



U



C



Departamento de Física

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Modificação da superfície de implantes neuronais

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica na Especialidade de Instrumentação Biomédica e Biomateriais

Vera Mónica Correia Loureiro

2009/2010

Modificação da superfície de implantes neuronais

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica na Especialidade de Instrumentação Biomédica e Biomateriais

Orientação e Supervisão:

Ana Paula da Fonseca Piedade

CEMUC – Universidade de Coimbra

Vera Mónica Correia Loureiro

2009/2010

Agradecimentos

Durante este último ano lectivo várias pessoas contribuíram de uma forma directa ou indirecta para a realização deste trabalho.

O maior agradecimento, como não poderia deixar de ser, é para a Doutora Paula Piedade pela orientação, ajuda, disponibilidade, dedicação e amizade com que sempre me acompanhou tornando possível a realização deste trabalho.

Agradeço também à Professora Doutora Maria Teresa Vieira por tão bem me ter recebido no CEMUC.

Não poderei deixar de agradecer ao Doutor David Pinheiro pela ajuda, simpatia e pelas palavras de motivação que me transmitiu, à Doutora Sofia Ramos e ainda ao Mestre Jorge Nunes por todo o apoio na realização do trabalho.

Ao Professor Doutor Miguel Morgado deixo também o meu apreço pelo esforço e dedicação que sempre demonstrou pelo curso de Engenharia Biomédica e desejo a continuação de um excelente trabalho como o que tem vindo a desempenhar.

Aos amigos, familiares e colegas de trabalho agradeço por todos os momentos de diversão, pelos conselhos e pelas palavras de apoio.

Aos meus pais, à minha irmã, ao meu namorado agradeço de uma forma muito especial por todo o amor, carinho, apoio, compreensão, conforto e motivação ao longo de todos estes dias.

Resumo

Na área dos implantes cerebrais, as próteses neuronais incluem a utilização de eléctrodos para estímulo e registo. Os primeiros são aplicados para o alívio dos sintomas de doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Parkinson, e os últimos são parte integrante das interfaces cérebro-computador. Um dos materiais mais utilizados para estes tipos de eléctrodos é o silício micromaquinado, mas que tende a perder sinal para registos a longo prazo (semanas). Uma das razões para este problema é o aumento da impedância ao longo do tempo devido à reacção adversa do tecido nervoso. A abordagem deste trabalho é a de modificar a superfície dos eléctrodos com o intuito de a tornar pró-activa. Para tal, a nova superfície tem de ser capaz de responder com sucesso a alguns desafios: permitir a adesão de neurónios, prevenir a activação de astrócitos, inibir infecções associadas à implantação de biomateriais e induzir a formação da rede vascular. A originalidade do projecto é o desenvolvimento de um revestimento nanocompósito com gradiente de funcionalidade, baseado em materiais cerâmicos e poliméricos dopados com prata.

De entre a abrangência do tema, o trabalho desenvolvido neste estudo situa-se na fase preliminar, onde o intuito é escolher o melhor tipo de modificação superficial a efectuar nos implantes neuronais. Para tal foram depositados e caracterizados sistemas (cerâmico e polimérico) com e sem a presença de prata para avaliar a influência de cada tipo de material no filme compósito final. Assim foram depositados filmes finos de sílica (SiO_2), de polipropileno (PP) e de sílica/PP com teores de prata em intervalos de concentração de 0-13%at; 0-33%at e 0-8%at., respectivamente.

A análise estrutural, por difracção de raios-X, evidenciou que todos os filmes finos apresentam baixa ordem estrutural, excepto os que contêm prata na sua composição o que sugere uma estrutura compósita de cristais de prata embebidos na matriz do(s) material(ais) não metálico(s).

O estudo da interacção da superfície com ambientes fisiológicos, essencialmente caracterizados por serem soluções ou suspensões aquosas, foi avaliado através do estudo de ângulos de contacto estáticos e dinâmicos (ângulo de avanço e retrocesso) com água onde ficou evidente que a distribuição do elemento metálico na superfície dos filmes finos não é uniforme com o aumento do teor de prata. A avaliação da histerese do ângulo de contacto permitiu evidenciar a presença de grupos químicos funcionais nas superfícies modificadas.

Os testes *in vitro* foram efectuados por imersão das superfícies modificadas em fluido cefalorraquidiano simulado e permitiram concluir que a maior parte das superfícies modificadas apresentam excelente adesão ao substrato, sem, no entanto, se terem observado importantes alterações morfológicas, devidas à libertação de prata, após imersão.

Abstract

Within biomaterials field, neural implants include the use of electrodes for stimulation and registration. The first ones are applied for the relief of several neurodegenerative problems, such as Parkinson disease, and the formers are parts of brain/computer interfaces. The most used material for this purpose is micromachined silicon, although it tends to lose the registration signal for long time use (weeks). One of the reasons for this problem is the increase of impedance with time due to the adverse reaction of the biological tissue. The approach of this work is to modify the surface of such electrodes in order to obtain a pro active surface. In order to fulfil this objective the new surface must be able to overcome several challenges: induce the adhesion of neurons, prevent the activation of astrocytes, inhibit infections associated to the implantation of biomaterials and induce the formation of a vascular network. The novelty of this work relies in the development of a nanocomposite coating with a functional gradient, based on ceramic and polymeric materials doped with silver.

The work developed in this study is the initial stage of this vast work, where the objective is to achieve the best surface modification for such implants. Thus, several ceramic and polymeric thin films doped with silver were deposited in order to assess the influence of each type of material within the final composite coating. Thin films of silica (SiO_2), of polypropylene (PP) and of silica/PP with silver contents of 0-13%at., 0-33%at and 0-8%at, respectively, were deposited and characterised.

Structural analysis, by X-ray diffraction, highlighted that all the non-doped thin films do not present structural order, while the coatings with silver present diffraction planes of this metallic element, suggesting a composite structure of silver crystal within a matrix of the non-metallic materials.

The study of the interaction of the new surfaces with physiological environments, essentially characterised as water based solutions or suspensions, was evaluated by water static and dynamic contact angles. It allowed observing the heterogeneous distribution of silver on the surface of the thin films with increased silver content. The study of contact angles hysteresis confirmed the presence of functional chemical groups on the modified surfaces.

In vivo tests were performed by immersion of the new surfaces in simulated cerebrospinal fluid in dynamic conditions. This characterisation highlighted the excellent adhesion of the coatings to the substrate, although no major morphological changes, due to the release of silver, were observed after immersion.

