de prótons, tabagismo e radioterapia — também são determinantes no sucesso da integração óssea (MOHSEN et al., 2024; MASRI et al., 2023, 2024). Destaca-se que infecções relacionadas ao implante representam até 30% das complicações cirúrgicas, podendo exigir revisões e gerar custos que ultrapassam US\$ 150 mil por paciente (SCHWARZ et al., 2019).

Frente a isso, diversas abordagens têm sido investigadas para melhorar a biocompatibilidade das superfícies de implantes, com foco na promoção de um ambiente favorável à adesão celular precoce. Entre elas, destacam-se o tratamento com luz ultravioleta (UV), que promove fotocatalise e remoção de contaminantes orgânicos (SANCHEZ-PEREZ et al., 2020), e o uso do CAP — *Cold Atmospheric Plasma*, também conhecido como plasma

atmosférico a frio, que atua de forma similar, oxidando compostos orgânicos e restaurando a hidrofiliabilidade da superfície (WOO-LAM et al., 2023). Ambos os tratamentos visam restabelecer condições ideais para a adsorção de proteínas como albumina e fibronectina, fundamentais para a adesão de osteoblastos (LEE et al., 2013).

Paralelamente, a demanda clínica atual exige o desenvolvimento de superfícies multifuncionais, capazes de promover a integração de osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, além de prevenir colonizações por agentes patogênicos como bactérias, fungos e vírus (ZWAHR et al., 2019). O CAP tem demonstrado ainda efeitos antimicrobianos promissores, inclusive contra *Candida albicans*, sendo estudado como terapia adjuvante para infecções resistentes, embora os mecanismos exatos de ação ainda estejam em investigação (ROVETTA-NOGUEIRA et al., 2023; ERMOLAEVA et al., 2011).

Diante do exposto, ressalta-se a importância de estratégias que previnam simultaneamente o envelhecimento das superfícies de titânio e a formação de biofilmes infecciosos. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o impacto da aplicação simultânea de aquecimento a 200 °C e jato de plasma com fluxo de argônio em superfícies de Ti6Al4V, tanto na promoção da osseointegração quanto na inibição da contaminação por *Candida albicans*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cold Atmospheric Plasma (CAP):

O plasma, reconhecido como o quarto estado físico da matéria, foi inicialmente descrito por Irving Langmuir em 1928. Sua formação ocorre quando uma quantidade suficiente de energia é aplicada a um gás, promovendo a ionização de seus átomos e moléculas e originando uma mistura de elétrons livres, íons, espécies neutras e radicais. Apesar de conter partículas carregadas, a maioria dos plasmas permanece eletricamente neutra como um todo, o que lhes confere propriedades físico-químicas singulares. Características como densidade eletrônica, temperatura e composição variam amplamente de acordo com a fonte de energia e o tipo de gás utilizado, influenciando diretamente suas aplicações (CHEN, 2022; GURNETT; BHATTACHARJEE, 2005; VOLKOV; XU; KOLOBOV, 2021).

Do ponto de vista termodinâmico, os plasmas podem ser classificados como térmicos ou não térmicos, conforme a teoria de Maxwell-Boltzmann. Entre eles, os plasmas não térmicos — também conhecidos como *Cold Atmospheric Plasma* (CAP) — distinguem-se pela alta temperatura dos elétrons em contraste com a baixa temperatura dos íons e átomos neutros, característica que evita o superaquecimento global da amostra. Essa propriedade torna o CAP particularmente adequado para aplicações em materiais termossensíveis, como tecidos biológicos. O crescente interesse científico pelo CAP nas últimas décadas está associado ao avanço das tecnologias de descarga em gases como hélio, argônio, oxigênio e nitrogênio, que permitem maior controle sobre sua geração e aplicação (CHENG et al., 2016; TORNÍN et al., 2021; VOLKOV; XU; KOLOBOV, 2021).

A geração do CAP pode ocorrer por diferentes métodos, como radiofrequência (RF), micro-ondas, corrente contínua (DC) ou alternada (AC), sendo frequentemente utilizado com gases inertes ou mistos — em especial argônio e oxigênio — para otimizar sua estabilidade e reatividade. Por não estar em equilíbrio térmico, o CAP contém uma ampla gama de componentes ativos, como elétrons excitados, íons, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), os quais desempenham papéis fundamentais nas interações com superfícies biológicas e materiais, contribuindo para processos como desinfecção, regeneração tecidual e modulação celular (DEEPAK et al., 2018; KAZEMI et al., 2024; CHOI et al., 2023).

Nesse contexto, surge a medicina baseada em plasma como um campo interdisciplinar emergente que integra conhecimentos da física do plasma, microbiologia, bioengenharia e medicina clínica. O CAP tem demonstrado grande potencial terapêutico, com aplicações que vão desde a desinfecção de superfícies hospitalares até o tratamento de feridas crônicas, hemostasia, modulação da resposta imune e inativação de células tumorais. Sua eficácia antimicrobiana, aliada à capacidade de induzir respostas regenerativas nos tecidos, reforça seu papel como alternativa ou adjuvante promissora em diversas abordagens clínicas (BEKESCHUS et al., 2021; GAO et al., 2022; BOURKE et al., 2018; CHEN, 2022).

2.2 Utilização do Plasma Atmosférico Frio na Medicina Humana

O CAP tem se destacado como uma ferramenta terapêutica versátil na medicina moderna, com aplicações promissoras em áreas como cicatrização de feridas, controle de infecções, tratamento oncológico e regeneração tecidual. Seu mecanismo de ação está centrado na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS/RNS), que induzem respostas celulares específicas sem causar danos térmicos ao tecido vivo, promovendo efeitos antimicrobianos, imunomoduladores e pró-regenerativos (BEKESCHUS et al., 2021; LAROUSSI, 2020).

Na área da cicatrização, o CAP tem demonstrado impacto positivo sobre a proliferação, migração e diferenciação de queratinócitos e fibroblastos, além de estimular a angiogênese e modular a inflamação local. Ensaios clínicos apontam melhorias significativas na reepitelização de úlceras diabéticas, feridas crônicas e lesões cutâneas infectadas, com redução substancial da carga microbiana e ausência de efeitos colaterais relevantes nos tecidos saudáveis (DAESCHLEIN et al., 2022; VEJNOVIC et al., 2023).

Além de sua ação local, o CAP exerce propriedades imunomoduladoras que contribuem para sua eficácia terapêutica. Evidências indicam sua capacidade de influenciar a expressão de citocinas inflamatórias, reduzir o estresse oxidativo intracelular e induzir a polarização de macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório, o que o torna uma alternativa promissora no manejo de dermatoses crônicas, como psoríase e dermatite atópica, e até em quadros inflamatórios sistêmicos (SCHMIDT et al., 2023; LIN et al., 2024).

No campo da oncologia, o CAP tem sido explorado como terapia adjuvante em diversos tipos de câncer, incluindo melanoma, carcinoma de mama, glioblastoma e câncer de pulmão. Sua ação antitumoral baseia-se na indução de estresse oxidativo, danos ao DNA, despolarização mitocondrial e ativação de vias pró-apoptóticas, culminando na morte seletiva de células tumorais — fenômeno atribuído à menor capacidade antioxidante das células malignas em comparação às normais (KEIDAR, 2020; BAUER et al., 2022).

Apesar do seu potencial clínico, a aplicação do CAP ainda enfrenta obstáculos importantes, como a ausência de protocolos padronizados, diferenças entre os dispositivos geradores e lacunas no entendimento dos efeitos sistêmicos da terapia. Tais limitações dificultam sua incorporação rotineira nos sistemas de saúde. No entanto, avanços recentes no desenvolvimento de dispositivos portáteis, de baixo custo e com segurança validada têm contribuído para sua adoção progressiva em contextos clínicos e cirúrgicos emergentes (FRIDMAN et al., 2023; YAN et al., 2023).

2.3 Aplicações do CAP na Medicina Veterinária

O CAP atua por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxidos (O_2^-) e óxido nítrico (NO), que têm ação direta sobre células e microrganismos. Essas espécies promovem alterações no potencial de membrana, estresse oxidativo controlado e ativação de vias intracelulares envolvidas na regeneração tecidual. Estudos demonstram que o CAP estimula a proliferação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, sendo essencial para a cicatrização de feridas em animais (YUSUPOV et al., 2023; KWON et al., 2023).

Além de seu efeito proliferativo, o CAP modula a resposta inflamatória, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias (como IL-6 e TNF- α) e promovendo o aumento de fatores de crescimento, como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Essa modulação acelera a transição das fases inflamatória para proliferativa e contribui para a formação de novos vasos, promovendo angiogênese — processo essencial para o reparo tecidual em feridas isquêmicas ou infectadas (LEE et al., 2023; ALSHAWA et al., 2022).

O CAP também apresenta potente atividade antimicrobiana, induzindo peroxidação lipídica, ruptura de membranas e danos ao DNA de bactérias, fungos e vírus. Na medicina

veterinária, esse efeito tem sido particularmente valorizado no tratamento de infecções cutâneas em cães e gatos, sem induzir resistência microbiana, ao contrário de muitos antibióticos convencionais. A seletividade do CAP é atribuída à sua ação preferencial sobre microrganismos e células danificadas, preservando as células hospedeiras (CHEN et al., 2023; BOURKE et al., 2018).

Estudos recentes demonstram que o CAP tem potencial terapêutico significativo na medicina veterinária, especialmente no manejo de feridas em pequenos animais. Em um estudo retrospectivo com cães e gatos portadores de feridas agudas e crônicas, a aplicação de CAP como terapia adjuvante resultou em cicatrização completa em 81,48% dos casos. A maioria das lesões cicatrizou em um período inferior a cinco semanas, e não foram relatados efeitos adversos relevantes durante o tratamento, sugerindo que a técnica é segura e bem tolerada por diferentes espécies animais (KWON et al., 2023).

Além de seu efeito cicatrizante, o CAP tem sido estudado como alternativa no tratamento de infecções bacterianas resistentes a antimicrobianos. Sua atividade antimicrobiana baseia-se na geração de RONS, que promovem danos estruturais nas membranas celulares e ao material genético dos microrganismos. O tratamento com CAP se mostrou eficaz contra patógenos gram-positivos e gram-negativos em infecções cutâneas veterinárias, um cenário clínico onde a resistência antimicrobiana representa um desafio crescente (CHEN et al., 2023).

Em relação às infecções bacterianas, MARX et al. (2024) investigaram os efeitos antimicrobianos do CAP sobre patógenos comumente associados à ceratite bacteriana em cães, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pseudintermedius* e *Streptococcus canis*. Os experimentos *in vitro* demonstraram que a aplicação de CAP promoveu uma redução significativa no crescimento bacteriano, sugerindo que a técnica pode ser uma alternativa eficaz e segura no tratamento de infecções oculares de difícil manejo na clínica veterinária.

Complementarmente, MOHSENI et al. (2023) revisaram o uso potencial do CAP em infecções bacterianas na medicina veterinária, com foco especial em sua eficácia frente a cepas multirresistentes. O estudo destaca que, além de sua ação antimicrobiana direta, o CAP pode modular a resposta inflamatória local e estimular o processo de cicatrização tecidual. No entanto, os autores ressaltam a importância de padronizar os parâmetros de aplicação (tempo,

distância, tipo de gás) e conduzir estudos clínicos longitudinais para garantir segurança e eficácia do CAP em diferentes espécies e contextos clínicos.

2.4 Aplicação do Plasma Atmosférico a frio em implantes ortopédicos

O Plasma Atmosférico Frio (CAP) tem se mostrado uma ferramenta promissora na modificação de superfícies de implantes ortopédicos, principalmente os confeccionados em titânio. O tratamento com CAP permite a remoção de contaminantes orgânicos (como hidrocarbonetos) acumulados nas superfícies metálicas após o processamento, além de introduzir grupos funcionais que aumentam a energia livre superficial. Isso favorece a adsorção de proteínas e a adesão celular, contribuindo significativamente para uma osseointegração mais eficiente (BEKESCHUS et al., 2021; HUANG et al., 2023).

Estudos demonstraram que o tratamento de superfícies de titânio com CAP reduz o ângulo de contato da água, tornando-as mais hidrofílicas. Essa propriedade melhora a molhabilidade e a interação com fluidos biológicos, promovendo a adesão e proliferação de osteoblastos, além de favorecer o recrutamento celular para formação óssea ao redor do implante (ZHENG et al., 2020; CHEN et al., 2023).

Além dos efeitos sobre a biocompatibilidade, o CAP apresenta importante ação antimicrobiana. Sua capacidade de inativar microrganismos, especialmente em biofilmes, se dá pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS), que promovem oxidação lipídica, dano ao DNA e disfunção mitocondrial nos patógenos. Isso torna o CAP uma estratégia preventiva eficaz contra infecções peri-implantares, uma das principais causas de falha em implantes ortopédicos (NIEMIRA et al., 2021; BOURKE et al., 2023).

O uso do CAP também tem sido expandido para polímeros de uso médico, como a polietereftercetona (PEEK), um material promissor na ortopedia por sua leveza e elasticidade próximas ao osso. Quando tratado com CAP, o PEEK apresenta maior rugosidade superficial, melhor molhabilidade e maior adesão de células osteoprogenitoras, o que potencializa sua capacidade de osseointegração, tornando-o competitivo em relação ao titânio em algumas aplicações (WANG et al., 2024).

Apesar dos avanços experimentais e dos bons resultados *in vitro* e *in vivo*, ainda são necessários estudos clínicos robustos e protocolos padronizados para viabilizar a incorporação sistemática do CAP na prática ortopédica. A padronização dos parâmetros físicos (tempo de exposição, tipo de gás, distância da fonte) será fundamental para garantir a segurança e eficácia a longo prazo dessa tecnologia (KEIDAR et al., 2020; FRIDMAN et al., 2023).

2.5 Osseointegração: Plasma x Tecido ósseo

A osseointegração é definida como a formação de uma conexão direta e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante, sem a interposição de tecido fibroso, sendo esse processo fundamental para garantir a estabilidade primária e a longevidade de implantes ortopédicos e odontológicos (Figura 1). Diversos fatores influenciam essa integração, entre os quais se destacam a biocompatibilidade do material, a topografia da superfície, a molhabilidade e a energia superficial, todos essenciais para promover a adesão celular inicial e o subsequente remodelamento ósseo (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004; GITTENS et al., 2014).

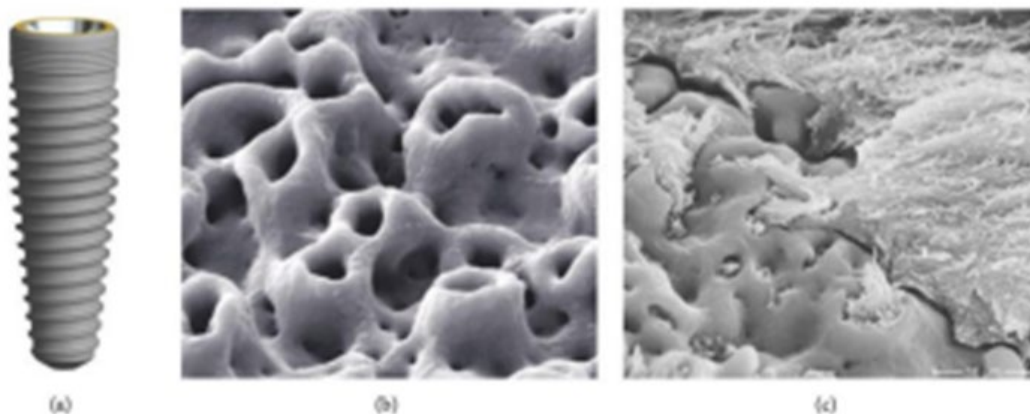


Figura 1- Implante de Titânio (a). Demonstração da superfície porosa (b). Ilustração do osso aderindo à superfície. Fonte: Velasco (2024)

Nesse contexto, o uso do Plasma Atmosférico Frio tem emergido como uma estratégia inovadora para a modificação de superfícies metálicas, em especial o titânio, promovendo o chamado “rejuvenescimento da superfície”. A aplicação do CAP remove contaminantes orgânicos, como hidrocarbonetos adsorvidos, e eleva a molhabilidade e a energia livre

superficial das amostras. Tais modificações tornam o ambiente mais propício à adsorção de proteínas da matriz extracelular — como fibronectina e albumina — que desempenham papel crucial na adesão e diferenciação de osteoblastos (ATT et al., 2009; HAN et al., 2022).

Estudos experimentais, tanto in vitro quanto in vivo, evidenciam que implantes tratados com CAP favorecem o recrutamento de células osteoprogenitoras e elevam a expressão de marcadores osteogênicos, como a osteocalcina e a fosfatase alcalina. Além disso, há relatos de aumento significativo do volume ósseo neoformado ao redor dos implantes e da porcentagem de contato osso-implante (bone-to-implant contact – BIC), refletindo diretamente na qualidade da mineralização da matriz óssea (ZHENG et al., 2020; WANG et al., 2024).

Outro aspecto relevante é que a superfície super-hidrofílica induzida pelo CAP favorece a estabilização do coágulo sanguíneo no leito ósseo, condição essencial nas fases iniciais de cicatrização do implante. Essa característica cria um microambiente osteocondutante, que favorece o início do processo regenerativo e reduz o risco de encapsulamento fibroso — um dos principais obstáculos à osseointegração bem-sucedida (RAINES et al., 2022; ALQUTAIBI et al., 2023).

Adicionalmente, o CAP tem mostrado capacidade de modular a resposta imune local ao redor dos implantes, promovendo um perfil anti-inflamatório benéfico à regeneração óssea. Esse efeito imunomodulador, que envolve a polarização de macrófagos e outras células do sistema imune, é especialmente promissor em cenários clínicos desafiadores, como osteoporose e diabetes mellitus, nos quais a osseointegração encontra-se frequentemente comprometida (BEKESCHUS et al., 2021; SCHMIDT et al., 2023).

2.6 Plasma atmosférico a frio x *Candida albicans*

O Plasma Atmosférico Frio (CAP) tem se destacado como uma abordagem promissora no controle de infecções fúngicas em medicina veterinária, especialmente contra *Candida albicans*, um fungo oportunista frequentemente associado a quadros de mucosite, dermatite e otite em animais imunocomprometidos. Sua ação baseia-se na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), que induzem estresse oxidativo e provocam danos estruturais às células fúngicas, inibindo seu crescimento, adesão e virulência (RAHIMI-VERKI et al., 2016).

Estudos *in vitro* têm elucidado os mecanismos moleculares envolvidos nessa ação antifúngica. Rahimi-Verki et al. (2016) demonstraram que a exposição de *C. albicans* ao CAP resulta na inibição da biossíntese de ergosterol, componente essencial da membrana plasmática do fungo, além da supressão de fatores de virulência, como a formação de biofilme e a produção de enzimas hidrolíticas, incluindo fosfolipases e proteinases. De forma complementar, Ebrahimi et al. (2021) confirmaram que o CAP compromete a viabilidade de biofilmes maduros, mesmo na ausência de agentes antifúngicos, destacando seu potencial como agente terapêutico autônomo.

Alterações morfológicas importantes também foram observadas por Rovetta-Nogueira et al. (2023), que relataram deformações na parede celular, rugosidade superficial e aumento da síntese de quitina em células tratadas com CAP — alterações essas interpretadas como uma resposta compensatória ao estresse oxidativo, mas que comprometem a integridade celular e reduzem a adesão do fungo aos tecidos hospedeiros.

Modelos experimentais reforçam esses achados *in vitro*. Em estudo com camundongos imunossuprimidos com mucosite oral induzida por quimioterapia, Sampaio et al. (2023) verificaram que o tratamento com jatos de CAP reduziu significativamente a carga fúngica de *C. albicans* na mucosa oral e preveniu sua disseminação sistêmica para pulmões, fígado e rins. De forma semelhante, Borges et al. (2018) também observaram diminuição da viabilidade fúngica nos tecidos orais após o uso do CAP, com baixa citotoxicidade para os tecidos do hospedeiro, reforçando a segurança do método.

No contexto terapêutico, Leite et al. (2021) analisaram a interação do CAP com antifúngicos polienos como a nistatina e a anfotericina B, e identificaram que o tratamento com CAP isolado foi mais eficaz na eliminação de biofilmes de *C. albicans* do que em combinação com os fármacos. Esses resultados sugerem que o estresse oxidativo gerado pelo plasma é, por si só, suficiente para desestabilizar os biofilmes, o que o posiciona como uma alternativa interessante, especialmente diante de cepas resistentes ou de pacientes com limitações ao uso de terapias sistêmicas.

Adicionalmente, a aplicação do CAP tem sido estendida a outros patógenos fúngicos de relevância veterinária. Por exemplo, Lee et al. (2022) relataram efeito antifúngico sinérgico entre o CAP e o gluconato de clorexidina contra *Malassezia pachydermatis*, agente etiológico

comum em casos de dermatite e otite canina. Esse tipo de associação aponta para o potencial do CAP em terapias tópicas integradas na prática clínica veterinária.

Dessa forma, os diversos estudos revisados reforçam o potencial do Plasma Atmosférico Frio como alternativa ou adjuvante às terapias antifúngicas convencionais, sobretudo em cenários clínicos desafiadores, como infecções resistentes ou pacientes imunocomprometidos, onde o uso de antifúngicos sistêmicos pode apresentar riscos ou eficácia limitada (EBRAHIMI et al., 2021; ROVETTA-NOGUEIRA et al., 2023; SAMPAIO et al., 2023; LEITE et al., 2021). Dessa forma, os diversos estudos revisados reforçam o potencial do Plasma Atmosférico Frio como alternativa ou adjuvante às terapias antifúngicas convencionais, sobretudo em cenários clínicos desafiadores, como infecções resistentes ou pacientes imunocomprometidos, onde o uso de antifúngicos sistêmicos pode apresentar riscos ou eficácia limitada (EBRAHIMI et al., 2021; ROVETTA-NOGUEIRA et al., 2023; SAMPAIO et al., 2023; LEITE et al., 2021).

3. JUSTIFICATIVA

A osseointegração de implantes de titânio e suas ligas é um desafio crítico na ortopedia e odontologia, especialmente devido ao risco de infecção associada a esses dispositivos. As complicações infecciosas podem comprometer a estabilidade do implante, prolongar o tempo de recuperação e exigir instruções adicionais, elevando os custos dos procedimentos.

Diante desse cenário, a busca por tratamentos inovadores que otimizem a interação entre o implante e o tecido ósseo, ao mesmo tempo em que inibam a colonização por microrganismos, torna-se essencial. Portanto, este estudo se justifica pela necessidade de investigar essa abordagem inovadora, que promove a melhoria da osseointegração e a redução de complicações infecciosas. Os resultados obtidos poderão contribuir para o desenvolvimento de implantes com maior eficácia clínica, ampliando suas aplicações na prática ortopédica e odontológica, beneficiando diretamente o paciente e os profissionais da saúde.

Além disso, compreender os mecanismos pelos quais o CAP e o aquecimento a 200°C na superfície do titânio e suas ligas podem abrir novas possibilidades para o desenvolvimento de biomateriais com propriedades antimicrobianas e osteoindutoras aprimoradas. Esta abordagem pode ser particularmente relevante para pacientes com condições que dificultam a regeneração óssea, como osteoporose, diabetes e imunossupressão.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- A aplicação do aquecimento em superfícies de Ti6Al4V a 200 °C, associado ao Jato de Plasma com fluxo de argônio, reduz a contaminação por *Candida albicans*, resultando em menor risco de infecção.
- O tratamento da superfície de implantes Ti6Al4V com plasma atmosférico frio (CAP), associado ao aquecimento a 200°C, promove modificações físico-químicas que levam a uma osseointegração mais precoce.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral:

Avaliar a susceptibilidade à adesão de *Candida albicans* e a osseointegração e em superfícies de liga Ti6Al4V submetidas a tratamento térmico a 200 °C e funcionalização por jato de plasma com fluxo de argônio.

5.2 Objetivos Específicos:

1. Caracterizar as superfícies de Ti6Al4V tratadas com aquecimento a 200 °C e jato de plasma com argônio, por meio de análises da molhabilidade, energia superficial livre e avaliação da microestrutura por difração de raios X (DRX).
2. Investigar a adesão de *Candida albicans* em superfícies de Ti6Al4V tratadas com aquecimento a 200 °C e jato de plasma com argônio, por meio da quantificação de Unidades formadoras de colônias (UFCs) e da determinação da área de colonização por meio de microscopia eletrônica de varredura.
3. Avaliar a osseointegração de implantes de Ti6Al4V tratadas com aquecimento a 200 °C e jato de plasma com argônio, por meio de tomografia computadorizada, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e composição química através da espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS).

REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON, Tomas; WENNERBERG, Ann. Oral implant surfaces: Part 1—review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *The International Journal of Prosthodontics*, [S.l.], v. 17, n. 5, p. 536–543, 2004.

ALQUTAIBI, Amani Y.; ALI, Akram A.; AL-HARBI, Fahad A. Enhancing osseointegration of titanium implants in osteoporotic conditions using plasma surface treatment: a preclinical study. *Clinical Oral Investigations*, [S.l.], v. 27, p. 2937–2946, 2023.

ALSHAWA, Mohammed A.; KIM, Juhee; CHUNG, Hyunseok; PARK, Sunyoung. Cold atmospheric plasma promotes angiogenesis and wound healing via upregulation of VEGF and downregulation of pro-inflammatory cytokines. *Biomedical Physics & Engineering Express*, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 057002, 2022.

ATT, Wolfgang; TAKEUCHI, Masaki; KUNDU, Rajdeep; OSAKO, Tetsuya; KIKUCHI, Manabu; OGAWA, Takahiro. Time-dependent degradation of titanium osteoconductivity: an implication of biological aging of implant materials. *Biomaterials*, [S.l.], v. 30, n. 29, p. 5352–5363, 2009.

BALTATU, M. S.; SOBOLEWSKI, P.; MIHAILA, C.; TIHIRI, A.; LIU, Y. Biofunctional behavior of titanium-based alloys used in medical applications. *Materials*, v. 14, n. 7, p. 1677, 2021.

BAUER, Georg; PRIVERA, Luca; HACKER, Eva; LEMBERG, Katharina; MÜLLER, Lara. Anticancer capacity of cold atmospheric plasma: cellular and molecular mechanisms. *Cancers*, Basel, v. 14, n. 6, p. 1441, 2022.

BEKESCHUS, Sander; FISCHER, Thomas; WETSCHKO, Joerg; METELMANN, Hans-Robert; KIRCHNER, Katja. Medical gas plasma: recent advances in clinical application, diagnostics and therapeutics. *Clinical Plasma Medicine*, [S.l.], v. 21, p. 100110, 2021.

BORGES, Marina C.; FERREIRA, Luiza M. M.; GUIMARÃES, Carla E.; COSTA, Érica M. C.; REZENDE, Renata R. Avaliação da eficácia do plasma atmosférico frio no

controle de *Candida albicans* em mucosite experimental em camundongos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 35–42, 2018.

BOURKE, Paula; CURTIS, Helen; SHARMA, Shivangi; SINGH, Prashant; STOLZ, Jason. Plasma technologies in orthopedic applications: current perspectives and future directions. *Journal of Orthopaedic Research*, [S.l.], v. 41, n. 3, p. 537–548, 2023.

BOURKE, Paula; SHARMA, Shivangi; SINGH, Prashant; STOLZ, Jason; MOORE, Georgina; KEENER, Kevin; MCLOUGHLIN, Peter. Cold plasma in biomedicine: recent developments and future perspectives. *Trends in Biotechnology*, [S.l.], v. 36, n. 6, p. 615–626, 2018.

CHEN, Xiaoqiang. Fundamentals and applications of low-temperature plasma. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, [S.l.], v. 42, p. 135–160, 2022.

CHEN, Xiaoqiang; ZHANG, Shujun; LIU, Jun; WANG, Yong. Cold atmospheric plasma: a novel tool for antimicrobial therapy in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, [S.l.], v. 284, p. 109759, 2023.

CHENG, Xiaoqian; SHENG, Xiaoying; QIU, Xin; ZHANG, Jing; CHEN, Qi. Atmospheric pressure cold plasma jets: techniques and biomedical applications. *Applied Physics Reviews*, [S.l.], v. 3, n. 4, p. 041101, 2016.

CHOI, Eun Ji; KIM, Ji Hyun; LEE, Dong Uk; JEONG, Hyun Woo; LEE, Hyun Ju. Plasma-induced modulation of wound healing and inflammation: biomedical potential of non-thermal plasma in regenerative medicine. *Biomolecules*, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 71, 2023.

DAESCHLEIN, Georg; NAPP, Michaela; ARNDT, Katrin; LUTZ, Claudia; ROSCHER, Matthias; KLINGNER, Alexander. Cold plasma therapy for chronic wounds: a systematic review and meta-analysis. *International Wound Journal*, Hoboken, v. 19, n. 3, p. 606–618, 2022.

DEEPAK, Deepa; RANA, Sandeep; SINGH, Avinash; BANSAL, Himani. Cold atmospheric plasma and its emerging therapeutic potential in oncology: a review. *Current Pharmaceutical Design*, [S.l.], v. 24, n. 4, p. 429–435, 2018.

EBRAHIMI, Hanieh; SHAMS-GHAHREHCHIAN, Nahid; BEHBOODI, Hossein; KHADEMI, Maryam. Cold atmospheric plasma as a novel strategy for biofilm inactivation in *Candida albicans*. *Medical Mycology*, [S.l.], v. 59, n. 2, p. 123–130, 2021.

ERMOLAEVA, S. A.; SYSOLIN, V. A.; GABRILOVICH, M. I.; SEMENOVA, A. A.; SHARIPOVA, E. V.; SHIRYAEV, A. A.; VASILIEV, A. L.; KUDRYAVTSEVA, T. V.; SHAGINYAN, I. A.; PRIEZJEV, N. V.; GRINBERG, T. A.; UMANSKY, S. R.; SHUBIN, A. V. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in vivo. *Journal of Medical Microbiology*, v. 60, p. 75–83, 2011.

ESPOSITO, C.; PELLEGRINI, G.; ZAFFARONI, G.; RICCI, G.; BARABINO, L.; GOZZO, L.; CARRASSI, A. Osteoblast response to titanium surfaces treated with low-pressure non-thermal plasma. *Clinical Oral Implants Research*, v. 20, n. 5, p. 481–489, 2009.

FRIDMAN, Alexander; FRIDMAN, Gregory; KOSTOV, Konstantin; KEIDAR, Michael. Cold atmospheric plasma: generation, physics, and applications in medicine. *Physics of Plasmas*, [S.l.], v. 30, n. 10, p. 100501, 2023.

FRIDMAN, Alexander; FRIDMAN, Gregory; KOSTOV, Konstantin; KEIDAR, Michael. Cold atmospheric plasma: generation, physics, and applications in medicine. *Physics of Plasmas*, [S.l.], v. 30, n. 10, p. 100501, 2023.

GAO, Xiang; WEI, Cheng; ZHANG, Ying; LUO, Xia. Cold plasma in wound healing: molecular mechanisms and clinical applications. *Frontiers in Physiology*, [S.l.], v. 13, p. 859230, 2022.

GITTENS, Robert A.; OLIVERA, Roy; LOZANO, R. M.; TANG, L.; BIANCHI, R. J.; OLIVARES-NAVARRETE, R.; SCHWARTZ, Z.; BOYAN, B. D. Implant osseointegration and the role of microroughness and nanostructures: lessons for spine implants. *Acta Biomaterialia*, [S.l.], v. 10, n. 8, p. 3363–3381, 2014.

GURNETT, Donald A.; BHATTACHARJEE, Amitava. *Introduction to plasma physics: with space and laboratory applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005.

HAN, Seunghee; KIM, Youngjun; JANG, Jihye; LEE, Donghyun. Synergistic effects of cold plasma and surface roughness on osteoblast behavior and osseointegration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, [S.l.], v. 110, n. 3, p. 512–522, 2022.

HUANG, Li; LIU, Fang; YANG, Xiaojun; ZHAO, Hong. Surface activation of titanium implants by cold plasma for improved osseointegration. *Surface and Coatings Technology*, [S.l.], v. 460, p. 128578, 2023.

JANG, Y. S.; LEE, H. J.; PARK, S. H.; PARK, J. C.; JUNG, U. W. Surface aging of titanium and its effects on osteoblast behavior. *Journal of Periodontal & Implant Science*, v. 51, n. 6, p. 387–397, 2021.

KAZEMI, Zohreh; SHAHRYARI, Ali; MOUSAVI, Seyed Mostafa; YEKANI, Mohsen; ALIMOHAMMADI, Shayan. A review of the biomedical applications of cold atmospheric plasma. *Journal of Applied Biomedicine*, [S.l.], v. 22, n. 1, p. 22–32, 2024.

KEIDAR, Michael; WALK, Robert M.; SHASHURIN, Alexey; KIM, Jay; SANDERS, Michelle. Cold atmospheric plasma in biomedical applications: from laboratory to clinical trials. *Therapeutic Delivery*, [S.l.], v. 11, n. 4, p. 241–255, 2020.

KWON, Yujin; PARK, Sujin; KIM, Junhwan; CHOI, Hyejung; LEE, Seungmin. Evaluation of cold atmospheric plasma as adjunct therapy for wound healing in dogs and cats: a retrospective study. *Veterinary Sciences*, Basel, v. 10, n. 5, p. 279, 2023.

LAROUSSI, Mounir. Cold plasma in medicine and healthcare: the new frontier in low-temperature plasma applications. *Frontiers in Physics*, Lausanne, v. 8, p. 471, 2020.

LEE, J. H.; KIM, H. E.; CHANG, B. S.; LEE, C. K.; YOO, J. H.; KIM, S. Y. Protein adsorption and cellular response of UV-treated titanium surfaces. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–9, 2013.

LEE, Jiyeon; LEE, Hyeongjin; KANG, Jeongkyu; PARK, Dongwoo. Effect of cold atmospheric plasma on keratinocyte and fibroblast proliferation during wound healing. *Plasma Medicine*, [S.l.], v. 13, n. 1, p. 23–35, 2023.

LEE, Yena; KIM, Min Soo; BAE, Ji Hoon; LEE, Hae Yong. Synergistic antifungal effect of cold atmospheric plasma and chlorhexidine gluconate against *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Dermatology*, Oxford, v. 33, n. 4, p. 285-e81, 2022.

LEITE, Mariana G.; DIAS, Fernanda R.; OLIVEIRA, Marina L.; COSTA, Isabella F.; ALVES, Rodrigo L. Avaliação da eficácia do plasma atmosférico frio na eliminação de biofilmes de *Candida albicans* em comparação com antifúngicos convencionais. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, São Paulo, v. 42, p. 1–9, 2021.

LIN, Xinyi; YANG, Qing; CHEN, Lin; ZHAO, Ming. Cold plasma promotes macrophage M2 polarization and reduces chronic inflammation in skin wounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, [S.l.], v. 167, p. 115310, 2024.

MARX, Paul; SILVA, Camila R.; TEIXEIRA, Gabriel A.; FREITAS, Larissa B.; LIMA, André V. Antimicrobial effect of cold atmospheric plasma on bacterial keratitis pathogens in dogs. *Journal of Veterinary Ophthalmology*, [S.l.], v. 27, p. 97–104, 2024.