Índice

Lista de Abreviaturas.....	iii
Lista de Símbolos.....	iv
Lista de Tabelas.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Introdução.....	1
Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica.....	2
1.1 – Enquadramento histórico.....	2
1.2 – Sistema nervoso central e formação da cicatriz glial.....	3
1.2.1 – Cicatriz glial devido a lesão.....	3
1.2.2 – Troca de informações com o Sistema Nervoso.....	6
1.2.3 – Exemplos de dispositivos neurais.....	7
1.3 – Modificação da superfícies de implantes neuronais.....	12
1.3.1 – Técnicas para a modificação de superfícies.....	14
a) Pulverização catódica.....	15
Capítulo 2 – Materiais e Métodos.....	25
2.1 – Deposição de filmes finos.....	25
2.1.1 – Procedimentos.....	25
a) Preparação das amostras.....	25
2.2 – Técnicas experimentais de caracterização.....	26
2.2.1 – Microsonda electrónica.....	26
2.2.2 – Microscopia electrónica de varrimento.....	27
2.2.3 – Difracção de raios-X.....	30
2.2.4 – Ângulos de contacto e molhabilidade.....	32
2.3 – Preparação da solução de fluido cefalorraquidiano.....	34

Capítulo 3 – Resultados e Discussão.....	35
3.1 – Composição química.....	35
3.2 – Morfologia (após deposição).....	37
3.3 – Estrutura.....	41
3.4 – Molhabilidade.....	43
3.4.1 – Histerese dos ângulos de contacto.....	45
3.5 – Caracterização após testes de imersão.....	48
3.6 – Testes preliminares em cultura celular.....	51
Conclusões.....	53
Referências Bibliográficas.....	54

Lista de Abreviaturas

NeuroMEMS	NeuroMicroElectroMechanical Systems
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
MMP	Matrix Metalloproteinases
MEC	Matriz Extracelular
SMMs	Silicon Micromachined Microprobes
ECG	Electrocardiograma

Lista de Símbolos

n	Número inteiro
λ	Comprimento da radiação incidente
d	Distância entre planos num cristal
θ	Ângulo da radiação incidente

Lista de Tabelas

Tabela I - Condições utilizadas nas deposições dos filmes finos.....	26
Tabela II – Técnicas utilizadas na caracterização dos filmes produzidos por pulverização catódica	26
Tabela III - Condições de calibração e análise da microsonda.....	27
Tabela IV - Parâmetros de aquisição utilizados no difractómetro.....	31
Tabela V - Composição química dos filmes finos de sílica e sílica/prata.....	35
Tabela VI: Designações e teor em prata dos filmes finos depositados	44
Tabela VII – Valores dos ângulos de contacto dinâmicos e da histerese dos filmes finos.....	45

Lista de Figuras

Figura 1 - Componentes do neurónio.....	3
Figura 2 - Representação esquemática das células gliais.....	4
Figura 3 - Evolução do encapsulamento glial num microeléctrodo intracortical.....	5
Figura 4 – Exemplos de dispositivos neuronais.....	7
Figura 5 - Exemplo de microagulhas à esquerda; no centro e à direita a matriz de Michigan.	9
Figura 6 - Matriz de eléctrodos de Utah.....	10
Figura 7 - Sonda tridimensional flexível após a dobragem. As pontas de gravação apresentam-se verticalmente alinhadas.....	11
Figura 8 - Imagens de microscopia óptica da sonda neuronal de poliimida. a) Vista do eléctrodo. b) Vista superior das três hastes.....	12
Figura 9 – Esquema dos processos elementares envolvidos na decomposição do material a depositar.....	16
Figura 10 - Processo de nucleação e crescimento de um filme.....	17
Figura 11 – Esquema do processo de pulverização catódica com fonte díodo.....	18
Figura 12 – Esquema de um sistema de pulverização com configuração tipo tríodo.....	19
Figura 13 - Esquema dos processos de pulverização com magnetirão convencional, magnetirão não balanceado e magnetirão convencional campo fechado.....	21
Figura 14 - Formas das curvas de voltagem dos modos de pulverização pulsada em modo unipolar ou bipolar.....	22
Figura 15 - Equipamento de pulverização catódica - Edwards Coating System E306A.....	23
Figura 16 - Microsonda electrónica (Cameca, modelo camebax SX50).....	27
Figura 17 - Esquema de funcionamento de um microscópio electrónico de varrimento.....	28
Figura 18 - Representação dos sinais resultantes da interacção do feixe primário de electrões com a amostra.....	29
Figura 19 - Microscópio electrónico de varrimento.....	29
Figura 20 - Representação do funcionamento de um difractómetro de raios-X.....	30
Figura 21 - Difractómetro de raios-X Philips modelo X’Pert.....	31
Figura 22 - Molhabilidade avaliada pela medição do ângulo de contacto do líquido com a superfície sólida.....	32

Figura 23 – Relação entre o ângulo de contacto e a molhabilidade.....	32
Figura 24 - Representação das tensões superficiais no contacto entre as três fases.....	33
Figura 25 - Goniómetro Krüss GmbH, modelo G-23.....	33
Figura 26 – Micrografias das amostras de sílica após a deposição.....	34
Figura 27 – Micrografias da superfície dos filmes finos de polímero, com e sem prata.....	39
Figura 28 – Micrografia superficial dos filmes finos do sistema cerâmico/polímero.....	40
Figura 29 – Difractogramas das amostras de polímero.....	42
Figura 30 - Valor médio dos ângulos de contacto estático e respectivo erro associado das superfícies dos filmes finos de sílica com água.....	43
Figura 31 – Valor médio dos ângulos de contacto estático e respectivo erro associado das superfícies dos filmes finos de polímero com água.....	43
Figura 32 - Valor médio dos ângulos de contacto estático e respectivo erro associado das superfícies dos filmes finos de compósito com água.....	45
Figura 33 - Gráfico obtido através do ensaio de molhabilidade para S ₁₁	46
Figura 34 - Morfologia superficial dos filmes finos de sílica após imersão no líquido cefalorraquidiano artificial.....	48
Figura 35 - Morfologia superficial dos filmes finos de polímero após imersão no líquido cefalorraquidiano artificial.....	49
Figura 36 - Morfologia superficial dos filmes finos de compósito após imersão no líquido cefalorraquidiano artificial.....	50
Figura 37 – Crescimento de células do sistema nervoso <i>in vitro</i> em caixa “ <i>multiwell</i> ”.....	51
Figura 38 – Crescimento de células do sistema nervoso a) sobre amostra de silício micromaquinado polido e b) sobre uma amostra de silício micromaquinado com alguma microtopografia.	52

Introdução

Na área das neurociências o uso de implantes é de uma importância vital. A sua inserção em diferentes áreas do cérebro para registar e/ou estimular locais específicos tem sido determinante no diagnóstico e tentativa de cura de doenças tais como a epilepsia, o Alzheimer, o Parkinson, entre outras.