MASRI, B.; ARREOLA, R.; PAUL, R. S.; TAWFIK, B.; MAHMOUD, S.; ZHAO, H. A review of systemic risk factors for impaired osseointegration of dental implants. *Clinical Oral Investigations*, v. 27, p. 405–418, 2023.

MASRI, B.; JENSEN, M. P.; GRAHAM, S. A. Osseointegration challenges in radiation-exposed bone. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 51, n. 1, p. 12–19, 2024.

MOHSEN, A. H.; ELKADY, A. M.; SALEM, S. A. Influence of patient-related factors on implant osseointegration: a narrative review. *Oral Diseases*, [Epub ahead of print], 2024.

MOHSENI, Ehsan; ZIAEI, Hamidreza; ZANDI, Niloofar; SAFAEI, Mahmood; SHAHIDI, Shirin. Veterinary applications of cold atmospheric plasma: a review of antibacterial, wound healing, and anti-inflammatory effects. *Veterinary World*, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 1–11, 2023.

NIEMIRA, Brendan A.; ROY, Somak; KANG, Dong H. Cold plasma for medical device disinfection: mechanisms and clinical potential. *International Journal of Molecular Sciences*, [S.l.], v. 22, n. 12, p. 6385, 2021.

PARK, S. Y.; KIM, Y. H.; LEE, J. Y.; KIM, S. Y.; JEON, H. H. The role of titanium surface hydrophilicity in osseointegration: a literature review. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 22, n. 5, p. 537–545, 2021.

RAHIMI-VERKI, Mojgan; SHAMS-GHAHREHCHIAN, Nahid; GHAREHBEIGI, Pooya; JAFARI, Anahita. Antifungal effects of cold atmospheric plasma on *Candida albicans*: inhibition of virulence factors and ergosterol biosynthesis. *Plasma Medicine*, [S.l.], v. 6, n. 4, p. 299–311, 2016.

RAINES, Andrew L.; KANE, Ryan; ZHANG, Emily; RAMOS, Raquel; CHANG, Matthew. Effect of plasma-induced superhydrophilicity on clot retention and early bone healing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, [S.l.], v. 110, n. 6, p. 1169–1178, 2022.

ROVETTA-NOGUEIRA, Cibele R.; SANTOS, Lara F.; MARTINS, Mayra M. G. Cold atmospheric plasma as an antifungal therapy: morphological and biochemical changes in *Candida albicans*. *Plasma Processes and Polymers*, [S.l.], v. 20, n. 7, p. e2300034, 2023.

SAMPAIO, Amanda L.; FREITAS, Larissa B.; MOURA, Rafaela C.; ALMEIDA, Tiago C.; BARRETO, Bianca L. Uso de plasma atmosférico frio no tratamento de mucosite oral experimental por *Candida albicans* em camundongos imunossuprimidos. *Revista de Patologia Tropical*, Goiânia, v. 52, n. 1, p. 41–48, 2023.

SANCHEZ-PEREZ, A.; BARBOSA, R. F.; TEIXEIRA, A. I. Photofunctionalization of titanium implant surfaces with UV light: bioactivity and clinical applications. *Dental Materials Journal*, v. 39, n. 1, p. 1–8, 2020.

SCHMIDT, Achim; BERGMANN, Simone; BEKESCHUS, Sander. Plasma medicine: the potential of cold atmospheric plasma for chronic skin diseases. *Clinical and Experimental Dermatology*, Oxford, v. 48, n. 2, p. 125–132, 2023.

SCHWARZ, F.; BECKER, K.; HOHENSTEIN, F.; KLOSA, K.; SCHWARZ, K. Implant-related infections: epidemiology, clinical presentation and treatment options. *Periodontology 2000*, v. 79, n. 1, p. 128–137, 2019.

TORNÍN, Juan; ROLDÁN, Ana; MATAS, Victoria; SANZ, Anabel; PARDO, Noelia; VALLET-REGÍ, María; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, María. Cold atmospheric plasma as an adjuvant therapy in cancer treatment. *Cancers*, [S.l.], v. 13, n. 4, p. 879, 2021.

VEJNOVIC, Iva; ZAGORAC, Slavko; KOSTOVIC, Katarina; VUKICEVIC, Jelena; DRAGICEVIC, Natasa. Cold atmospheric plasma in wound healing: clinical evidence and translational opportunities. *Journal of Translational Medicine*, [S.l.], v. 21, p. 196, 2023.

VOLKOV, Roman; XU, Zhen; KOLOBOV, Vladimir. Physics and applications of atmospheric pressure non-thermal plasmas. *Plasma Sources Science and Technology*, [S.l.], v. 30, n. 10, p. 103001, 2021.

WANG, Chen; ZHOU, Yating; YU, Yichen; LI, Shuai; TANG, Kai. Enhancing osteointegration of PEEK implants by cold atmospheric plasma treatment: insights from surface chemistry and cell behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, [S.l.], v. 112, n. 1, p. 34–45, 2024.

WANG, Chen; ZHOU, Yating; YU, Yichen; LI, Shuai; TANG, Kai. Enhancing osteointegration of PEEK implants by cold atmospheric plasma treatment: insights from surface chemistry and cell behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, [S.l.], v. 112, n. 1, p. 34–45, 2024.

WANG, R.; JIN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, Y.; LI, J. Time-dependent degradation of the biological properties of titanium surfaces. *International Journal of Oral Science*, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2020.

WOO-LAM, S. Y.; ZHANG, Y.; LIN, S.; SUNG, J. Effect of cold atmospheric plasma treatment on titanium surfaces for dental implants. *Applied Surface Science Advances*, v. 17, p. 100492, 2023.

YAN, Haoran; ZHANG, Qiang; WANG, Lei; LI, Tianqi; CHEN, Wen. Development of miniaturized cold plasma devices for clinical use: recent advances and future perspectives. *IEEE Transactions on Radiation and Plasma Medical Sciences*, [S.l.], v. 7, n. 2, p. 127–136, 2023.

YUSUPOV, Mikhail; VAN DER PAAL, Joachim; CLEIREN, Ellen; WENSCH, Jörg; LIN, Andre. Mechanisms of wound healing enhancement by cold atmospheric plasma in

preclinical animal models. *Plasma Processes and Polymers*, [S.l.], v. 20, n. 4, p. e2200235, 2023.

ZHENG, Li; ZHANG, Xinyue; CHEN, Meng; WU, Shanshan. Plasma surface modification of titanium for improved cell responses and osseointegration. *Applied Surface Science*, [S.l.], v. 528, p. 147020, 2020.

ZHENG, Li; ZHANG, Xinyue; CHEN, Meng; WU, Shanshan. Plasma surface modification of titanium for improved cell responses and osseointegration. *Applied Surface Science*, [S.l.], v. 528, p. 147020, 2020.

ZWAHR, J.; BOHLER, C.; CLAUSNER, A.; BEYER, M.; BOSCHKE, E. Bioactive and antimicrobial implant surfaces: design and assessment. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 107, n. 6, p. 2052–2060, 2019.

6. Capítulo I

EFEITO DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE Ti6AL4V AQUECIDAS A 200 °C E TRATADAS SIMULTANEAMENTE COM PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO SOBRE A ADERÊNCIA DE *Candida Albicans*.

Infecções do sítio cirúrgico representam uma complicação grave em diversos procedimentos, principalmente quando se trata de cirurgias ortopédicas, devido a utilização de implantes, que por sua vez, favorecem a formação de biofilmes. Nesse contexto, o tratamento da superfície com plasma atmosférico a frio surge como uma estratégia inovadora para enfrentar essas infecções. Diante disso, este estudo teve como objetivo analisar os efeitos do aquecimento a 200° C em superfície de Ti6Al4V associado a aplicação de jato de plasma de argônio, sobre a prevenção da contaminação fúngica por *Candida albicans*. Para as avaliações, foram utilizados discos de Ti6Al4V com 9 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Os discos foram tratados em uma câmara fechada, com fluxo de gás de argônio 1 litro por minuto (L/min) durante 30 minutos. Foram realizadas as análises de molhabilidade (ângulo de contato), energia livre superficial, microestrutura por difração de raios X (DRX), e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As superfícies tratadas apresentaram redução significativa do ângulo de contato ($21,47 \pm 1,18^\circ$) em comparação ao controle ($52,88 \pm 2,59^\circ$, $p < 0,05$), aumento da energia superficial livre ($73,66 \text{ mJ/m}^2$ vs. $62,819 \text{ mJ/m}^2$) e do componente polar ($67,46 \text{ mJ/m}^2$ vs. $12,82 \text{ mJ/m}^2$). A DRX indicou formação de filme de dióxido de titânio (TiO_2) entre 35° e 40° . Em relação à adesão fúngica, observou-se redução significativa nas unidades formadoras de colônias (UFC) de CA nas superfícies tratadas (125.000 UFC/mL) em comparação ao controle (205.000 UFC/mL , $p < 0,05$), menor formação de pseudo-hifas e menor ocupação da superfície ($19,14 \pm 1,92\%$ vs. $31,99 \pm 4,94\%$). Com base nos resultados, conclui-se que o tratamento combinado de aquecimento a 200 °C e jato de plasma de argônio foi capaz de causar modificações na superfície que causaram redução na adesão e colonização por *Candida albicans*. Esse tratamento apresenta grande potencial para diminuir a contaminação por microrganismos e reduzir as taxas de complicações, sendo uma alternativa promissora para a melhoria de implantes.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, Modificação de superfície, Contaminação fúngica.

ABSTRACT

Surgical site infections represent a serious complication in various procedures, especially in orthopedic surgeries due to the use of implants, which, in turn, favor biofilm formation. In this context, cold atmospheric plasma (CAP) surface treatment emerges as an innovative strategy to address these infections. Accordingly, this study aimed to analyze the effects of heating to 200 °C on Ti6Al4V surfaces combined with the application of an argon plasma jet in preventing fungal contamination by *Candida albicans*. For the evaluations, Ti6Al4V discs measuring 9 mm in diameter and 1 mm in thickness were used. The discs were treated in a closed chamber with an argon gas flow of 1 liter per minute (L/min) for 30 minutes. Analyses included wettability (contact angle), surface free energy, microstructure via X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM). Treated surfaces exhibited a significant reduction in contact angle ($21.47 \pm 1.18^\circ$) compared to the control ($52.88 \pm 2.59^\circ$, $p < 0.05$), increased surface free energy (73.66 mJ/m^2 vs. 62.819 mJ/m^2), and increased polar component (67.46 mJ/m^2 vs. 12.82 mJ/m^2). XRD analysis indicated the formation of a titanium dioxide (TiO_2) film between 35° and 40° . Regarding fungal adhesion, a significant reduction in colony-forming units (CFU) of *C. albicans* was observed on treated surfaces (125,000 CFU/mL) compared to the control (205,000 CFU/mL, $p < 0.05$), along with reduced pseudohyphae formation and lower surface coverage ($19.14 \pm 1.92\%$ vs. $31.99 \pm 4.94\%$). Based on the results, it is concluded that the combined treatment of heating at 200 °C and argon plasma jet effectively induced surface modifications that reduced adhesion and colonization by *Candida albicans*. This treatment shows great potential in minimizing microbial contamination and reducing complication rates, representing a promising alternative for improving implants.

Keywords: Biocompatibility, Surface modification, Fungal contamination.

INTRODUÇÃO

As infecções do sítio cirúrgico representam uma das principais complicações pós-operatórias, com impacto significativo na morbidade, mortalidade e nos custos hospitalares (NONNENMACHER et al., 2023). Em cirurgias ortopédicas, o uso de implantes metálicos é comum, sendo esses rapidamente recobertos por proteínas do soro, o que favorece a adesão microbiana e a subsequente formação de biofilmes. A presença de biofilmes, bacterianos ou fúngicos, dificulta o tratamento convencional das infecções, podendo comprometer a integração do implante ao tecido ósseo e a recuperação do paciente (ZHAO et al., 2023).

Dentre os microrganismos envolvidos nessas infecções, destaca-se a levedura *Candida albicans*, identificada em aproximadamente 15% dos casos de sepse hospitalar, muitas vezes associada à contaminação de dispositivos médicos (WISPLINGHOFF et al., 2005). A presença dessa levedura em superfícies de titânio é particularmente preocupante, pois além de formar biofilmes resistentes, cria um ambiente hipóxico que favorece o crescimento concomitante de bactérias anaeróbicas, agravando a infecção (NOBILE et al., 2015). Além disso, infecções por *C. albicans* estão associadas a um aumento de até 40% na taxa de mortalidade (NOBILE et al., 2015).

O tratamento dessas infecções geralmente envolve desbridamento cirúrgico, uso prolongado de antimicrobianos, substituição parcial dos componentes ou, em casos mais severos, a remoção total do implante (KUIPER et al., 2013). Apesar dos avanços nas estratégias diagnósticas e terapêuticas, essas infecções ainda representam um desafio clínico, exigindo abordagens multidisciplinares e inovadoras (KARCZEWSKI et al., 2019).

Nesse contexto, o uso do plasma atmosférico frio (CAP) tem se destacado como uma alternativa promissora para a funcionalização de superfícies metálicas, por sua capacidade de inativar biofilmes resistentes, inclusive de *Candida albicans* (BENCINA et al., 2021). Estudos demonstram que o CAP apresenta ação antimicrobiana contra uma ampla gama de patógenos, incluindo *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (NONNENMACHER et al., 2023).

Além da ação antimicrobiana, o CAP modifica favoravelmente as propriedades físico-químicas da superfície do titânio, reduzindo o ângulo de contato e aumentando a molhabilidade, o que favorece a adesão celular e pode potencializar a osseointegração (HUI et al., 2020). Essas alterações ocorrem devido à introdução de grupos funcionais, como hidroxilas e óxidos de titânio, na superfície metálica (MARTINS et al., 2024; WILLIAMS et al., 2017). No entanto, esses efeitos podem ser temporários, uma vez que o tratamento não altera permanentemente a microestrutura do material.

Estudos indicam que a eficácia do CAP depende do tipo de material tratado e da durabilidade dos efeitos superficiais. Em superfícies de zircônia, por exemplo, a atividade antimicrobiana do CAP é mantida por até 14 dias, diminuindo progressivamente após esse período (YANG et al., 2020).

Para superar essa limitação, pesquisadores propõem a associação do CAP ao aquecimento controlado das superfícies metálicas durante o tratamento. Essa estratégia pode promover alterações mais duradouras na topografia e composição superficial do implante, aumentando sua resistência à colonização microbiana sem comprometer a biocompatibilidade (AKHAVAN et al., 2018). No entanto, os efeitos dessa abordagem combinada ainda necessitam de investigação aprofundada.

Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo avaliar a aderência de *Candida albicans* em superfícies de Ti6Al4V submetidas ao aquecimento a 200 °C e simultaneamente tratadas com jato de plasma com fluxo de argônio, visando prevenir a formação de biofilmes e contribuir com estratégias mais eficazes para a prevenção de infecções associadas a implantes metálicos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tratamento das superfícies

O tratamento das superfícies das amostras foi realizado no Laboratório de Processamento de Materiais por Plasma da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), utilizando um equipamento desenvolvido pela própria equipe do laboratório. A Figura 1 apresenta o diagrama esquemático do sistema construído para o tratamento de amostras por jato de plasma, o qual incorpora adaptações para controle térmico, com base no modelo originalmente proposto por Vitoriano (2023).

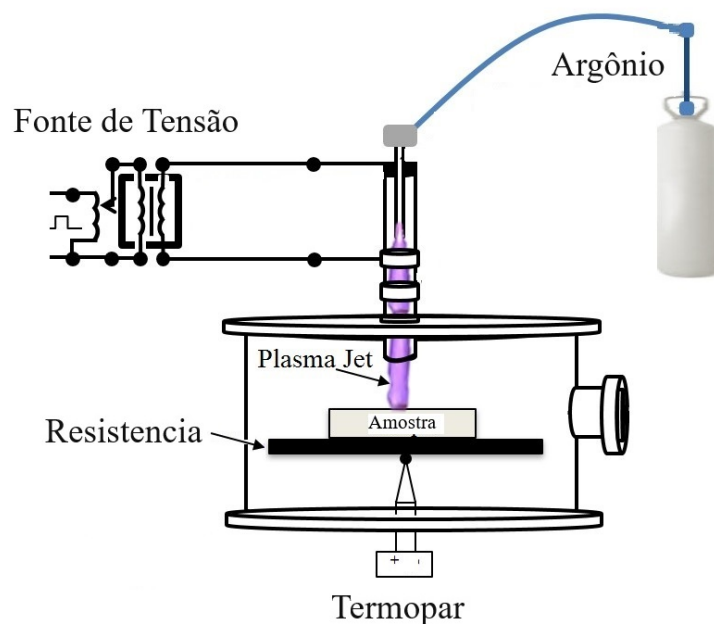


Figura 1 – Esquema ilustrativo do sistema de jato de plasma atmosférico frio com controle térmico utilizado no tratamento das amostras de Ti6Al4V. O equipamento é composto por uma fonte de alta tensão, cilindro de argônio, região de descarga para geração do plasma, câmara de tratamento e suporte com aquecimento controlado. Adaptado de Vitoriano (2023).

O sistema é composto por uma fonte de tensão elétrica, responsável por gerar a descarga necessária para a formação do plasma, e por um cilindro de argônio que fornece o gás para a região de descarga, onde ocorre o processo de ionização. O jato de plasma é direcionado para o interior de uma câmara fechada, na qual a amostra é posicionada sobre uma resistência elétrica que atua simultaneamente como suporte e como elemento de aquecimento com controle de temperatura. A fim de assegurar a estabilidade térmica do processo, um termopar é acoplado ao sistema para monitoramento contínuo da temperatura da amostra durante todo o tratamento.