Estes implantes consistem em sistemas que formam a ligação entre o tecido biológico neuronal e dispositivos físicos e electrónicos. Por este motivo, e a fim de minimizar danos neurais e de incorporar características estruturais que facilitem a entrada e o movimento através do tecido neural, é importante que os implantes possuam um tamanho o mais reduzido possível. Assim, permitirão uma maior aproximação do eléctrodo aos neurónios-alvo melhorando a relação sinal-ruído da actividade registada bem como a regiões específicas a serem estimuladas. Esta condição obriga a técnicas de processamento semelhantes às utilizadas pela indústria informática para a produção de “chips”, o que está na origem do facto de o material eleito para estes dispositivos ser o silício.

Para além do tamanho reduzido é também importante que os implantes possuam a resistência mecânica adequada para superarem a compressão e as forças de tensão durante as fases de inserção e de retracção durante o processo de implantação. No entanto, a compatibilidade química e mecânica do silício com o tecido cerebral está longe de ser a melhor podendo provocar danos no sistema nervoso central e, eventualmente, conduzir à formação de uma cicatriz (*glial scar*) que tem origem na necrose do tecido à volta do implante tornando-o ineficaz. Por este motivo, modificar a superfície do silício torna-se um importante ponto de partida para o tornar mais compatível com as células neuronais, permitindo deste modo o registo/estímulo eficaz e eficiente da actividade cerebral.

No presente trabalho foi modificada a superfície de silício, com material cerâmico (SiO_2), polimérico (polipropileno) e de um compósito cerâmico/polímero, em que todos os sistemas foram estudados com e sem a adição de prata. A técnica de modificação de superfícies escolhida foi a pulverização catódica. A caracterização às superfícies modificadas incluiu a composição química, morfologia, estrutura e molhabilidade. Os testes *in vitro* consistiram na imersão num líquido semelhante ao fluido cefalorraquidiano tendo sido as amostras sujeitas a nova caracterização.

Este trabalho divide-se em três capítulos. No primeiro será efectuado uma revisão bibliográfica no que concerne a implantes neuronais e a modificação de superfícies; o segundo capítulo será dedicado às técnicas de produção e caracterização das superfícies modificadas; no último capítulo serão apresentados e discutidos os resultados. Finalmente serão apresentadas as conclusões e sugestões de como o trabalho futuro poderá ser desenvolvido.

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo será efectuado o enquadramento histórico dos implantes neuronais bem como a reacção do tecido ao eléctrodo implantado, normalmente designada como biocompatibilidade do implante. Serão também abordados os tipos de eléctrodos existentes e examinadas algumas das estratégias utilizadas para melhorar a biocompatibilidade destes dispositivos.

1.1 Enquadramento histórico

O primeiro registo da utilização da corrente eléctrica como abordagem para o tratamento de uma desordem neuronal (paralisia) data de 1757. Em 1939 Hodgkin e Huxley demonstraram pela primeira vez a gravação de potenciais de acção a partir do interior de uma fibra nervosa. Mais tarde, em 1952, este mesmo grupo descreveu analiticamente o mecanismo de excitação do nervo e a subsequente geração de potenciais de acção. Desde então os eléctrodos neuronais têm-se revelado uma ferramenta essencial quer para gravar sinais a partir de neurónios, quer para estimular regiões específicas do cérebro, ou ainda para compreender o seu funcionamento. A partir de 1950 os microeléctrodos metálicos com uma única agulha tornaram-se os mais comuns para gravar a actividade eléctrica em ambientes extracelulares. Estes eléctrodos consistem numa agulha metálica electricamente isolada com excepção da ponta de inserção que representa o local de gravação.

Mais tarde, em 1970, Wise e Angell aproveitaram o desenvolvimento na área dos filmes finos e das técnicas de microfabricação de circuitos integrados e apresentaram o primeiro trabalho com microsondas à base de silício para tecidos de interface neuronal. Estava então no auge o desenvolvimento na área dos sistemas microelectromecânicos neuronais (*NeuroMicroElectroMechanical Systems* - NeuroMEMS).

Mais recentemente, as microsondas poliméricas, devido ao seu processo simples de fabricação, flexibilidade e biocompatibilidade, têm vindo a receber maior atenção [1].

No entanto, é necessário ter sempre presente que, para aplicações clínicas os microeléctrodos implantados com funções de interface, de controlo e de comunicação por períodos de tempo da ordem das décadas devem ter um desempenho de elevada confiabilidade.

1.2 Sistema nervoso central e formação da cicatriz glial

1.2.1 Cicatriz glial devido a lesão

A resposta inevitável a qualquer implante é o processo de cicatrização, que engloba a hemostasia, a inflamação, a reparação e a remodelação. Em implantes de superfície pouco rugosa e não degradáveis, a reparação e a remodelação conduzem ao isolamento do implante através do encapsulamento do tecido. A natureza deste encapsulamento e o tipo de células envolvidas na reacção imunológica implicam que esta dependa do sítio da implantação e do tipo de tecido que hospeda o implante (bem como da habilidade do cirurgião).

Estudos recentes revelaram que os eléctrodos implantados podem monitorizar sinais do sistema nervoso central e, portanto, podem ser usados no controlo de próteses em pacientes com paralisia total ou parcial [2]. No entanto, os eléctrodos e sensores implantados acabam por falhar como resposta ao processo de cicatrização, que ocorre aquando a sua inserção no cérebro. A violação da barreira hematoencefálica desencadeia a hemostasia e as fases iniciais da inflamação no tecido do sistema nervoso central (SNC).

O tecido do sistema nervoso central distingue-se de outros tecidos pela presença de células que lhe são únicas - os neurónios (Fig.1). Estas consistem de um corpo celular e seu axónio e, embora representem menos de 5% da população total de células, representam a unidade funcional do tecido cerebral [2]. O corpo celular, parte que envolve o núcleo, representa o início do neurónio pois é onde começa a propagação do impulso, através das ramificações – dendrites. O axónio, fio condutor do neurónio, é por onde o impulso se propaga para chegar a outra célula. As porções finais do axónio, os telodendros ou terminais de axónios, são muito ramificadas e estabelecem a conexão com outros neurónios.

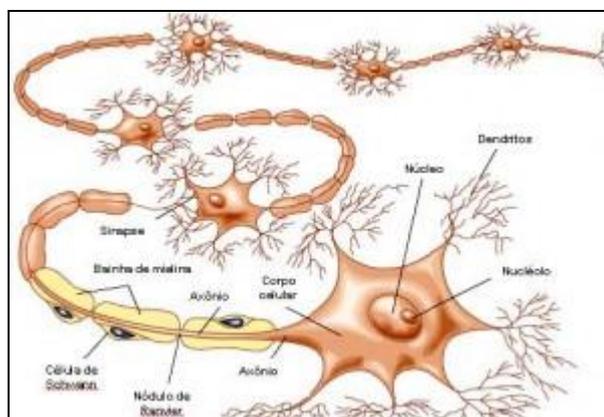


Figura 1 - Componentes do neurónio [3].

Mais numeroso é um segundo conjunto de células designadas por células gliais que têm como função a protecção e o apoio estrutural às células. Este conjunto, representado na figura 2, compreende três tipos distintos de células: oligodendrócitos, astrócitos e microglia. Os oligodendrócitos envolvem os axónios para garantir apoio e produzir uma bainha de mielina rica em lípidos para proteger os processos neurais; os astrócitos têm muitas funções de suporte neural, mas são também essenciais para formar a fronteira glial entre as estruturas do SNC e os outros tipos de células, criando a barreira hematoencefálica; a microglia partilha muitas características fenotípicas e funcionais com os macrófagos derivados do sangue, e existe em estado de repouso dentro do tecido cerebral; tal como os macrófagos ao ser activada induz a resposta imunológica própria do cérebro. Em contraste com o SNC, os axónios do sistema nervoso periférico (SNP) têm uma bainha de mielina contínua produzida pelas células de Schwann. A bainha de mielina contínua aumenta a velocidade de propagação do impulso nervoso, o que é importante para os axónios que se estendem por longas distâncias através do SNP.

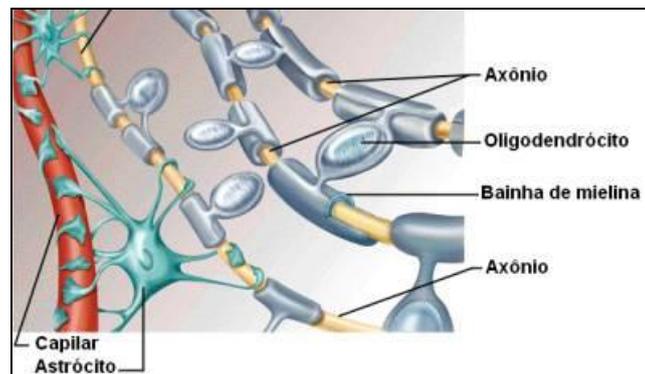


Figura 2 - Representação esquemática das células gliais [3].

No sistema nervoso central a reparação da cicatriz não é seguida pela regeneração neuronal. Ao contrário do que sucede no SNP, onde os axónios degenerados se podem regenerar, os axónios danificados do SNC podem iniciar regeneração, mas esta é impedida ao fim de um dia assim que ocorre o colapso dos cones de crescimento, estruturas sensoriais altamente móveis localizadas nas extremidades mais distais dos axónios e que captam e interpretam a informação que direcciona o crescimento dos mesmos [4].

A reparação do tecido do SNC começa horas após a lesão quando os astrócitos fora da zona da lesão são activados. Esta resposta glial, também denominada gliose, é composta por uma multicamada de astrócitos activados que formam uma barreira em volta do tecido lesionado. Os astrócitos alteram a expressão das suas integrinas (proteínas de adesão), migrando para a lesão ao mesmo tempo que segregam metaloproteinas da matriz** para a degradação da matriz extracelular. A expressão das metaloproteinas da matriz pelos astrócitos e pelos neurónios, uma a duas semanas após a lesão, pode também promover a reparação estimulando a produção de factores de crescimento endotelial vascular para dar início à angiogénese. Assim que os astrócitos chegam ao local da lesão cercam-na e

entrelaçam-se de forma a dar à barreira glial uma aparência altamente desordenada, formando a denominada cicatriz glial. A magnitude global da activação glial encontra-se intimamente correlacionada com a porção de rotura da barreira hematoencefálica e com os danos no tecido [2].

Devido à forte resposta inflamatória produzida pela microglia e pelos macrófagos, não existem geralmente neurofilamentos no local da ferida três dias após a lesão. A figura 3 representa o desenvolvimento do encapsulamento glial num eléctrodo intracortical [5].

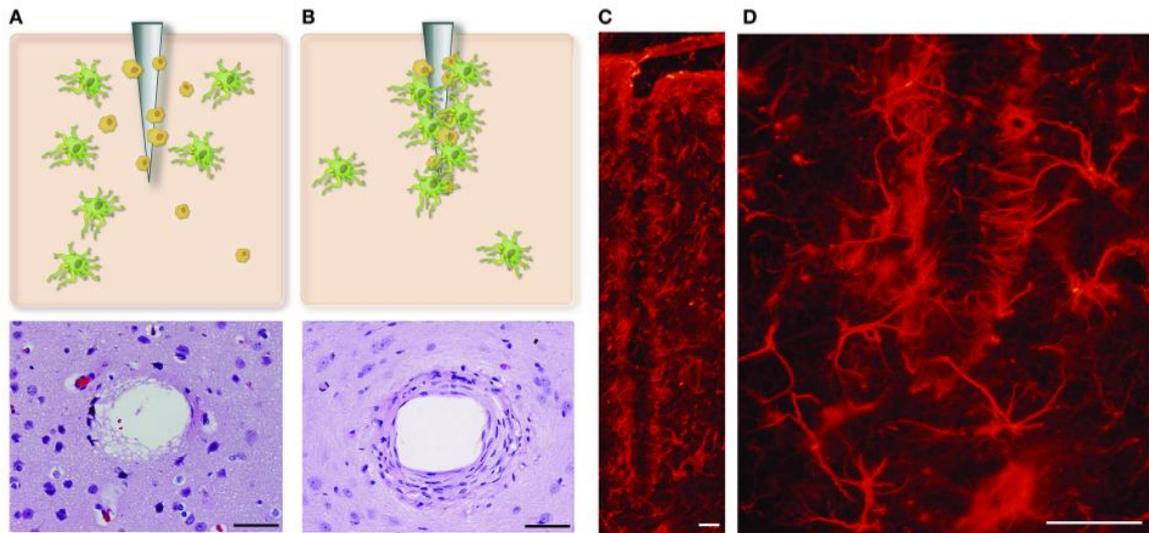


Figura 3 - Evolução do encapsulamento glial num microeléctrodo intracortical. (A) Lesão neuronal aguda causada pela inserção de um microeléctrodo no córtex cerebral. Astrócitos e microglia são activados e migram para o local da lesão. (B) Resposta crónica mostrando uma densa bainha em torno do eléctrodo implantado, a qual contém fibroblastos, macrófagos e astrócitos. (C, D) Os astrócitos reactivos, imunohistoquimicamente marcados para GFAP* (proteína glial fibrilar ácida) a encapsular a sonda neural formando uma densa bainha celular [5].