As amostras foram posicionadas sobre uma resistência elétrica plana, que desempenha dupla função: suporte físico e elemento de aquecimento. O controle térmico foi fundamental para o experimento, sendo mantida uma temperatura constante de 200 °C durante a exposição ao jato de plasma. A temperatura da superfície foi monitorada continuamente com o auxílio de um termopar acoplado ao sistema, assegurando reprodutibilidade e estabilidade térmica ao longo do processo.

Os parâmetros utilizados para o tratamento experimental foram baseados nas condições operacionais previamente estabelecidas por Vitoriano (2023), embora seu estudo original tenha sido voltado a outras finalidades. No presente experimento, empregou-se uma descarga elétrica com valores fixos de 6,5 kV de tensão e frequência de 50 kHz. O fluxo de gás argônio foi mantido constante em 1 litro por minuto (L/min), garantindo uma atmosfera estável e adequada para a geração e sustentação do plasma. Cada amostra foi individualmente aquecida a uma temperatura controlada de 200 °C durante um período de 30 minutos, sob exposição contínua ao jato de plasma. Essa configuração permitiu a análise dos efeitos do tratamento em condições termicamente estabilizadas, assegurando reprodutibilidade e controle sobre as variáveis de temperatura e exposição elétrica.

Preparação dos discos para caracterização da superfície:

Foram utilizados discos da liga Ti6Al4V com 9 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Inicialmente, os discos passaram por um processo de lixamento progressivo com lixas de carbetto de silício (SiC) de diferentes granulometrias (220, 400, 600, 1500 e 2000 MESH), seguido de polimento mecanoquímico utilizando uma suspensão coloidal composta por 40% de sílica (0,03 µm) e 60% de peróxido de hidrogênio a 35%, durante 30 minutos. Após o

polimento, as amostras foram submetidas a uma limpeza sequencial por imersão em cuba de ultrassom, utilizando inicialmente uma solução aquosa de 0,5% de detergente enzimático (DEIV), seguida por etanol absoluto e, por fim, água bidestilada. Cada etapa de lavagem foi realizada por 10 minutos para garantir a completa remoção de resíduos orgânicos e particulados.

Concluído o processo de limpeza, os discos foram secos, selados em embalagens grau cirúrgico e encaminhados para o tratamento com plasma atmosférico frio. O procedimento foi realizado em câmara fechada com jato de plasma gerado a partir de argônio, com fluxo constante de 1 L/min. Simultaneamente, as amostras foram aquecidas a 200 °C por 30 minutos, com auxílio de uma resistência elétrica, conforme ilustrado na Figura 1.

Caracterização das superfícies dos discos Ti6Al4V:

A determinação da molhabilidade das superfícies foi realizada por meio da técnica da gota sésil, conforme descrito por Drelich (2013) e Tadmor & Yadav (2008). O experimento utilizou um sistema desenvolvido no Laboratório de Processamento de Materiais por Plasma da UFERSA, composto por uma base plana móvel (porta-amostras) com ajuste vertical, uma câmera digital (modelo VP 540s, Intelbras) para captura de imagens e uma seringa para deposição controlada dos líquidos (Figura 2a). As amostras foram posicionadas individualmente sobre o porta-amostras, e sobre cada superfície (tratada e controle – apenas polida) foram depositadas gotas de 10 µL de água destilada (Figura 2b) e glicerol. O ângulo de contato entre o líquido e a superfície foi então calculado por meio do software Surftens 3, permitindo a análise quantitativa da molhabilidade das diferentes condições experimentais.

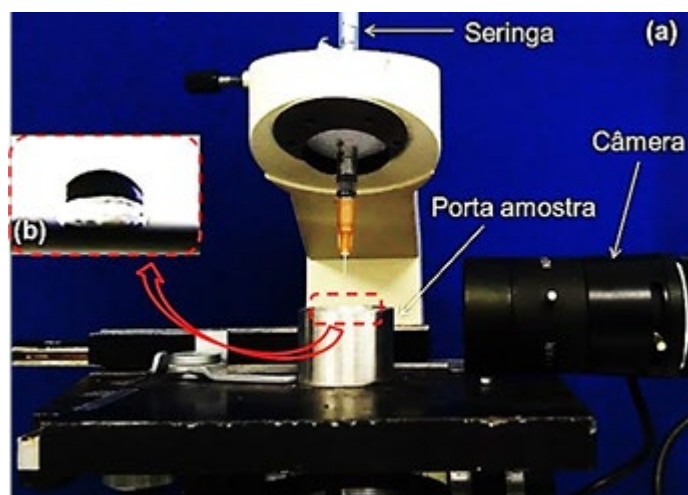


Figura 2 - Ilustração do equipamento utilizado para determinação do ângulo contato. a) equipamento, b) gota depositada no porta-amostra. Fonte: Vitoriano (2021)

Determinação da energia de superfície:

A energia de superfície foi calculada com base nos ângulos de contato obtidos. O modelo teórico adotado para a determinação da tensão superficial segue a equação de Huang et al. (2003), considerando as componentes dispersiva (γS_d) e polar (γS_p) do sólido e do líquido, conforme descrito por Fowkes (1962).

Difração de Raios X em Ângulo Rasante (DRX)

As análises de DRX foram realizadas utilizando um difratômetro Ultima IV Rigaku operando com radiação Cu-K α a 40 KV e 30 mA na configuração Seemann-Bohlin e com ângulo de incidência rasante. Fixou-se o ângulo de incidência do feixe de raios X em 1°, na faixa de medição entre os ângulos 2 θ de 30° e 55°, com passo de 0,01° e velocidade de aquisição de 2° por minuto.

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

O cultivo das cepas foi realizado no Laboratório de Microbiologia Veterinária (LAMIV).

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 discos (n=5) e não tratados (controle, n=5), antes da inoculação os discos foram submetidos ao tratamento UV durante 15 minutos de cada lado, totalizando 30 minutos.

Os discos foram dispostos em uma placa estéril de 24 poços, seguido de incubação aerobiamente por 90 minutos (fase de adesão) a 37 °C (PONDE et al., 2021). Posteriormente, a suspensão foi retirada de cada poço e estes sutilmente 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 à diluição seriada até 10-6. De cada diluição, foram inoculadas microgotas de 10 µL, em duplicata, sobre placas contendo Ágar Sabouraud acrescidas de cloranfenicol, as quais foram incubadas por 48 horas à 37 °C. Após esse período, foi 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 (Figura 3).

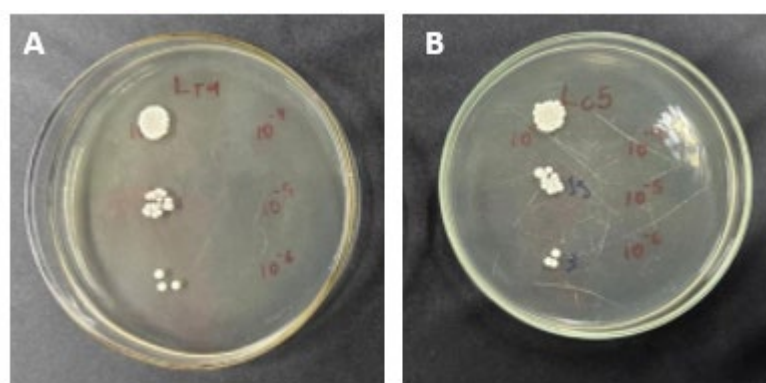


Figura 3 - Placas contendo Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol. Demonstrando a formação das unidades formadoras de colônias (UFCs) de *Candida albicans* previamente expostas a superfícies de Ti6Al4V, em diluições 10-2 e 10-3. A - UFC formada a partir da

amostra colhida em discos tratados e B - discos em tratamento, controle. Fonte: Arquivo Pessoal

Análise Morfológica

Após a inoculação e incubação por 90 minutos, cinco discos tratados e cinco controles foram fixados em uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (pH 7,4) à temperatura ambiente por 12 horas. Em seguida, realizou-se uma pós-fixação com tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora. As amostras foram então lavadas com água destilada e submetidas a um processo de desidratação em uma série crescente de etanol (25%, 50% e 75%) por 5 minutos em cada concentração, finalizando com imersão em etanol absoluto por 15 minutos. Após a desidratação, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro de 9 nm para possibilitar a visualização em um microscópio eletrônico de varredura (Tescan Vega3, TESCAN ORSAY HOLDING, Brno, República Tcheca).

Para a mensuração da área coberta por *Candida albicans* nas superfícies Ti6Al4V V, foi utilizado o software ImageJ v. 1.54m. As análises foram realizadas a partir de imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) nas ampliações de 500x e 2000x. Para cada magnificação e tipo de material, foram capturadas quatro imagens de diferentes campos: duas de superfícies controle e duas de superfícies tratadas. No total, foram analisadas 16 imagens, sendo 8 da liga tratadas e 8 dos discos controles.

Análises Estatísticas

Os dados foram expressos em média $\pm$ DP e avaliados quanto à distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Após confirmação dos pressupostos paramétricos, o número médio de UFC/mL foi analisado pelo teste t, considerou-se o nível de significância de $p < 0,05$. A análise foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism, versão 9. Enquanto, a área média ocupada pelas leveduras e pseudohifas obtidas a partir das SEM imagens foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Análise da Molhabilidade:

A Figura 7 ilustra a diferença no ângulo de contato da água entre a superfície de Ti6Al4V controle e a tratada com plasma atmosférico frio (CAP). Observa-se uma redução significativa no ângulo de contato no grupo tratado ($21,47 \pm 1,18^\circ$) em comparação ao controle ($52,88 \pm 2,59^\circ$), resultado estatisticamente significativo ($p < 0,05$, Teste t de Student). Esse achado indica que o tratamento com CAP promoveu uma melhora substancial da molhabilidade da superfície, tornando-a mais hidrofílica.

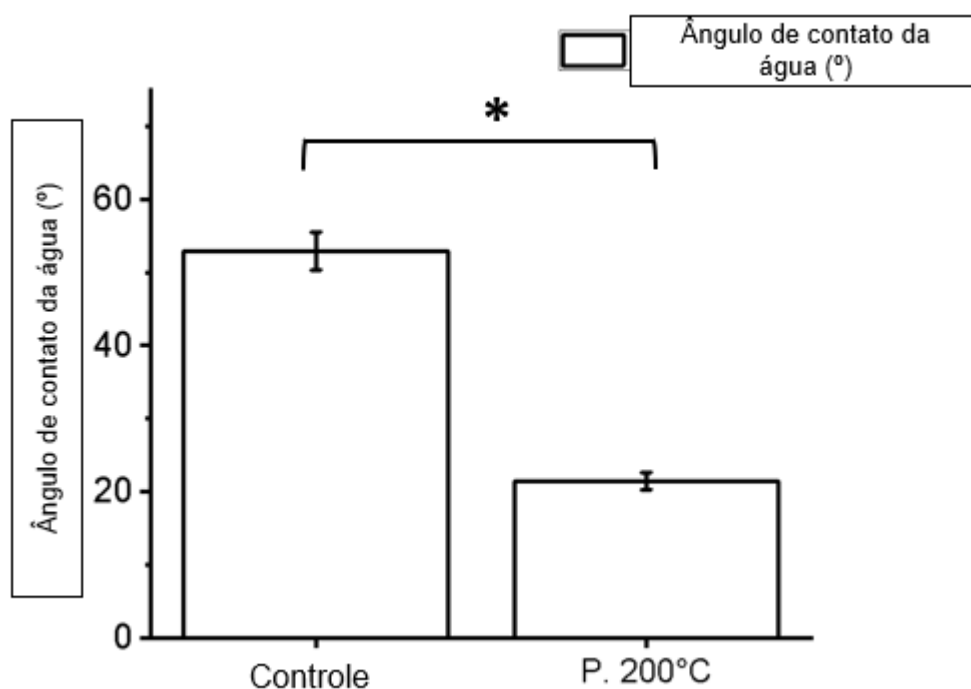


Figura 4 - Análise do ângulo de contato das superfícies de Ti6Al4V aquecidas a 200° C e tratadas com plasma atmosférico a frio e superfícies não tratadas. * $p < 0,05$ (Teste Student).

Análise da Energia de Superfície:

Após a análise do ângulo de contato, calculamos a energia livre superficial (γ_s), seus componentes polares (γ_s^p) e dispersivo (γ_s^d) (Figura 8). Os resultados dessas avaliações foram representados na figura 8. A energia livre superficial do grupo tratado exibe a energia superficial mais alta com $73,66 \text{ mJ/m}^2$, enquanto o não tratado apresentou a energia superficial mais baixa com $62,819 \text{ mJ/m}^2$. Demonstrando que a exposição ao plasma leva a um aumento da energia livre superficial. Observou-se também um aumento nos componentes polares no grupo tratado com $67,46 \text{ mJ/m}^2$ em comparação com o grupo controle com $12,82 \text{ mJ/m}^2$. Por outro lado, observou-se redução nos componentes dispersivos no grupo controle com $6,19 \text{ mJ/m}^2$ em comparação com o grupo tratado com $49,36 \text{ mJ/m}^2$. Isto sugere que o arranjo experimental garante uma modificação da superfície.

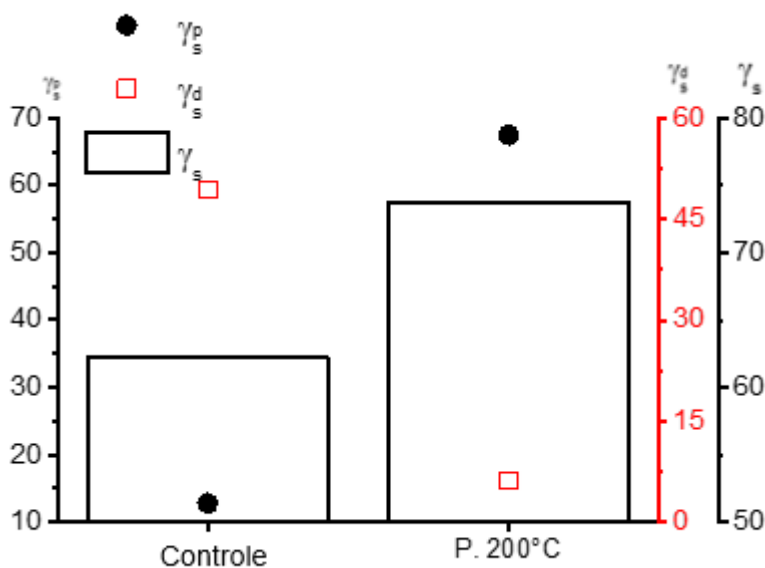


Figura 5 - Análise da energia livre superficial (γ_s) e seus componentes polares (γ_s^p) e dispersivo (γ_s^d) das superfícies de Ti6Al4V tratadas com plasma atmosférico a frio e superfícies não tratadas.

Difração de Raios X em Ângulo Rasante (DRX):

Na análise do difratograma do ângulo rasante pode-se observar a formação de filme de dióxido de titânio (TiO₂), com presença predominante da estrutura rutilo apenas nas superfícies de Ti-6Al-4V tratadas com plasma atmosférico, à medida que o ângulo rasante foi alterado de 35° a 40° (Figura 9).

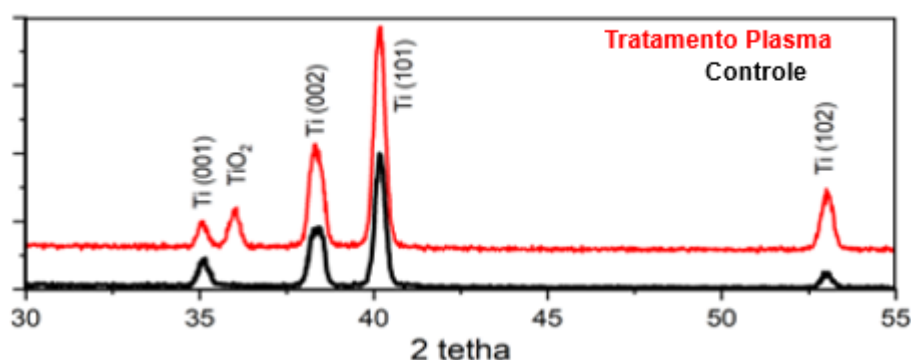


Figura 6 - Análise do Ângulo Rasante (DRX) de amostras tratadas com plasma atmosférico a frio e superfícies não tratadas.

Unidades formadoras de colônias (UFC)

Houve uma redução significativa no número de UFC sobre a superfícies de Ti6Al4V, aquecidas a 200 °C e tratados simultaneamente com plasma atmosférico a frio que apresentou uma média de μ : 125.000 UFC/ml, em relação às superfícies apenas polidas μ : 205.000 UFC/ml, (* $p < 0,05$) (Figura 6). Isso demonstra que o tratamento das superfícies discos de Ti6Al4V foi capaz de prevenir a aderência de cepas de *Candida albicans* mesmo após 90 minutos de incubação (Figura 7).

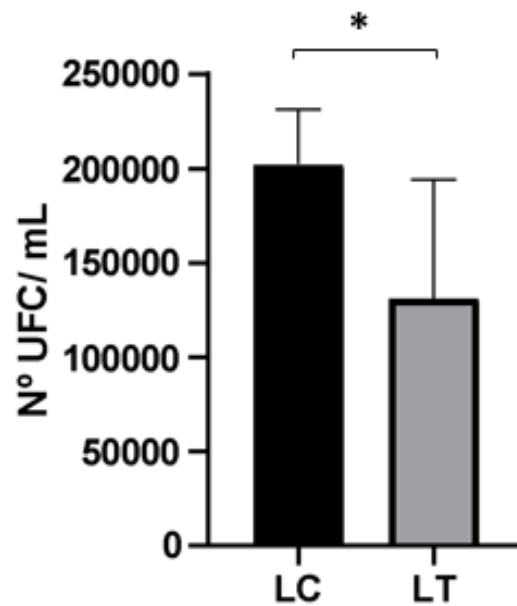


Figura 7 - Número médio de unidade formadoras de colônias de *Candida albicans* por ml (UFC/ml). Obtidas a partir de amostras colhidas da superfície de discos Ti6Al4V aquecido a 200 °C e tratados simultaneamente com Plasma atmosférico a frio. LC - Ti6Al4V controle; LT - Ti6Al4V tratada. * $p < 0,05$ (Teste t).