* A proteína glial fibrilar ácida (*Glial fibrillary acidic protein* - GFAP), subunidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular, está presente no citoplasma de astrócitos. Técnicas imunohistoquímicas com anticorpos primários anti-GFAP são geralmente empregadas para identificar astrócitos no sistema nervoso, permitindo verificar também sua hipertrofia [6].

** As metaloproteinases da matriz (*Matrix Metalloproteinases* - MMP) constituem uma família de enzimas proteolíticas que, colectivamente, são capazes de degradar a maioria das macromoléculas da matriz extracelular, incluindo o colagénio intersticial e o da membrana basal, fibronectina, laminina e proteoglicanas [7].

Sem viabilidade neuronal, o SNC perde a sua funcionalidade no local da lesão. Do ponto de vista estrutural, enquanto lesões menores no SNC podem ser preenchidas por astrócitos reactivos, a hipertrofia glial e a sua proliferação não conseguem compensar a perda de grandes quantidades de tecido. Essas lesões convertem-se em grandes cavidades com astrócitos reactivos a formar uma barreira densa em redor da lesão. Uma vez que a lesão não é preenchida com células nervosas ou com matriz extracelular, os cirurgiões são capazes de visualizar lesões cerebrais traumáticas anteriores durante um exame imagiológico, devido à falta de arquitectura do tecido. Nos casos em que a superfície externa das meninges do cérebro é penetrada, a lesão é preenchida com tecido fibroso, tais como os fibroblastos da meninge, que revestem o exterior do cérebro e são capazes de migrar para a lesão. Os fibroblastos da meninge, como os de reparação do tecido conjuntivo, são capazes de produzir colagénio (tipos I, III, IV) e proteínas da matriz extracelular (MEC) (laminina e fibronectina) para preencher o local da ferida. Outras células não gliais como as células endoteliais vasculares e as células mesenquimatosas encontram-se presentes na cicatriz glial. As células endoteliais tentam formar novos vasos sanguíneos, enquanto as células mesenquimatosas depositam lâmina basal, que inibe a regeneração dos axónios [2].

Assim, estudos recentes propõem que a cicatriz glial não protege apenas o tecido do SNC adjacente à lesão de mais danos, como impede também os neurónios de formarem conexões neuronais inapropriadas após a lesão.

A formação da cicatriz glial tem sido também associada à libertação de glutamato e à produção de citocinas anti-inflamatórias [2].

1.2.2 Troca de informações com o Sistema Nervoso

O potencial de acção constitui a unidade fundamental de comunicação dentro do sistema nervoso. Este é um sinal electroquímico mediado pelo fluxo de iões através da membrana dos neurónios individuais entre os espaços intra e extracelulares.

O fluxo iónico resulta dos gradientes de concentração e de potencial entre os espaços intra e extracelular e ocorre através de canais iónicos ou de proteínas transmembranares. O desencadear de potenciais de acção por estímulo eléctrico ou a transdução de potenciais de acção por gravação eléctrica estão na base das interfaces neurais. Uma célula ou fibra nervosa podem ser artificialmente simuladas recorrendo à despolarização da membrana da célula. O potencial de acção resultante propaga-se para o terminal do neurónio, conduzindo à libertação de neurotransmissores que podem causar impacto na célula pós-sináptica. A passagem de corrente através de eléctrodos extracelulares próximos de neurónios cria potenciais extracelulares no tecido, bem como a distribuição potencial pode resultar na despolarização e desencadear um potencial de acção. Como alternativa, os potenciais extracelulares podem modular ou bloquear o disparo neuronal em curso, dependendo da

magnitude, distribuição e polaridade dos potenciais. Desencadear ou modular potenciais de acção com as correntes eléctricas são a base das próteses neurais que utilizam a estimulação eléctrica para o restauro da função cerebral [2].

Por outro lado, o fluxo de corrente iónica dá origem a potenciais dentro do tecido que podem ser gravados para extrair informações do sistema nervoso. É possível registar a actividade de neurónios individuais, a actividade de várias unidades de neurónios activos, ou o, denominado potencial de campo, resultante da actividade de grandes populações de neurónios. O registo dos potenciais eléctricos gerados por potenciais de acção individuais ou de agregados de potenciais de acção é a base para o controlo de sinais directamente do sistema nervoso para uso no controlo de dispositivos externos [2].

1.2.3 Exemplos de dispositivos neurais

A interface neural para a estimulação ou a gravação do sistema nervoso central inclui, normalmente, um eléctrodo ou uma matriz de eléctrodos implantados, um cabo e, em muitos casos, um circuito electrónico. Exemplos da aplicação da estimulação do sistema nervoso central no tratamento de distúrbios neurológicos incluem o tratamento da dor, o tratamento do tremor e sintomas do sistema motor da doença de Parkinson, como um tratamento experimental para a epilepsia, bem como uma série de outros distúrbios neurológicos. Além disso, a estimulação do sistema nervoso central tem vindo a ser desenvolvida para a restauração da audição através da estimulação eléctrica do núcleo coclear e para a restauração da visão. Exemplos da gama de eléctrodos usados para a estimulação (e gravação) do SNC são mostrados na figura 4 [2].

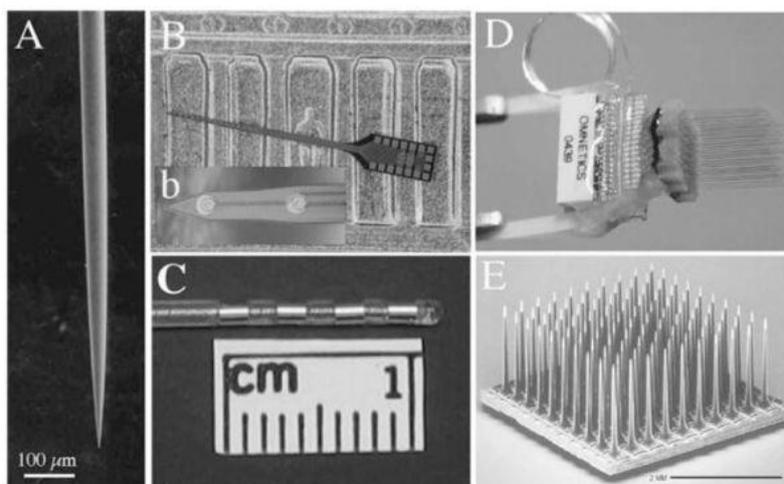


Figura 4 – Exemplos de dispositivos neuronais. (A) Microagulha de irídio desenvolvido pelo *Huntington Medical Research Institute* que pode ser usado para a gravação extracelular de unidades individuais ou para a microestimulação extracelular de pequenas populações de neurónios. (B) Microsonda multieletródica de silício desenvolvido na Universidade de Michigan e vista em maior ampliação em (b) de dois locais de eléctrodo próximo da ponta (C) Eléctrodo quadrapolar usado para a estimulação cerebral profunda (Medtronic Inc., Minneapolis, Minnesota). (D) Matrizes de 128 microfios que permitem a gravação extracelular em simultâneo de múltiplos

neurónios individuais. Cada fio é de aço inoxidável com 50 mm de diâmetro, isolados com Teflon. (E) Matriz de multieléctrodos de silício, desenvolvido na Universidade de Utah [2].

A actividade neuronal é gravada como um potencial extracelular, ou potencial de acção, quando o sinal gravado identifica o disparo de um único neurónio. Os potenciais de acção são gravados com microeléctrodos implantados na proximidade dos neurónios-alvo, e, para o registo de um único neurónio, a superfície geométrica do microeléctrodo não deve ser superior a $2000\text{-}4000\mu\text{m}^2$, sendo tipicamente muito inferior. Estes registos, sobretudo a partir de grandes conjuntos de neurónios, são a base das próteses que podem fornecer o controlo cognitivo dos dispositivos próstéticos externos em pacientes com paralisia. Outras aplicações das gravações neuronais com multieléctrodos, nas quais os sinais neuronais gravados determinam o 'output' dos eléctrodos de estimulação implantados, são também contempladas e incluem estimulação profunda do cérebro e estimulação funcional para o tratamento da epilepsia [8].

No que respeita aos tipos de eléctrodos utilizados para gravação, as matrizes de microeléctrodos com múltiplos canais têm vindo a ser desenvolvidos para gravação neuronal cortical a longo prazo. Entre os principais tipos destacam-se as microagulhas, as microsondas de silício micromaquinadas (*Silicon Micromachined Microprobes* - SMMs) e as sondas de substrato polimérico. Devido ao seu fácil processamento e fabrico, as microagulhas e as SMMs são o tipo de dispositivos que têm recebido maior atenção [9].

As microagulhas foram o primeiro tipo de eléctrodo para registo de doenças crónicas. Estes eléctrodos consistem em agulhas com $20\text{-}50\mu\text{m}$ de diâmetro, feitas de metais condutores como a platina, ouro, tungsténio, irídio e aço inoxidável e são isoladas com Teflon ou com poliimida. As pontas das agulhas não são isoladas e são as responsáveis pela gravação dos sinais neuronais. Organizando as agulhas numa matriz, soldando-as a um pequeno conector é possível alcançar um maior número de neurónios, melhorando o controlo neuroprostético.

Apesar de serem mais fáceis de fabricar e de terem baixa impedância, comparativamente com as SMMs, as microagulhas tendem a perder o sinal para gravações de longa duração (semanas). Uma das causas desta falha é o aumento da impedância dos eléctrodos ao longo do tempo devido à reacção do tecido. A impedância é proporcional, tanto ao ruído térmico como à perda de sinal e, conseqüentemente, melhora o transporte do sinal ao longo de toda a interface neural e aumenta a sensibilidade à actividade neuronal. Uma impedância baixa deveria permitir a estabilidade de registos a longo prazo; no entanto, o número de eléctrodos funcionais diminui com o tempo, uma vez que a impedância do eléctrodo está correlacionada com a reactividade do tecido que envolve o dispositivo implantado [9].

Os eléctrodos de microagulhas registam a partir das pontas das agulhas e as matrizes são coladas ao crânio de modo a que a profundidade das pontas do eléctrodo em relação ao crânio seja fixa. No caso da superfície cortical se mover após a cirurgia a ponta do eléctrodo pode mover-se para uma outra camada cortical ou para a matéria branca e deixar

de gravar sinais de interesse. Os resultados mostram que, neste tipo de eléctrodos, neurónios individuais não podem ser “seguidos” períodos superiores a, aproximadamente, seis semanas. No caso das SMMs o processamento fotolitográfico do silício fornece um controlo incomparável sobre o tamanho do eléctrodo, a forma, textura e espaçamento, e permite que sejam colocados vários locais de gravação numa única haste do eléctrodo. De entre este tipo de eléctrodos podem ser destacados dois: os designados por matriz de Michigan e matriz de Utah [9]. O primeiro consiste numa matriz implantada verticalmente e foi desenvolvida pelo Centro Tecnológico para Comunicação Neuronal da Universidade de Michigan.

As matrizes de Michigan têm várias vantagens sobre as microagulhas, incluindo o processo de fabricação, a elevada reprodutibilidade das características geométricas e eléctricas, localização relativa do eléctrodo precisa e reprodutível, locais de registo de elevada densidade e a capacidade de integrar os circuitos directamente nas sondas. As hastes das sondas de Michigan têm 15mm de espessura, 100-500mm de largura e um comprimento de 3mm a 1cm. Em comparação com as matrizes de microagulhas, as sondas de Michigan permitem um melhor acesso aos neurónios de interesse. Na figura 5 estão ilustrados os dois tipos de dispositivos. Uma vez que muitos dos locais de registo se encontram colocados de cima para baixo ao longo da sonda plana, pelo menos alguns dos locais ficam situados a profundidades corticais ideais para a gravação extracelular. No entanto, o encapsulamento do tecido cicatricial, que aumenta a impedância do eléctrodo e que isola os neurónios deste, é uma grande desvantagem para as sondas de Michigan uma vez que os seus eléctrodos apresentam elevada impedância. Acresce o facto de a configuração planar destas sondas as tornar frágeis, aumentando a dificuldade na sua manipulação bem como na sua modificação pós-processamento [9].