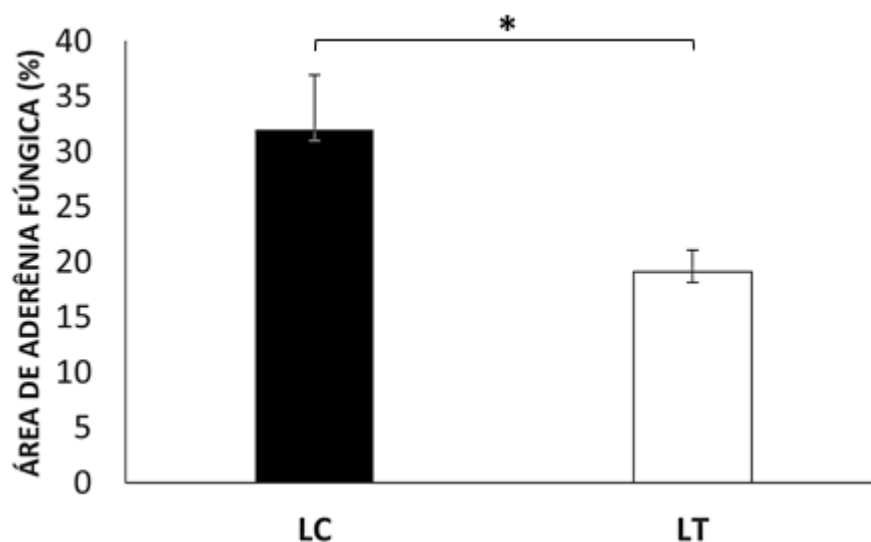


Figura 8 - Área média (%) da superfície dos discos de Ti6Al4V aquecidos a 200°C e simultaneamente tratados com plasma atmosférico a frio. Ocupada por leveduras e pseudohifas

de *Candida albicans*. LC - Ti6Al4V controle; LT - Ti6Al4V tratada. $*p < 0,05$ (teste de Mann-Whitney).

Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV):

Na análise morfológica ao MEV, observou-se no grupo controle (LC) uma maior concentração de agregados leveduriformes e de pseudo-hifas, com formação inicial de biofilme, enquanto nas superfícies tratadas (LT) observou-se menor concentração de agregados e pouca formação de pseudo-hifas, com com micro colônias isoladas e com poucas formações de pseudo-hifas entrelaçando e agrupando as leveduras (Figura 8). A área ocupada por leveduras e pseudohifas das superfícies tratadas (LT) foi significativamente menor que aquelas apenas polidas (LC, Figura 8).

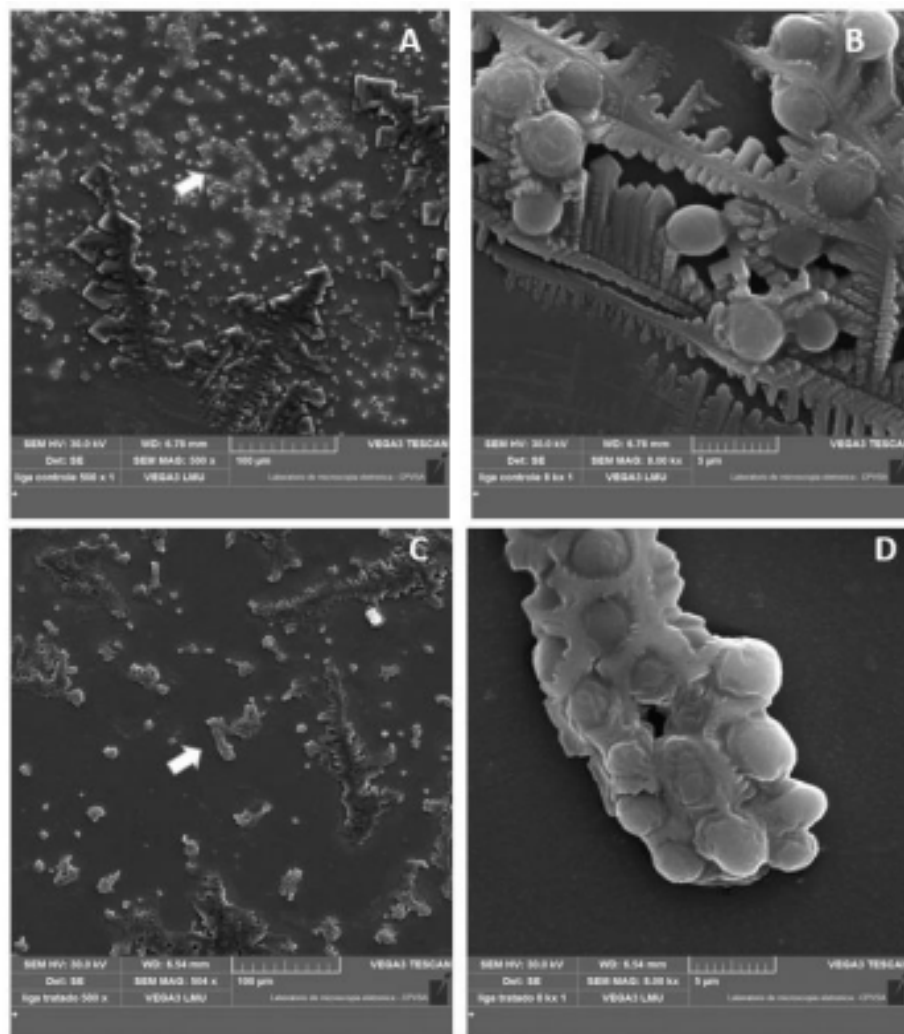


Figura 9 - Morfologia da *C. albicans* aderida as sobre as superfícies de Ti6Al4V. A - Amostra não tratada; B - ampliação com detalhes da imagem A; C - amostra tratada; D - ampliação com detalhes da imagem C. Setas indicam: A) Maior concentração de leveduras e pseudo-hifas, com formação inicial de biofilme. B) Pouca formação de pseudo-hifas, micro colônias isoladas e com poucas formações de pseudo-hifas entrelaçando as leveduras. Fonte: Arquivo Pessoal

DISCUSSÃO

Neste estudo, investigou-se o efeito do tratamento simultâneo de superfícies de Ti6Al4V com plasma atmosférico frio (CAP) e aquecimento a 200 °C. A combinação dessas técnicas promoveu modificações físico-químicas relevantes, resultando em superfícies mais hidrofílicas, com menor ângulo de contato, aumento da energia livre superficial e espessamento da camada de óxido de titânio (TiO₂). Tais alterações estiveram associadas a uma redução significativa na aderência fúngica de *Candida albicans*, sugerindo potencial para prevenir infecções associadas a implantes biomédicos.

A análise do ângulo de contato, amplamente empregada na avaliação da molhabilidade, revelou uma redução significativa nos valores após o tratamento com CAP ($21,47 \pm 1,18^\circ$) em comparação ao grupo controle ($52,88 \pm 2,59^\circ$; $p < 0,05$), indicando aumento expressivo da hidrofiliabilidade da superfície. Essa alteração está relacionada à remoção de contaminantes orgânicos, como hidrocarbonetos, e à inserção de grupos funcionais polares (-OH, -COOH) induzida pelo plasma (ATT et al., 2009; WANG et al., 2021).

A melhora na molhabilidade influencia diretamente a interação entre o material e microrganismos. De fato, superfícies mais hidrofílicas tendem a dificultar a adesão inicial de *C. albicans*, uma vez que prejudicam o contato eficaz entre os componentes da parede celular do fungo e a superfície do substrato (HARNETT et al., 2007; WATANABE et al., 2016). A análise microbiológica demonstrou uma redução significativa na contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml), com médias de 205.000 no grupo controle e 125.000 no grupo tratado, indicando menor colonização fúngica.

Apesar de alguns estudos apontarem que a adesão de *C. albicans* é reduzida em superfícies com baixa energia livre superficial (MOUHAT et al., 2020), os achados deste trabalho sugerem que outros fatores também contribuem para esse comportamento, como a microestrutura superficial e a presença de uma camada de óxido de titânio modificada. A formação dessa camada, promovida pelo aquecimento, pode alterar a carga da superfície, além de estabilizar as modificações induzidas pelo plasma, dificultando a colonização microbiana (YUAN et al., 2022).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) reforçou esses achados ao revelar, no

grupo tratado, a presença de poucas pseudo-hifas isoladas e ausência de estruturas de biofilme, enquanto no grupo controle observou-se maior densidade de leveduras e início da formação de matriz extracelular. Esses dados são consistentes com estudos que indicam a preferência de *C. albicans* por superfícies hidrofóbicas, enquanto superfícies hidrofílicas tendem a inibir tanto a aderência quanto o desenvolvimento de biofilmes (GAD et al., 2022).

Além disso, a ação do CAP favorece a oxidação da superfície e a formação de um filme fino contendo grupos funcionais como hidroxilas (OH), que pode ter efeitos temporários, especialmente devido à baixa temperatura do processo. No entanto, o aquecimento a 200 °C contribui para a estabilização dessas alterações e o espessamento da camada de TiO₂, conferindo propriedades adicionais ao material tratado (MARTINS et al., 2024).

O TiO₂, por sua vez, é conhecido por sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) sob exposição à luz, o que contribui para a destruição de microrganismos e redução da viabilidade de biofilmes em implantes (DAMODAR; YOU; CHOU, 2009; KRUMDIECK et al., 2019). Embora a geração de ROS dependa de fotocatalise, sua presença na superfície já modifica propriedades eletrostáticas e de carga que impactam a adesão celular.

Portanto, os achados deste estudo reforçam o potencial do uso combinado de CAP e aquecimento como uma estratégia eficaz na redução da aderência fúngica em superfícies de titânio, destacando-se como uma alternativa promissora ao uso de revestimentos antifúngicos ou antibióticos, especialmente no contexto da prevenção de infecções associadas a implantes.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o aquecimento de superfícies de Ti6Al4V a 200 °C, associado à aplicação de plasma atmosférico frio com fluxo de argônio, promoveu alterações físico-químicas significativas e favoráveis, que contribuíram para a redução da aderência e colonização de *Candida albicans*. Essas modificações indicam o potencial da estratégia como abordagem eficaz para controle microbiológico de superfícies metálicas em contextos biomédicos, especialmente em implantes onde a prevenção de infecções fúngicas é crítica para o sucesso clínico.

REFERÊNCIAS

AKHAVAN, Behnam; BARRAUD, Nicolas; YAGO, Alejandro J.; DUFFY, Sara; WANG, Ji; GEBER, Cintia; GOLBERG, Dmitri; WILLIAMS, Robert L. Plasma polymerized ethyl acrylate coatings: toward bioactive surfaces with long-term stability and controlled functionality. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 10, n. 13, p. 11420–11430, 2018.

ALTARAZI, Yousef; ABDALLAH, Mohammad N.; AJAMI, Ehab; ABU-MUCH, Rami; ALKHOURI, Ghiath; MAKHLOUF, Abdel Salam. Titanium oxide surface nanoengineering: tuning surface characteristics for antibacterial activity and osseointegration. *Materials Science and Engineering C*, v. 146, p. 114719, 2023.

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.

BENCINA, Mojca; JAKUSA, Gregor; JUKIC, Petra; CVELBAR, Uros. Cold plasma surface functionalization of biomaterials for antifungal applications: challenges and perspectives. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, v. 41, p. 1–19, 2021.

DAMODAR, Ranga A.; YOU, Shu-Jen; CHOU, Han-Hsiang. Study the self-cleaning, antibacterial and photocatalytic properties of TiO₂ thin films prepared by sol–gel method. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 207, n. 2–3, p. 218–223, 2009.

DRELICH, Jaroslaw W. Guidelines to measurements of reproducible contact angles using a sessile-drop technique. *Surface Innovations*, v. 1, n. 4, p. 248–254, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1680/si.13.00010>. Acesso em: [inserir data de acesso].

FOWKES, Frederick M. Determination of interfacial tensions, contact angles, and dispersion forces in surfaces by assuming additivity of intermolecular interactions in surfaces. *The Journal of Physical Chemistry*, Washington, v. 66, n. 2, p. 382–386, 1962.

GAD, Mohammed M.; AL-THOBITY, Ahmad M.; RAHOMA, Ali; ARREJAIE, Aws S. Influence of surface roughness and wettability on oral biofilm formation. *Journal of*

Prosthodontics, v. 31, n. 1, p. 23–31, 2022.

HARNETT, Erica M.; ALDERMAN, Jason; WOOD, Thomas. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 55, n. 1, p. 90–97, 2007.

HUI, Yuan; LIU, Zhi; ZHANG, Yu; WU, Yue; MA, Lei; ZHANG, Ying; HAN, Yong. Effects of non-thermal plasma surface modification on early osseointegration of titanium in a canine model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 108, n. 3, p. 642–652, 2020.

KARCZEWSKI, Dariusz; REGULA, Jarosław; MIKOŁAJCZYK, Tomasz; GIL, Janusz. Surgical site infections in orthopedic surgery: epidemiology, microbiology, and prevention. *Journal of Hospital Infection*, v. 102, n. 2, p. 202–212, 2019.

KRUMDIECK, Susan; ZHANG, Xiaowei; MCGREGOR, John; TRENTON, Justin; TANG, Xiaoyan. Photocatalytic coatings for disinfection of surfaces – A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 368, p. 732–744, 2019.

KUIPER, Jan W.; WINKELHORST, Sandra J.; SCHEPERS, Theo; PETERS, Ernst J. G.; SCHEPERS, Ron. Prosthetic joint-associated infections treated with DAIR (debridement, antibiotics, and implant retention): a literature review. *Acta Orthopaedica*, v. 84, n. 5, p. 512–520, 2013.

MARTINS, Rômulo P.; SILVA, Antônio S.; MORAIS, Ricardo F.; LIMA, Juliana V.; MEDEIROS, Beatriz F. Plasma atmosférico frio e envelhecimento do titânio: implicações sobre a estabilidade das superfícies modificadas. *Revista Brasileira de Implantodontia*, v. 28, n. 1, p. 12–19, 2024.

MOUHAT, Mélanie; PERRIN, Christine; GAY, Aurélien; LAURAUX, Coralie; COHEN, Jonathan. *Candida albicans* biofilm formation on dental materials and *Candida albicans*-mediated degradation of resin composite. *Journal of Oral Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 1743403, 2020.

NONNENMACHER, Ana L.; LIMA, Gabriela M.; MEDEIROS, Ricardo F.; VIEIRA, Luan

A. Cold atmospheric plasma: a novel strategy for the control of healthcare-associated infections. *Plasma Medicine*, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2023.

NOBILE, Clarissa J.; NETEA, Mihai G.; MITCHELL, Aaron P. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1 and its role in drug resistance and hypoxic growth. *PLoS Pathogens*, v. 11, n. 6, e1005212, 2015.

TADMOR, Rafael; YADAV, Preeti S. As-placed contact angles for sessile drops. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 317, n. 1, p. 241–246, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.09.029>. Acesso em: [inserir data de acesso].

TRABA, Christian; LIANG, Jian-Feng. Susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* biofilms to cold plasma. *Biofouling*, v. 27, n. 7, p. 701–710, 2011.

VITORIANO, Jussier de Oliveira. Modificação, caracterização de superfície de titânio CP tratado por plasma de H₂ - N₂ - O₂ e avaliação da bioatividade da superfície tratada. 2021. 100 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

VITORIANO, Jussier de Oliveira; MARTINS, Maria M. G.; BARROS, Priscila P.; MOURA, Cássia B. M.; SANTOS, Camila S.; BRAZ, Juliana K. F. S.; BARBOZA, Cláudio A. G.; ALVES JUNIOR, Cláudio. Inhibition of biofilm formation on titanium surfaces by non-thermal atmospheric plasma jet. In: BRAZILIAN MATERIALS RESEARCH SOCIETY MEETING (B-MRS), 21., 2023, Maceió. Proceedings of the XXI B-MRS Meeting. Maceió: B-MRS, 2023. ISBN 978-85-63273-54-3.

WANG, Zhi; ZHAO, Zheng; ZHANG, Ying; HAN, Yong. Effects of cold atmospheric plasma on titanium surface properties and its osteogenic potential. *Surface and Coatings Technology*, v. 406, p. 126747, 2021.

WATANABE, Yusuke; YAMASHITA, Kazuya; KIMOTO, Yuki; TAKAYAMA, Takuya; SHINODA, Hiroshi. Suppressive effect of surface wettability on microbial adhesion on titanium. *Dental Materials Journal*, v. 35, n. 3, p. 409–416, 2016.

WILLIAMS, David F.; KAJI, Hiroshi; RONG, Xinyuan; SONG, Bin. Titanium oxidation and the role of the oxide in bioactivity. *Acta Biomaterialia*, v. 63, p. 1–14, 2017.

WISPLINGHOFF, Hermann; BISCHOFF, Thorsten; TALLENT, Shiela M.; SEIFERT, Harald; WENZEL, Richard P.; EDMOND, Michael B. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, v. 39, n. 3, p. 309–317, 2005.

YANG, Yujie; ZHAO, Yu; ZHANG, Rui; WANG, Chao; HAN, Yong. Long-term antibacterial efficacy of cold plasma-treated zirconia against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Surface and Coatings Technology*, v. 389, p. 125629, 2020.

YUAN, Yanjun; QIN, Lian; SUN, Jiaqi; ZHANG, Ying; HAN, Yong. Surface modification of Ti implants with cold atmospheric plasma: effects on osseointegration and microbial adhesion. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 33, n. 4, p. 29, 2022.

ZHAO, Li; CHU, Paul K.; ZHANG, Ying; WU, Zhiyuan. Antibacterial coatings on titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 111, n. 4, p. 961–977, 2023.

Capítulo II.

TRATAMENTO TERMOQUÍMICO DE LIGA Ti6Al4V AUXILIADO POR PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO VISANDO USO EM IMPLANTES.

RESUMO

A superfície do titânio puro apresenta limitações quanto à indução de uma osseointegração precoce, favorecendo, em muitos casos, a formação de tecido fibroso entre o implante e o osso. Nesse contexto, o tratamento de superfícies com plasma atmosférico a frio tem se mostrado uma tecnologia promissora para otimizar a biocompatibilidade de implantes. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do aquecimento a 200 °C associado à aplicação simultânea de jato de plasma de argônio sobre a osseointegração de superfícies de Ti6Al4V. Foram utilizados parafusos de Ti6Al4V (1,5 mm × 5 mm), tratados em câmara fechada sob descarga elétrica com parâmetros fixos de 6,5 kV e 50 kHz, com fluxo de argônio de 1 L/min por 30 minutos. Para a análise in vivo, sete ratos Wistar adultos não castrados receberam implantes nas metáfises proximais de ambas as tíbias, sendo um parafuso controle e um tratado alocados aleatoriamente em cada animal. Os resultados obtidos por tomografia computadorizada revelaram um aumento significativo na densidade óssea na interface C dos implantes tratados, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), indicando maior deposição mineral ao redor do implante. A análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) demonstrou uma maior quantidade de osso neoformado e um contato mais íntimo entre o implante tratado e o tecido ósseo adjacente. Além disso, a espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) revelou uma razão molar Ca/P de 1,57, próxima à estequiometria ideal da hidroxiapatita (Ca/P = 1,67), corroborando a formação de matriz óssea mineralizada. Com base nesses achados, conclui-se que a associação entre aquecimento a 200 °C e jato de plasma de argônio promovem modificações benéficas na superfície dos implantes, favorecendo a osseointegração. Tal abordagem representa uma alternativa promissora para melhorar o desempenho de implantes ortopédicos e odontológicos, potencializando a cicatrização óssea e reduzindo o risco de falhas na interface osso-implante.

Palavras-chave: Biocompatibilidade, Modificação de superfície, Envelhecimento do Titânio.

ABSTRACT

The surface of pure titanium has limitations in inducing early osseointegration, often resulting in the formation of fibrous tissue between the implant and bone. In this context, cold atmospheric plasma (CAP) surface treatment has emerged as a promising technology to enhance the biocompatibility of implants. This study aimed to evaluate the effects of heating to 200 °C combined with simultaneous argon plasma jet application on the osseointegration of Ti6Al4V surfaces. Ti6Al4V screws (1.5 mm × 5 mm) were treated in a closed chamber using an electrical discharge system set to 6.5 kV and 50 kHz, with an argon gas flow of 1 L/min for 30 minutes. For in vivo evaluation, seven adult male Wistar rats received implants in the proximal metaphyses of both tibiae, with one treated and one untreated screw randomly assigned per animal. Computed tomography revealed a significant increase in bone density at the C interface of the treated implants compared to the control group ($p < 0.05$), indicating greater mineral deposition around the implant. Scanning electron microscopy (SEM) showed enhanced new bone formation and closer contact between the treated implant and the surrounding tissue. Additionally, energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) revealed a Ca/P molar ratio of 1.57, approaching the ideal stoichiometry of hydroxyapatite (Ca/P = 1.67), supporting the presence of mineralized bone matrix. Based on these findings, it is concluded that the combination of heating to 200 °C and argon plasma jet treatment induces favorable surface modifications that enhance osseointegration. This approach represents a promising strategy to improve the performance of orthopedic and dental implants by promoting bone healing and reducing the risk of implant failure.

Keywords: Biocompatibility, Surface modification, Titanium aging.

INTRODUÇÃO

A osseointegração é um processo biológico complexo que compreende uma sequência ordenada de eventos celulares e moleculares, incluindo a adesão celular, proliferação, diferenciação osteoblástica e deposição de matriz mineralizada na interface osso-implante. O sucesso desse processo depende, em grande parte, das características físico-químicas da superfície do biomaterial, que modulam diretamente a resposta celular e tecidual após a implantação (CHEN et al., 2023).

Neste contexto, as superfícies de ligas de titânio, como o Ti6Al4V, amplamente utilizadas em implantodontia e ortopedia, vêm sendo intensamente estudadas e modificadas para aprimorar sua performance biológica. Propriedades como rugosidade, energia superficial, molhabilidade e composição química têm sido ajustadas por meio de técnicas como jateamento, anodização, revestimentos bioativos e tratamentos térmicos. Tais modificações buscam otimizar a interação entre a superfície do implante e as células do tecido ósseo, favorecendo a formação de uma interface sólida e funcional (WANG et al., 2022; PARK et al., 2021).

Entre as abordagens mais recentes e promissoras, destaca-se o uso do plasma atmosférico frio (Cold Atmospheric Plasma – CAP) como método de funcionalização superficial. O CAP é uma tecnologia não térmica que utiliza gases ionizados a temperatura ambiente, promovendo a introdução de grupos funcionais (como hidroxilas e carbonilas) na superfície do titânio, sem comprometer sua integridade estrutural. Esses grupos modificam a energia livre superficial e aumentam a molhabilidade, favorecendo a adesão de proteínas da matriz extracelular e, consequentemente, a resposta osteogênica (KIM et al., 2023; ZHAO et al., 2024).

Estudos demonstram que a aplicação de CAP em superfícies de Ti6Al4V pode intensificar a diferenciação osteoblástica, aumentar a expressão de marcadores ósseos (como osteocalcina e fosfatase alcalina) e promover maior deposição de matriz mineral. Além disso, os efeitos do plasma podem ser potencializados quando combinados com rugosidades controladas ou tratamentos térmicos prévios, criando uma sinergia entre modificações químicas e topográficas (HAN et al., 2022; LUO et al., 2023).

Portanto, o tratamento de superfícies de titânio com plasma atmosférico frio apresenta-se como uma estratégia eficaz e segura para a biofuncionalização de implantes, promovendo um microambiente mais favorável à osseointegração (NGUYEN et al., 2023). Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a osseointegração de superfícies de Ti6Al4V submetidas ao aquecimento a 200 °C, associado à aplicação simultânea de jato de plasma com fluxo de argônio, visando promover uma superfície mais ativa e resistente ao envelhecimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tratamento dos parafusos Ti6Al4V

Dando continuidade aos estudos previamente realizados com discos de Ti6Al4V tratados por plasma atmosférico frio, o presente trabalho aplicou o mesmo protocolo de modificação superficial a implantes em formato de parafuso, com o objetivo de avaliar sua performance in vivo. Foram utilizados 14 parafusos de enxerto ósseo confeccionados em Ti6Al4V, com dimensões de 1,5 mm de diâmetro e 5 mm de comprimento. Os implantes foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo controle (sem tratamento, n = 7) e grupo tratado com jato de plasma atmosférico frio associado ao controle térmico, sob as mesmas condições aplicadas aos discos na fase in vitro (n = 7).

Os parafusos foram gentilmente fornecidos pela empresa Titanium Fix A.S. Technology Componentes Especiais Ltda., e o tratamento das superfícies foi realizado no Laboratório de Processamento de Materiais por Plasma da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Utilizou-se um equipamento desenvolvido pela própria equipe do laboratório, com adaptações específicas para a aplicação do jato de plasma com controle de temperatura. A Figura 1 apresenta o diagrama esquemático do sistema construído, baseado no modelo originalmente descrito por Vitoriano (2023), agora ajustado para o tratamento de implantes tridimensionais utilizados em experimentação animal.

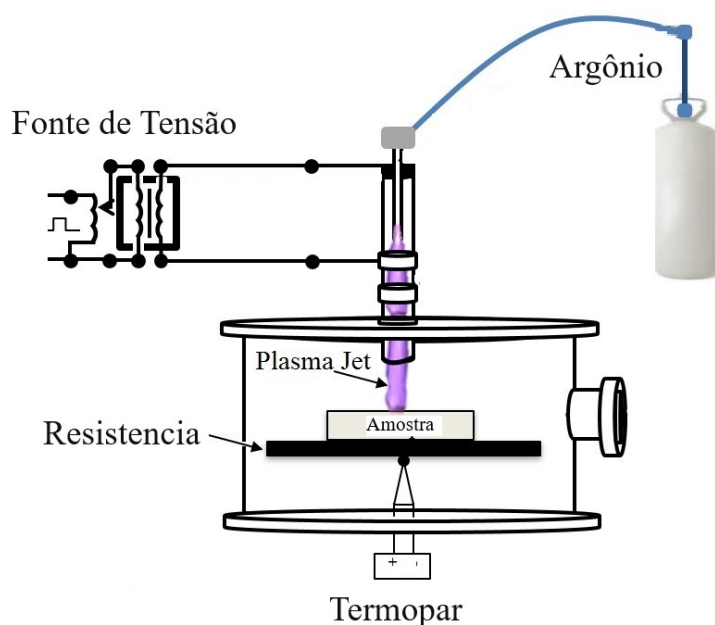


Figura 1 – Esquema ilustrativo do sistema de jato de plasma atmosférico frio com controle térmico utilizado no tratamento das amostras de Ti6Al4V. O equipamento é composto por uma fonte de alta tensão, cilindro de argônio, região de descarga para geração do plasma, câmara de tratamento e suporte com aquecimento controlado. Adaptado de Vitoriano (2023).

O sistema é composto por uma fonte de tensão elétrica, responsável por gerar a descarga necessária para a formação do plasma, e por um cilindro de argônio que fornece o gás para a região de descarga, onde ocorre o processo de ionização. O jato de plasma é direcionado para o interior de uma câmara fechada, na qual a amostra é posicionada sobre uma resistência elétrica que atua simultaneamente como suporte e como elemento de aquecimento com controle de temperatura. A fim de assegurar a estabilidade térmica do processo, um termopar é acoplado ao sistema para monitoramento contínuo da temperatura da amostra durante todo o tratamento.

As amostras foram posicionadas sobre uma resistência elétrica plana, que desempenha dupla função: suporte físico e elemento de aquecimento. O controle térmico foi fundamental para o experimento, sendo mantida uma temperatura constante de 200 °C durante a exposição ao jato de plasma. A temperatura da superfície foi monitorada continuamente com o auxílio de

um termopar acoplado ao sistema, assegurando reprodutibilidade e estabilidade térmica ao longo do processo.

Os parâmetros utilizados para o tratamento experimental foram baseados nas condições operacionais previamente estabelecidas por Vitoriano (2023), embora seu estudo original tenha sido voltado a outras finalidades. No presente experimento, empregou-se uma descarga elétrica com valores fixos de 6,5 kV de tensão e frequência de 50 kHz. O fluxo de gás argônio foi mantido constante em 1 litro por minuto (L/min), garantindo uma atmosfera estável e adequada para a geração e sustentação do plasma. Cada amostra foi individualmente aquecida a uma temperatura controlada de 200 °C durante um período de 30 minutos, sob exposição contínua ao jato de plasma. Essa configuração permitiu a análise dos efeitos do tratamento em condições termicamente estabilizadas, assegurando reprodutibilidade e controle sobre as variáveis de temperatura e exposição elétrica.

Animais

Foram utilizados sete ratos adultos, machos e não castrados. Os animais foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob condições controladas de temperatura e ciclo claro/escuro, com livre acesso à água e ração específica para roedores (ad libitum). Cada animal recebeu, por via cirúrgica, a implantação de um parafuso na região da metáfise proximal das tíbias direita e esquerda, alocadas de forma aleatória. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFERSA), conforme parecer nº 14/2023.

Cirurgias

No período pré-operatório, os animais não foram submetidos a jejum alimentar ou hídrico, em conformidade com as recomendações para roedores, a fim de evitar riscos de hipoglicemia e desidratação (Damy et al., 2010). A indução anestésica foi realizada por via intramuscular, utilizando uma associação de dexmedetomidina (10 µg/kg), metadona (0,4 mg/kg) e cetamina (15 mg/kg), garantindo sedação adequada, analgesia e anestesia

dissociativa.

Para a manutenção da anestesia durante o procedimento cirúrgico, utilizou-se isoflurano inalatório, administrado por meio de máscara facial conectada a um sistema de fornecimento contínuo de oxigênio (Figura 3), permitindo controle preciso da profundidade anestésica e promovendo rápida recuperação pós-operatória.



Figura 2 - Animal sob manutenção da anestesia, utilizando máscara de oxigênio adaptada com seringa e com o fluxo de isoflurano via inalatória. Fonte: Arquivo Pessoal

Para a inserção dos implantes, foi realizada uma incisão cutânea na região medial da tíbia, seguida de divulsão do tecido subcutâneo e da musculatura adjacente, permitindo a exposição adequada do osso (Figura 6). Em seguida, procedeu-se à perfuração de ambas metáfises proximais das tíbias direita e esquerda. Foi aplicado um parafuso em cada membro, utilizando uma furadeira de baixa rotação acoplada a uma broca de 1,2 mm de diâmetro. Após a perfuração, os parafusos de titânio foram cuidadosamente instalados na região preparada.



Figura 3 - Tíbias de rato preparadas para procedimento cirúrgico. Linha demonstra a localização da incisão cirúrgica. Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Após a implantação dos parafusos, realizou-se a sutura da pele (dermorrafia) utilizando fio de náilon 3-0, com padrão de sutura simples interrompida. No pós-operatório imediato, os animais foram medicados com o anti-inflamatório não esteroidal meloxicam (1 mg/kg), tramadol (6 mg/kg) e dipirona (50 mg/kg), administrados uma vez ao dia por três dias consecutivos. Além da analgesia, foi realizada limpeza local e curativos a cada 24 horas, mantendo-se esse protocolo até a retirada dos pontos, no décimo dia pós-operatório. Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram alojados no Biotério, sob observação clínica diária para monitoramento de possíveis alterações locais, como inflamação, infecção ou deiscência da ferida, além da avaliação de claudicação ou dificuldade de apoio do membro operado.

Coleta dos implantes

Os animais foram submetidos à eutanásia 30 dias após o procedimento cirúrgico. Para esse fim, foi administrada, por via intramuscular, uma associação de cloridrato de xilazina (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina (180 mg/kg). Decorridos 10 minutos da indução anestésica, procedeu-se à administração de cloreto de potássio por via intracardíaca, promovendo parada cardiorrespiratória e confirmando o óbito dos animais.

Em seguida, os membros pélvicos foram dissecados, e as tíbias incluindo os implantes e os tecidos moles adjacentes foram cuidadosamente removidas. As amostras foram então

fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 12 horas para posterior análise morfológica.

Avaliação de Tomografia Computadorizada

Para avaliar a estrutura das tíbias, os membros foram fixados longitudinalmente em blocos de cera, para em seguida serem posicionados na mentoneira do aparelho de tomografia computadorizada de feixe cônico, modelo 3D Promax (Instrumentarium, Tursula, Finlândia) (Figura 5). As tomadas foram realizadas com campo de visão 5,0x5,0 cm, 4mA e 89Kv.



Figura 4 - Tíbias de rato em 3D fixadas em blocos de cera, imagem produzida com aparelho de tomografia computadorizada. Fonte: SERES (2023).

A tomografia foi avaliada no modo reconstrução multiplanar, no qual, foram ajustados os 3 eixos sobre o implante, de modo que a imagem longitudinal mais central apresentou maior nitidez. Foi removido filtros de imagem para reduzir artefatos de objetos de alta densidade.

Foi traçado uma linha de densidade com a finalidade de obter a densidade média ao 2,0 mm longo da cortical óssea e a densidade cortical na interface ao implante. Foram realizadas as medições em 4 pontos: Região proximal do colo do implante (Região A), região inferior do colo do implante (Região B), região superior do ápice do implante (Região C) e região inferior

do ápice implante (Região D) (Figura 8).

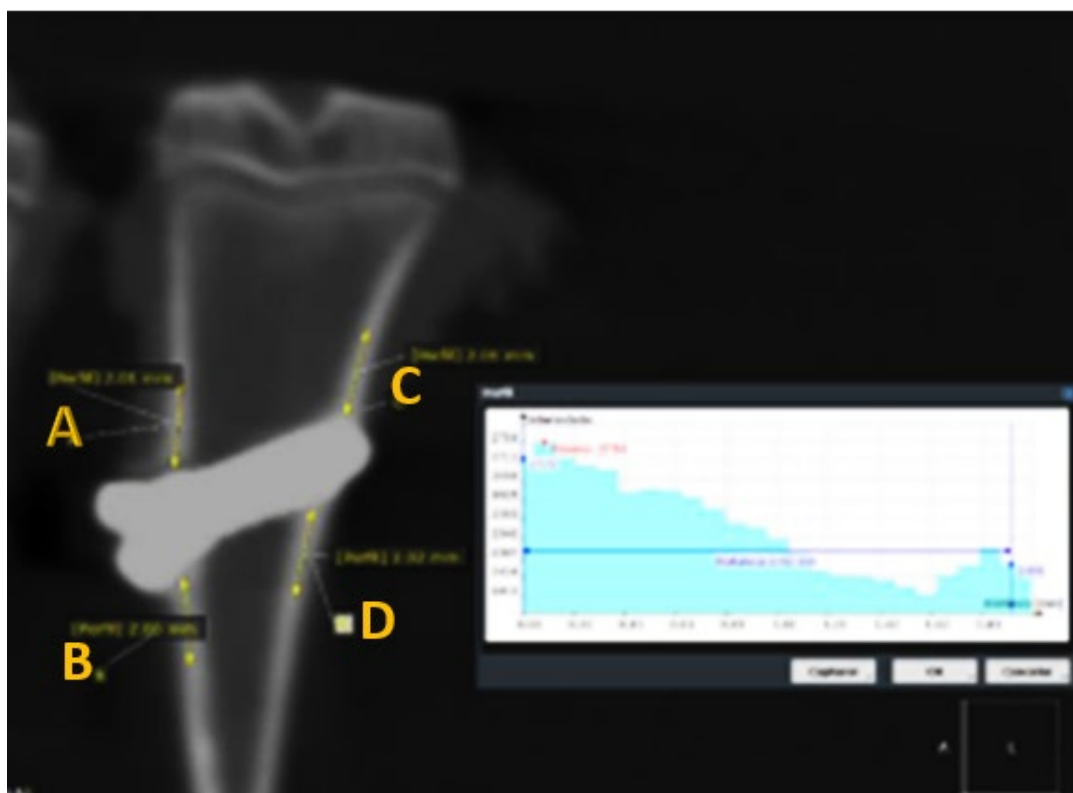


Figura 5 - A imagem demonstra os pontos das interfaces avaliadas A, B, C e D através de Tomografia computadorizada de Tíbia de rato com parafuso na região de metáfise proximal. Fonte: SERES (2023).