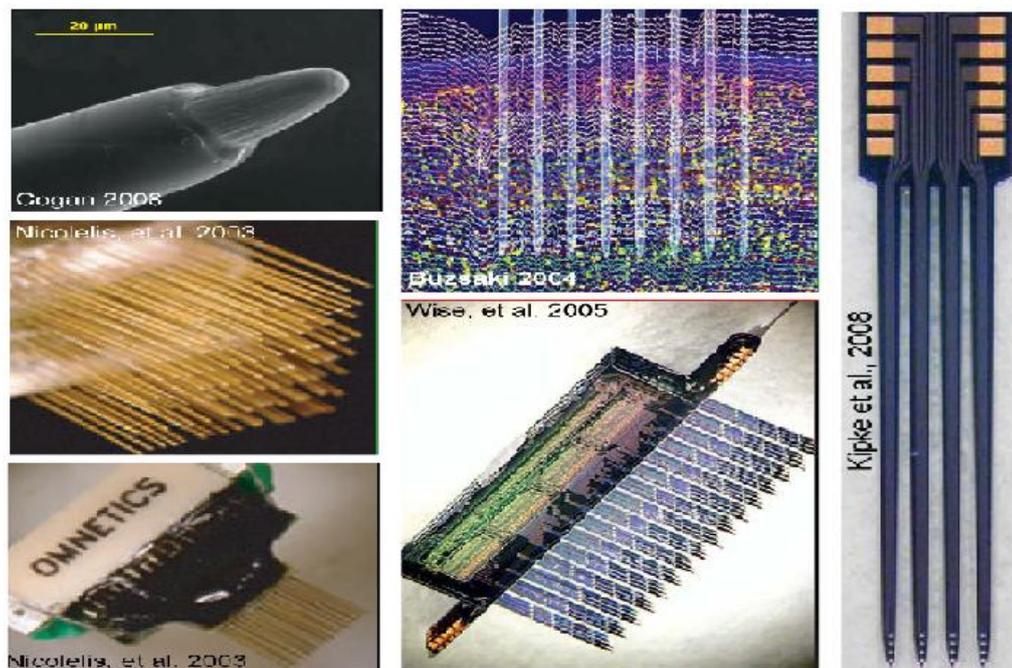


Figura 5 - Exemplo de microagulhas à esquerda; no centro e à direita a matriz de Michigan [10].

Para além da matriz de Michigan, também a matriz de eléctrodo de Utah (Utah Electrode Array, UEA), (Fig.6), desenvolvida por Norman e pelos seus colaboradores [9], recebeu especial atenção. É fabricada a partir de um único bloco de silício que após decapagem, dopagem e tratamento térmico dá origem a uma matriz tridimensional de 5x5 ou 10x10 agulhas com $4 \times 4 \text{mm}^2$, com um local de gravação na ponta de cada agulha ou haste. Esta matriz tem a vantagem de colocar um grande número de locais de registo num pequeno volume do córtex. Contudo, com um único local de gravação a uma profundidade cortical fixa, estas SMMs sofrem do mesmo problema de posicionamento das microagulhas, conduzindo à eventual falha do registo. Este inconveniente comum nos eléctrodos de microagulhas e no de Utah reduzem a sua utilização em implantes crónicos. As vantagens da sonda de Michigan sobre estes dois tipos de matrizes de eléctrodos residem no melhor acesso aos neurónios e na flexibilidade da sua estrutura. Estas vantagens são, no entanto, contrabalançadas pelo problema do encapsulamento do tecido cicatricial, que aumenta a impedância do eléctrodo. Em consequência estas sondas são capazes de gravar os potenciais de acção na primeira das três semanas após a colocação ocorrendo em seguida a degradação do sinal [9].

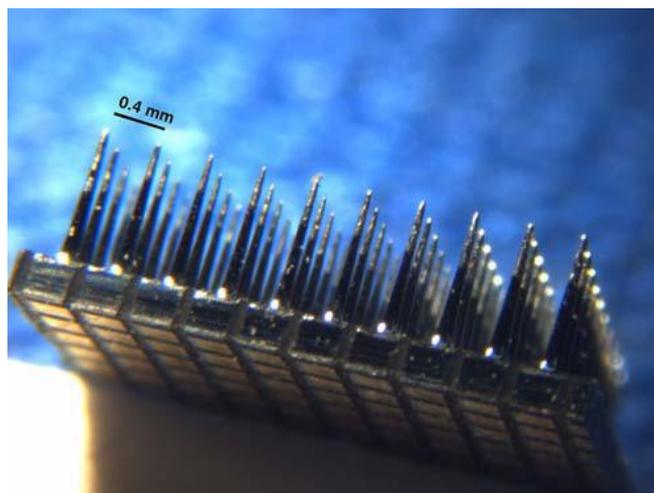


Figura 6 - Matriz de eléctrodos de Utah [11].

A utilização de materiais poliméricos em implantes neuronais tem sido amplamente estudada a fim de substituir o nitreto de silício comum ou a camada isolante de dióxido de silício (sílica) depositada durante a fabricação dos eléctrodos de silício. Polímeros biocompatíveis como a poliimida e o Parileno C são usados para revestir a região metálica e de silício das sondas para formar uma interface biocompatível entre a sonda e o tecido cerebral. A título de exemplo, a poliimida foi anteriormente utilizada no revestimento das matrizes de eléctrodo de Utah. O Parileno C, por sua vez, foi utilizado como camada isolante nas sondas de silício [1].

Mais recentemente, os polímeros têm sido usados nas sondas metálicas em que cada sonda inclui um único local de registo aberto com um sistema com um duplo feixe de laser de excímeros. Os materiais poliméricos têm sido também utilizados em cabos de interligação, como por exemplo, cabos de poliimida e de polidimetilsiloxano. Contudo, os métodos de ligação convencionais são ainda necessários para ligar os cabos de polímero às sondas de silício micromaquinadas [1].

Uma sonda neuronal flexível de poliimida foi apresentada por Rousche et al [1] na qual uma camada de ouro era usada nos locais de gravação. As interconexões encontram-se impressas entre as duas camadas de poliimida. Dispositivos semelhantes foram também já relatados por Shoji Takeuchi et al [1], como mostra a figura 7.