Avaliação de Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao microscópio eletrônico de varredura (MEV)

As amostras fixadas em paraformaldeído a 4% foram cuidadosamente fixadas em resina acrílica autopolimerável incolor Triunfo Dent's ®. Após a fixação, as amostras foram lixadas em de maneira gradual, com lixas de carbetto de silício (SiC) com diferentes granulometrias, 100, 220, 400 e 600 MESH.

Para a análise de Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X foi utilizado o sistema SEM. O material foi colocado no compartimento do MEV e após ter sido gerado um vácuo, a área analisada foi escolhida, e deu-se início ao bombardeamento de feixe de elétrons feito pela

fonte do microscópio que é altamente energética, formando uma lacuna linear e de mapeamento.

A morfologia dos revestimentos foi determinada com base nas micrografias de superfície obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução (MEV), (Vega3, Tescan). A forma, o tamanho, a quantidade e a distribuição dos poros, bem como a espessura do revestimento, foram quantificados utilizando o software ImageJ, que processou as imagens de microscopia eletrônica. As análises químicas da superfície da amostra foram realizadas utilizando um espectrômetro de raios X com energia dispersiva (EDS) (AztecLive, Oxford) acoplado ao MEV. Além da análise de superfície, as relações Ca/P também foram determinadas em cada posição ao longo de uma linha de varredura.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para avaliar a osseointegração foram obtidas as relações da densidade óssea da interface entre a superfície do implante e cortical do osso em quatro pontos (proximal lateral, proximal medial, distolateral e distomedial, denominadas de A, B, C e D, respectivamente). Os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk e confirmada a distribuição, realizou-se os testes ANOVA one-way, seguido dos pós teste de Tukey. Considerou-se o nível de significância de $p < 0,05$. A análise foi realizada com auxílio do software GraphPad Prism, versão 9. A análise EDS foi avaliada pelo teste U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

Análise Tomográfica Computadorizada (TC)

A avaliação por tomografia computadorizada (TC) foi realizada com base na razão entre a densidade óssea da interface osso-implante e a densidade da cortical adjacente em quatro regiões anatômicas distintas (A, B, C e D). Observou-se um aumento significativo da densidade óssea na interface C dos implantes tratados, em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Figura 10.

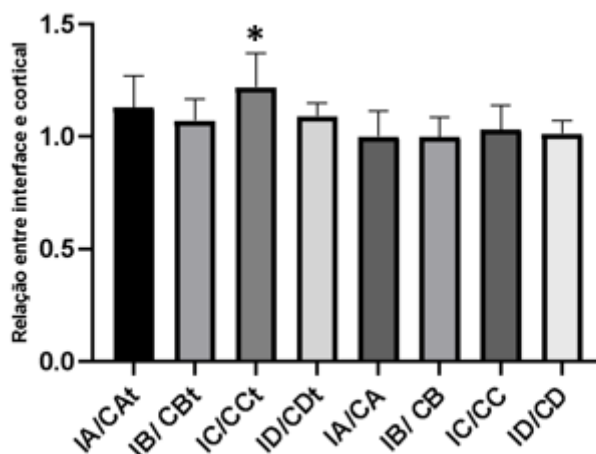


Figura 6 - Relação entre a densidade da interface osso-implante e a cortical óssea em diferentes regiões (A, B, C, D), comparando grupos tratados com plasma atmosférico aquecido a 200° e parafusos não tratados avaliados através de tomografia computadorizada. Observou-se aumento significativo na região IC/C do grupo tratado ($*p < 0,05$), sugerindo maior atividade mineral e osseointegração local.

Legenda: IA= Interface A; CAt=Cortical A tratada; IB= Interface B; CBt= Cortical B tratada; IC= Interface C; CCT= Cortical C tratada; ID= Interface D; CDt= Cortical D tratada; CA= Cortical A; CB= Cortical B; CC= Cortical C; CD= Cortical D.

Microscopia de Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi vista uma formação óssea mais consistente no grupo tratado, em torno de todo o implante (seta), conforme mostrado na figura 11(A). Foi observado também, o preenchimento de todas as roscas do parafuso na figura (B) * sugerindo uma maior osseointegração. Já no grupo controle, foi observada a presença de tecido ósseo mais delgada (C), com ausência de formação óssea em algumas roscas** (D).

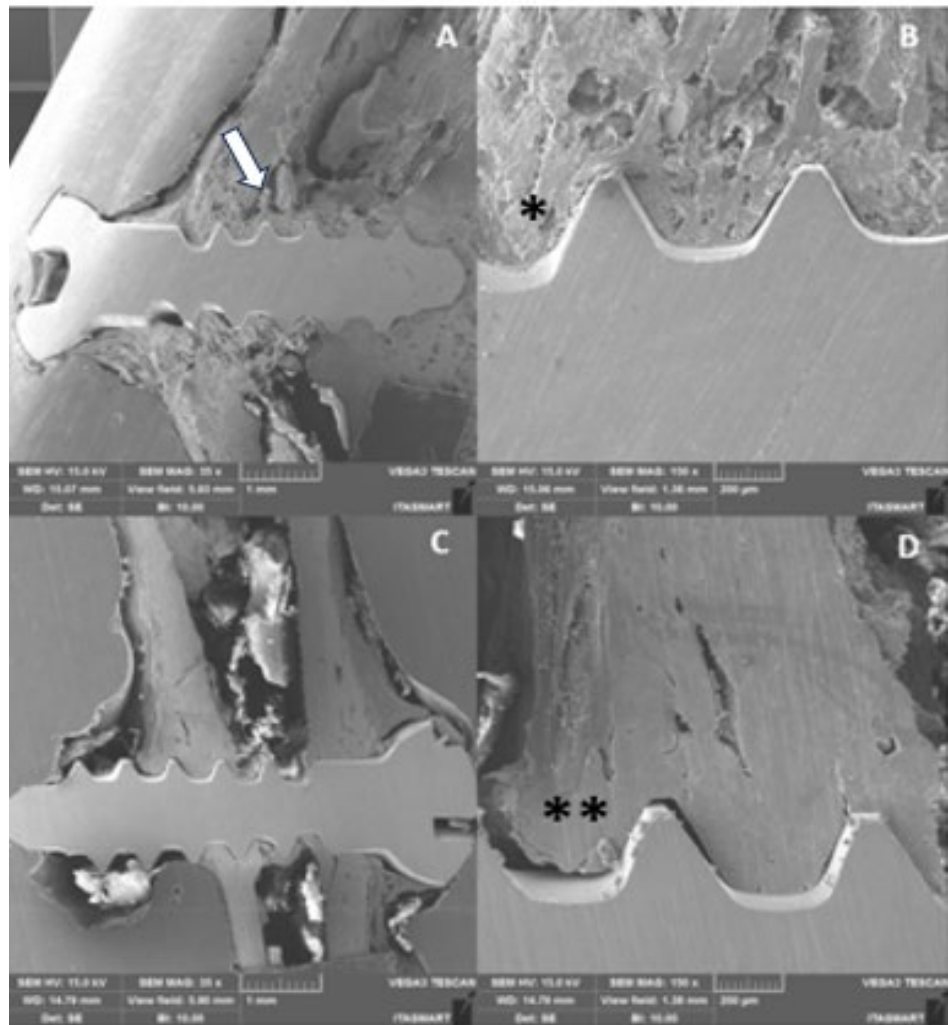


Figura 7 - Micrografia eletrônica mostrando as interfaces osso-parafuso tratado simultaneamente com Jato tratado por plasma e aquecido a 200 °C, inserido em Tíbia de Rato Wistar. Observa-se o preenchimento de osso por todas as roscas do parafuso tratado. (A), em uma projeção maior, observa-se uma maior aderência do osso ao implante * (B). Já a figura (C) observa-se uma menor quantidade de osso preenchendo as roscas do parafuso não tratado. Em

uma maior projeção (D) as roscas apresentam falhas no preenchimento com menor contato osso-implante **.

Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) acoplada ao MEV

A análise EDS foi realizada para avaliar possíveis mudanças na composição elementar na interface implante-osso e não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações dos elementos entre os implantes controle (Figura 12) e os implantes tratados (Figura 13) com plasma atmosférico a frio aplicado em superfícies de aquecidas a 200°C.

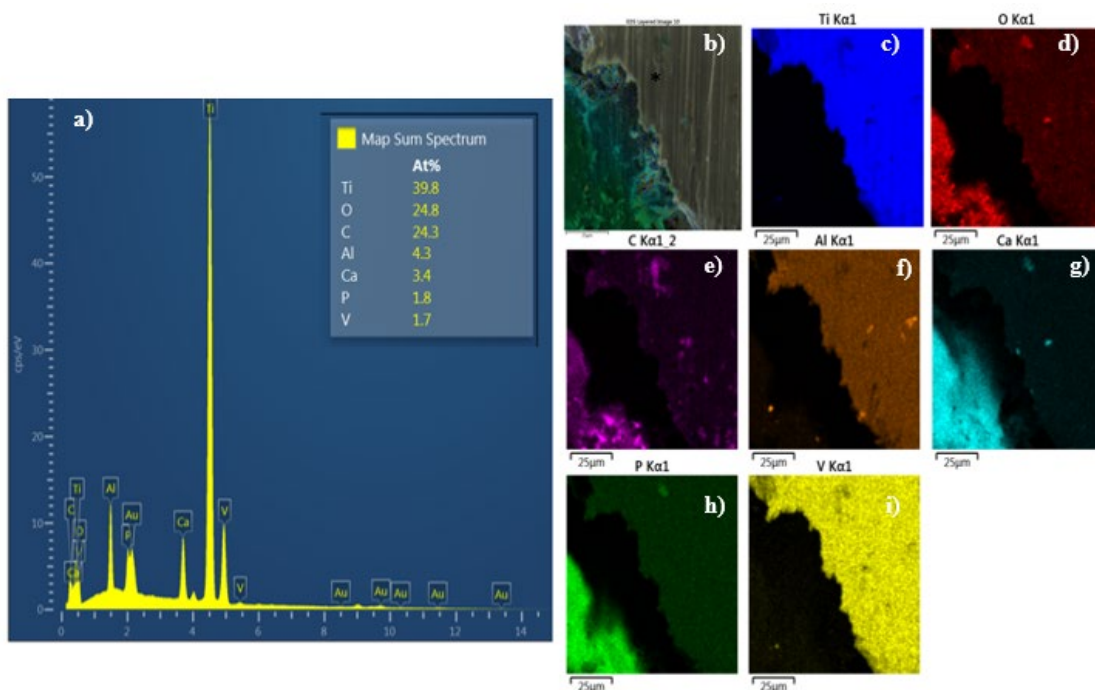


Figura 8: Imagens obtidas da avaliação de Espectroscopia de energia dispersiva de eletrons (EDS) acoplada ao MEV. (a) Distribuição Elementar por Mapeamento de Soma de Espectros. (b) Imagem eletrônica, (c) Titânio (Ti), (d) Oxigênio (O), (e) Carbono (C), (f) Alumínio (Al), (g) Cálcio (Ca) e (h) Potássio (P) e i) Vanádio (V) de amostras não tratadas.

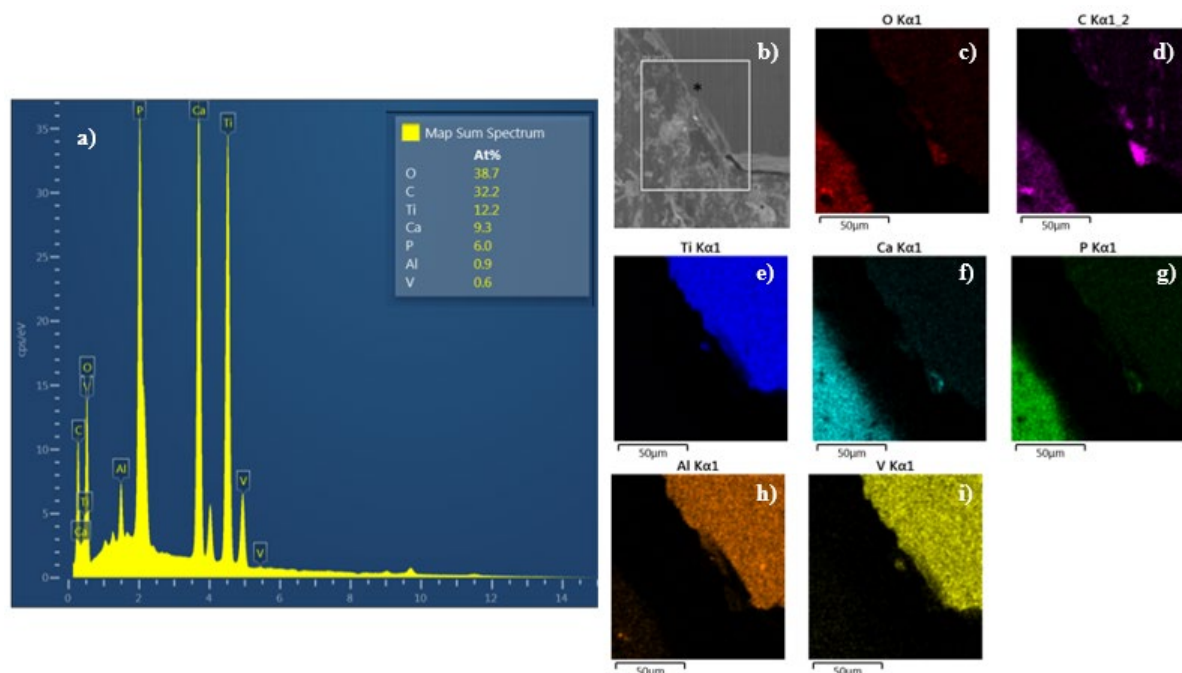


Figura 9 - Imagens obtidas da avaliação de Espectroscopia de energia dispersiva de elétrons (EDS) acoplada ao MEV. (a) Distribuição Elementar por Mapeamento de Soma de Espectros, (b) Imagem eletrônica, (c) Oxigênio (O), (d) Carbono (C), (e) Titânio (Ti), (f) Cálcio (Ca), (g) Potássio (P), (h) Alumínio (Al) e (i) Vanádio (V) de amostras aquecidas a 200° C e tratadas com plasma atmosférico a frio.

Não foi observada diferença significativa na relação entre Cálcio e fósforo, sendo observada uma baixa razão molar Ca/P (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação da concentração dos elementos (titânio TI, carbono C, oxigênio O, alumínio Al, cálcio Ca, fósforo P, Vanádio V e a relação cálcio e potássio Ca/P) na superfície óssea aderente ao implante. Valores expressos em mediana e limites mínimo e máximo (teste U de Mann-Whitney).

Elemento	Concentração (Controle)	Mín-Máx (Controle)	Concentração (Tratado)	Mín-Máx (Tratado)
Ti	18.3	11.4 – 39.1	20.5	9.2 – 43.4
C	32.3	26.5 – 45.5	29.6	16.2 – 59.0
O	32.4	17.7 – 44.9	33.3	20.3 – 43.9
Al	1.6	0.9 – 4.6	2.3	0.9 – 4.7
Ca	4.6	2.1 – 9.3	4.2	2.5 – 7.5
P	3.1	1.3 – 6.0	2.7	1.3 – 6.0
V	0.7	0.5 – 1.2	0.9	0.4 – 1.8
Ca/P	1.48	1.33 – 1.62	1.57	1.42 – 1.89

DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o efeito da aplicação simultânea de jato de plasma com fluxo de argônio e aquecimento da superfície de Ti6Al4V a 200 °C em parafusos inseridos em tíbias de ratos Wistar. Essa abordagem baseou-se em resultados prévios obtidos *in vitro* com discos da mesma liga metálica submetidos as mesmas condições de tratamento.

O tratamento reduziu o ângulo de contato e aumentou a energia superficial livre, favorecendo o componente polar, o que resultou em maior escoamento de água e melhor molhabilidade da superfície. Este estudo demonstrou que o tratamento promoveu alterações físico-químicas e estruturais significativas, com impacto positivo na osseointegração em modelo animal. Os dados obtidos tanto *in vitro* quanto *in vivo* sugerem a criação de um microambiente superficial mais bioativo, capaz de modular a adesão celular inicial, a deposição de matriz extracelular e a mineralização óssea subsequente (YADAV et al., 2023).

A tomografia computadorizada (TC) revelou um aumento significativo da densidade óssea na interface C dos implantes tratados ($p < 0,05$), sugerindo uma maior deposição mineral e formação óssea ao redor do implante. Este achado é indicativo de um processo osteogênico mais eficiente, compatível com a formação precoce de osso trabecular denso. Estudos recentes mostram que superfícies com maior energia livre superficial e rugosidade controlada favorecem a diferenciação de células osteoprogenitoras e aceleram a mineralização óssea (DU et al., 2024; FONSECA et al., 2023).

Do ponto de vista estrutural, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou uma maior quantidade de osso neoformado nos implantes tratados, com contato íntimo entre o implante e o tecido ósseo adjacente. Essa intimidade de contato, característica de osseointegração direta, reduz a presença de tecido fibroso interfacial e favorece a estabilidade mecânica do implante (XIAO et al., 2023).

A análise por espectroscopia de energia dispersiva (EDS) revelou uma razão molar Ca/P de 1,57, próxima à estequiometria da hidroxiapatita (1,67), confirmando a possível deposição de matriz óssea mineralizada. Esse perfil químico é frequentemente associado a um ambiente de osseointegração madura e ativa, como demonstrado em estudos recentes sobre superfícies biofuncionalizadas (TAVARES et al., 2023).

As evidências *in vitro* sustentam esses achados, com redução significativa do ângulo de contato e aumento do componente polar da energia superficial após o tratamento. Essas propriedades favorecem a adsorção de proteínas como fibronectina e vitronectina, essenciais para a ancoragem celular mediada por integrinas (WANG et al., 2024). Além disso, a formação de uma camada superficial de TiO₂, foi identificada por DRX a medida que o ângulo rasante variou entre 35° e 37,5°, indicando o crescimento de uma camada de óxido espessa e estável, essa característica contribui para a bioatividade da superfície e estabilidade química do implante, sendo uma das principais responsáveis pela nucleação de apatita em meio fisiológico (LIU et al., 2023).

A literatura evidencia que o tratamento térmico a 200 °C favorece a formação de filmes de TiO₂ com alta estabilidade e biofuncionalidade, mais eficientes do que aqueles formados em temperaturas inferiores (MARTINEZ; CHOURASIA, 2022). O TiO₂ apresenta propriedades fundamentais para a osseointegração, como boa adesão de proteínas da matriz extracelular, resistência à corrosão e ausência de toxicidade (PANTAROTO et al., 2020).

Esses fatores explicam, em parte, os resultados observados na interface C, onde houve acúmulo mineral significativo conforme revelado pela tomografia. Superfícies de titânio não modificadas podem levar meses até alcançar os níveis adequados de osseointegração (PARK et al., 2013). Neste estudo, o tratamento com plasma atmosférico frio (CAP) associado ao aquecimento demonstrou acelerar esse processo.

Em conjunto, os resultados obtidos indicam que a modificação da superfície com plasma e aquecimento é uma estratégia eficaz para promover a osseointegração, integrando aspectos topográficos, químicos e energéticos da superfície com a resposta óssea em nível celular e tecidual. E acredita-se que a transposição dessa metodologia para implantes em modelo animal permitiu investigar seus efeitos diretos sobre a osseointegração em um ambiente fisiológico de forma satisfatória. Sendo um tratamento promissor na melhoria de implantes ortopédicos e odontológicos, potencializando a cicatrização óssea e reduzindo o risco de falhas na interface osso-implante.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que o tratamento simultâneo com jato de plasma de argônio e aquecimento a 200 °C em superfícies de Ti6Al4V promove modificações físico-químicas favoráveis à osseointegração. A redução do ângulo de contato, o aumento da energia superficial e a formação de uma camada estável de TiO₂ contribuíram para maior molhabilidade, bioatividade e estabilidade da superfície.

Em modelo in vivo, observou-se aumento da densidade óssea na interface do implante, a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou maior presença de osso neoformado e contato íntimo entre o tecido ósseo e o implante tratado, reforçando a eficácia do tratamento na promoção da osseointegração. Além disso, observou-se a formação de hidroxiapatita em alguns animais, sugerindo maior adesão celular e deposição mineral. Assim, o tratamento proposto se mostra uma estratégia eficaz e promissora para acelerar a cicatrização óssea e melhorar o desempenho clínico de implantes ortopédicos e odontológicos.

REFERÊNCIAS

CHEN, Xinyao; LI, Yunpeng; ZHAO, Wei; HUANG, Cheng. Bioinspired titanium surfaces with hierarchical nanotopography for improved osteointegration. *Materials Science and Engineering: C*, v. 147, p. 114692, 2023.

DAMY, S. B.; CAMARGO, R. S.; CHAMMAS, R.; POLI DE FIGUEIREDO, L. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – aplicações em cirurgia experimental. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 103–111, 2010.

DU, Junwei; LIU, Xiaofeng; ZHANG, Yong; WANG, Lei. Synergistic effects of surface energy and microstructure on osteoblast differentiation: a tomographic and histological study. *Biomaterials Research*, [S.l.], v. 28, p. 13–21, 2024.

FONSECA, Fernanda Maria; ALMEIDA, Rodrigo Cunha; MEDEIROS, Aline Gomes; SILVA, Letícia Fernandes. Enhancing bone regeneration using plasma-modified titanium implants: evaluation by micro-CT and histomorphometry. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, [S.l.], v. 112, n. 1, p. 45–53, 2023.

HAN, Seunghee; KIM, Youngjun; JANG, Jihye; LEE, Donghyun. Synergistic effects of cold plasma and surface roughness on osteoblast behavior and osseointegration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 110, n. 3, p. 512–522, 2022.

KIM, Nayoung; LEE, Jungho; SONG, Hyunwoo. Plasma-assisted surface modification of titanium implants for enhanced osteogenic activity. *Applied Surface Science*, v. 610, p. 155466, 2023.

LIU, Yucheng; ZHAO, Wenjing; CHEN, Kai; HONG, Jian. Plasma-induced oxide films enhance calcium phosphate nucleation and bioactivity of titanium surfaces. *Coatings*, Basel, v. 13, n. 1, p. 109, 2023.

LUO, Jiali; WANG, Yan; CHEN, Min; FANG, Xiaodong. Enhanced bone regeneration on cold plasma-treated micro/nanostructured titanium implants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 226, p. 113366, 2023.

MARTINEZ, Diego; CHOURASIA, Abhijeet. High-temperature plasma oxidation of titanium alloys for biomedical use. *Surface and Coatings Technology*, [S.l.], v. 456, p. 129132, 2022.

NGUYEN, Tam D.; TRAN, Minh H.; PHAM, Hanh T.; LAM, Khoa T. Recent advances in cold atmospheric plasma for biomedical applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 11, p. 1152442, 2023.

PANTAROTO, Mariana; RIBEIRO, Heloísa S.; COSTA, André Felipe; VIEIRA, Rafael Santos. Oxidized titanium surfaces for implants: chemical stability and biological response. *Materials Science Forum*, v. 1010, p. 300–305, 2020.

PARK, Ji Won; KIM, Yeong Seok; LEE, Hyo Jin; CHO, Sung Ho. Accelerated osseointegration of surface-modified titanium implants in rat tibiae. *Clinical Oral Implants Research*, v. 24, n. 1, p. 41–50, 2013.

PARK, Jung-Ho; KIM, Min-Soo; LEE, Sang-Kyu. Surface modification of titanium and its alloys for biomedical applications: recent advances and future prospects. *Bioactive Materials*, v. 6, n. 9, p. 2491–2510, 2021.

TAVARES, Lucas Roberto; MORAES, Joana Vitória; LIMA, Daniel Henrique; SANTOS, Rafael Luiz. Titanium implants with calcium-enriched nanostructured surfaces promote osseointegration in rats: EDS and MEV analysis. *Materials Today Bio*, [S.l.], v. 24, p. 100793, 2023.

VITORIANO, J. O.; MARTINS, M. M. G.; BARROS, P. P.; MOURA, C. B. M.; SANTOS, C. S.; BRAZ, J. K. F. S.; BARBOZA, C. A. G.; ALVES JUNIOR, C. Inhibition of biofilm formation on titanium surfaces by non-thermal atmospheric plasma jet. In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISA EM MATERIAIS (B-MRS), 21., 2023, Maceió. Anais... Maceió: SBPMat, 2023. ISBN 978-85-63273-54-3.

WANG, Hao; ZHENG, Liqin; ZHU, Rui; CHEN, Min. The role of surface energy in protein adsorption and cell adhesion: implications for implant osseointegration. *Acta Biomaterialia*, [S.l.], v. 168, p. 35–45, 2024.

WANG, Hongmei; ZHANG, Liang; SUN, Wei; GUO, Zhiyong. Titanium implant surface modification by cold plasma and its effects on osseointegration. *Materials Today Bio*, v. 16, p. 100408, 2022.

XIAO, Jian; LI, Ming; SUN, Lei; HUANG, Chuan. Microscopic and tomographic evaluation of bone–implant interface in rats using treated titanium: a time-dependent study. *Journal of Orthopaedic Translation*, [S.l.], v. 41, p. 101587, 2023.

YADAV, Ramesh; KHAN, Faizan; SHARMA, Rajeev Kumar; SINGH, Vishal. Recent advances in cold plasma surface modifications of titanium-based implants for enhanced osseointegration. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 24, n. 7, p. 6278, 2023.

ZHAO, Xiaoyu; LI, Jie; WU, Weiliang; HUANG, Xin. Surface engineering of titanium for improved osseointegration: advances and future directions. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 12, n. 5, p. 1445–1460, 2024.

14. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos ao longo deste estudo demonstram o impacto significativo do tratamento combinado de aquecimento a 200 °C e jato de plasma de argônio na modificação de superfícies de Ti6Al4V. Esse método mostrou-se eficaz ao promover um aumento da molhabilidade e da energia superficial, além da formação de uma camada de dióxido de titânio (TiO₂). Tais alterações resultaram em avanços substanciais na osseointegração, evidenciados pelo aumento da densidade óssea na interface C e pela proximidade da estequiometria ideal Ca/P, indicando formação e maturação óssea favorecida pela presença de hidroxiapatita.

Adicionalmente, a análise microbiológica comprovou uma redução significativa na adesão e colonização de *Candida albicans* nas superfícies tratadas, reforçando o potencial do tratamento em prevenir complicações infecciosas. Essas melhorias são de suma importância para o êxito de implantes, contribuindo tanto para a eficácia do processo de cicatrização óssea quanto para a redução de infecções associadas.

Apesar dos resultados promissores, algumas limitações precisam ser destacadas, como o curto período de avaliação da cicatrização óssea. A análise realizada no intervalo de quatro semanas permitiu observar a fase inicial da osseointegração, mas não foi suficiente para investigar plenamente a maturação óssea em estágios mais avançados. Assim, estudos futuros são altamente recomendados, especialmente para validar essas descobertas em modelos clínicos e ampliar a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes às melhorias observadas.

Em conclusão, a tecnologia proposta representa uma solução inovadora e promissora na área de biomateriais. Ao combinar melhorias na integração óssea com a mitigação de riscos infecciosos, esse tratamento multifuncional oferece perspectivas relevantes para a evolução de implantes ortopédicos e odontológicos, contribuindo não apenas para a funcionalidade e eficiência, mas também para a segurança e durabilidade desses dispositivos.

**ANEXOS I – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA PESQUISA
VETERINÁRIA BRASILEIRA PVB**



**OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES Ti-6AL-4V AQUECIDOS
A 200°C E FUNCIONALIZADAS POR PLASMA ATMOSFÉRICO
EM RATOS WISTAR.**

Journal:	<i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>
Manuscript ID	PVB-7645
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	16-Feb-2025
Complete List of Authors:	de Oliveira, Kalyne Danielly ; Universidade Federal Rural do Semi-Arido Moura, Carlos; Universidade Federal Rural do Semi-Arido, Ciência Animal Paula, Valeria; UFERSA Júnior, Clodomiro ; Universidade Federal Rural do Semi-Arido Torres, Renato ; Universidade Federal Rural do Semi-Arido Silva, Naftale; UFERSA Oliveira, Moacir; Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Ciências Animais
Area:	Small Animal Diseases
Keyword:	Biocompatibility, Surface modification, Biological aging, Morfofisiologia/Animal Morphophysiology, Pequenos Animais/Small Animal Diseases

SCHOLARONE™
Manuscripts

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to
Ciência Rural

Manuscript ID
CR-2025-0094

Title
EFEITO DO TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE Ti6AL4V AQUECIDAS A 200 °C E TRATADAS
SIMULTANEAMENTE COM PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO SOBRE A ADERÊNCIA DE *Candida Albicans*.

Authors
Oliveira, Kalyne Danielly
Moura, Carlos Eduardo

Date Submitted
16-Feb-2025

ANEXO III - CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Mossoró, 5 de junho de 2023.

PARECER 14/2023

Certificamos que o projeto intitulado **"Osteointegração de superfícies de titânio funcionalizadas por plasma em ratos Wistar com diabetes induzida"** sob a responsabilidade de Carlos Eduardo Bezerra de Moura, o qual envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11.794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFERSA em reunião no dia 14 de abril de 2023.

Vigência do projeto	05/03/2023 a 08/04/2025
Espécie/linhagem	Rattus norvegicus / Wistar
N. de Animais	22
Peso/idade	400 g / 10 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério central da UERN

SIDNEI MIYOSHI

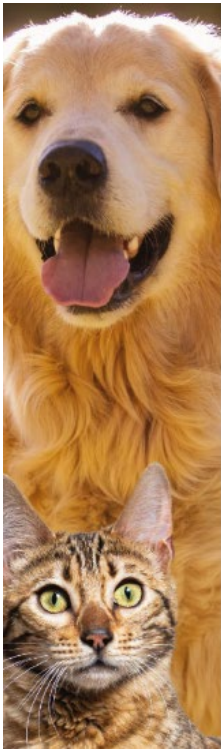
SAKAMOTO:112

03780877

Coordenador CEUA-UFERSA

Assinado digitalmente por SIDNEI MIYOSHI
Assinado por SIDNEI MIYOSHI
SAKAMOTO:11203780877
UFERSA - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Cx.
Código: 0000
Público: Qualquer pessoa com acesso à Internet
Data: 2023.06.05 16:27:04 BRT
Tipo: PDF Reader Versão 1.1.1.2

ANEXO IV. RESUMO APRESENTADO EM IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ORTOPEDIA DE CÃES E GATOS



IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ORTOPEDIA DE CÃES E GATOS

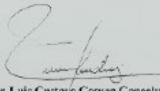
25, 26 e 27 — Abril de 2024
Centro de Convenções da Unesp/FCAV — Jaboticabal, SP

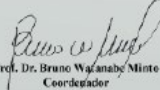
EMPRESA **PRÓ ÉTICA**
2022-2023

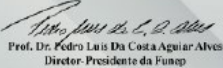


Certificamos que o trabalho científico intitulado “**USO DE PLASMA ATMOSFÉRICO A FRIO PREVINE CONTAMINAÇÃO FÚNGICA DE SUPERFÍCIES DE IMPLANTES METÁLICOS**”, de autoria de “**Oliveira, K. D. S.; Francelino, L. E.C.; Leite, V. G. S.; Vitoriano, J.O.; Feijó, F. M. C.; Santos, C. S.; Alves C.; Junior.; Moura, C. B. E**”, foi apresentado em Formato de Pôster no IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ORTOPEDIA DE CÃES E GATOS, organizado pela Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão - Funep, realizado na Unesp/FCAV – Câmpus de Jaboticabal, SP, no período de 25 a 27 de abril de 2024.

Jaboticabal, 27 de abril de 2024.

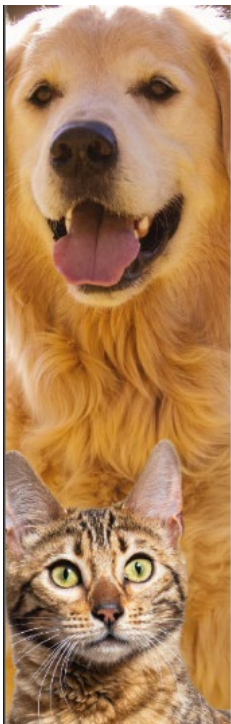

Prof. Dr. Luis Gustavo Goulart Gonçalves Dias
Coordenador


Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto
Coordenador


Prof. Dr. Pedro Luis Da Costa Aguiar Alves
Diretor-Presidente da Funep

Certificado registrado sob o nº 919/08

ANEXO V. RESUMO APRESENTADO EM IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ORTOPEDIA DE CÃES E GATOS



IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ORTOPEDIA DE CÃES E GATOS
25, 26 e 27 — Abril de 2024
Centro de Convenções da Unesp/FCAV — Jaboticabal, SP

EMPRESA PRO ÉTICA 2022-2023
ISO 9001
ISO 27001

Certificamos que o trabalho científico intitulado “OSTEOINTEGRAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE TITÂNIO FUNCIONALIZADAS POR PLASMA EM RATO WISTAR”, de autoria de “Oliveira, K.D.S.; Fernandes, N. S.; Morais, D. I.¹; Guimarães, G. E. C.; Leite, V. G. S.; Oliveira Filho, M. S.; Torres, R. M.; Fernandes, I. M.; Vitoriano, J.O.; Alves C. Junior; Moura, C. B. E”, foi apresentado em Formato de Pôster no IX SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ORTOPEDIA DE CÃES E GATOS, organizado pela Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão - Funep, realizado na Unesp/FCAV – Câmpus de Jaboticabal, SP, no período de 25 a 27 de abril de 2024.

Jaboticabal, 27 de abril de 2024.

Prof. Dr. Luís Gustavo Gosses Gonçalves Dias
Coordenador

Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto
Coordenador

Prof. Dr. Pedro Luis Da Costa Aguiar Alves
Diretor-Presidente da Funep

Certificado registrado sob o nº 91909