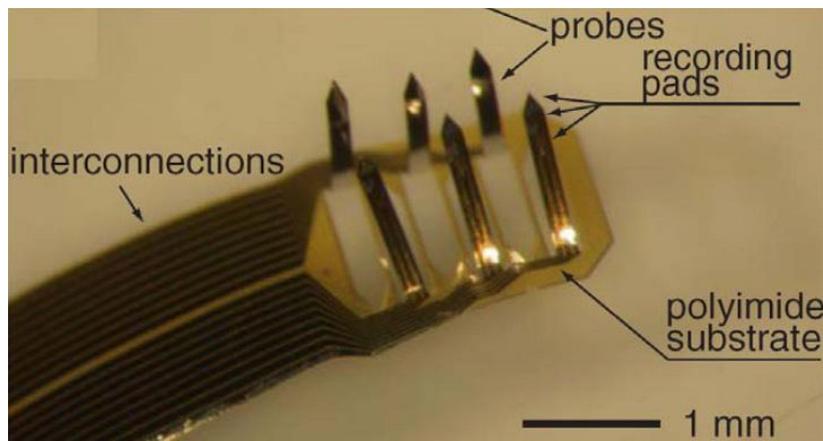


Figura 7 - Sonda tridimensional flexível após a dobragem. As pontas de gravação apresentam-se verticalmente alinhadas [1].

As sondas tridimensionais podem ser formadas ao dobrar a poliimida para fora do plano bidimensional. O uso deste polímero melhora a relação de maleabilidade entre um eléctrodo rígido e o tecido mole na ausência da qual resulta no dano do tecido caso o eléctrodo se mova relativamente ao cérebro. Neste tipo de sonda a maior desvantagem reside no facto de os eléctrodos não apresentarem uma rigidez suficiente para perfurar por si só o tecido cerebral, pelo que o local do implante tem de ser criado com um fio metálico ou com um bisturi antes da inserção. Na figura 8 mostra-se o aperfeiçoamento desta sonda criado por Lee et al [1], na qual uma fina camada de silício com 5-10 μm de espessura é unida a uma região específica do eixo da sonda para aumentar a rigidez que pode ser variada alterando a espessura da camada de silício. Blum et al [1] desenvolveram também uma sonda semelhante de poliimida com 15 μm de molibdénio.

Em suma, os eléctrodos de poliimida têm algumas desvantagens devido à falta de propriedades mecânicas apropriadas que induzem a sua deformação durante a inserção no cérebro. Por esta razão, as sondas de poliimida compridas não podem ser utilizadas. Para além disso, as sondas à base de polímero são propensas a falhar devido ao inchaço provocado pela absorção de humidade. Por estes motivos, as sondas neuronais à base de

silício parecem ser as mais bem sucedidas devido às propriedades mecânicas do silício e também à flexibilidade das tecnologias de microfabricação [1].

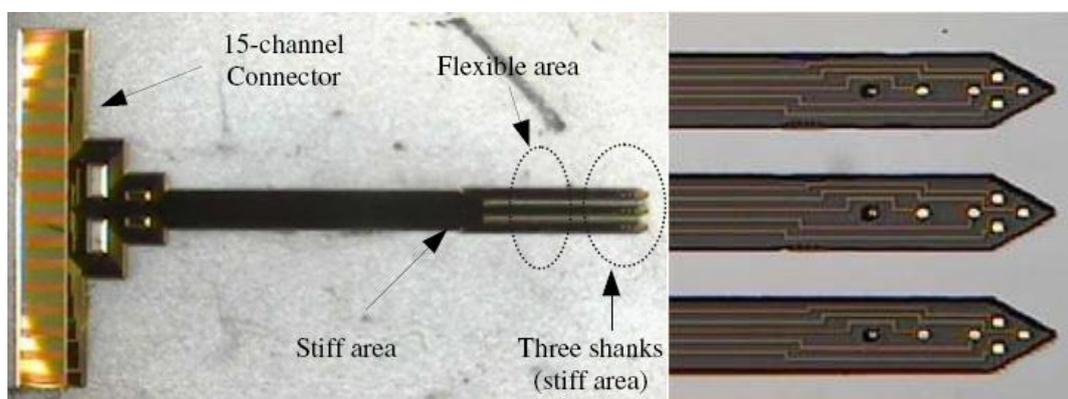


Figura 8 - Imagens de microscopia óptica da sonda neuronal de poliimida. a) Vista do eléctrodo. b) Vista superior das três hastes [1].

1.3 Modificação da superfície de implantes neuronais

Entender a natureza e os mecanismos da resposta do tecido ao implante, permanência, e em caso de estimulação, a activação dos eléctrodos no SNC é fundamental. Embora este tipo de dispositivos se tenha tornado cada vez mais comum e também cada vez mais pequeno, a falha na compreensão dos mecanismos de lesão neuronal é também notória. A análise de tecido postmortem, tanto humano como animal, revela a perda de neurónios em torno dos eléctrodos implantados, bem como uma elevada densidade de astrócitos, microglia e de vascularização. Esta perda de material à volta do eléctrodo pode afectar as funções do dispositivo neural, especialmente dispositivos desenvolvidos como as matrizes de eléctrodos que usam a microestimulação ou o registo unicelular de um pequeno número de neurónios [2].

Assim, com o intuito de reduzir a impedância inicial dos eléctrodos bem como as respostas de rejeição precoces e tardias que acontecem próximas da interface eléctrodo-tecido algumas abordagens têm vindo a ser seguidas. Entre estas abordagens podemos considerar essencialmente dois tipos: as que actuam sobre a concepção e inserção do eléctrodo e as que tentam aumentar a biocompatibilidade superficial dos mesmos. De entre a abordagem do primeiro tipo é de salientar as que incidem sobre a optimização do tamanho, da forma, da geometria e do tipo de material a utilizar, bem como sobre os procedimentos cirúrgicos de inserção de próteses neuronais. No segundo tipo de abordagem a que é dado mais ênfase e que pode ser a que engloba o objectivo deste

trabalho, são consideradas as técnicas para modificar a superfície dos eléctrodos. Estas incluem apenas a modificação da química e da topografia superficial bem como a deposição de óxidos, metais, polímeros hidrófilos, heparina ou agentes antibacterianos [12].

Apesar da modificação de superfícies com revestimentos poliméricos hidrófilos ter vindo a ser utilizada para reduzir a adesão bacteriana, estudos demonstram que este revestimento parece não reduzir a sua colonização.

Quanto aos resultados sobre os efeitos das superfícies heparinizadas na adesão bacteriana ou celular estes têm se revelado contraditórios ou inconclusivos. O revestimento da superfície do eléctrodo com agentes antibacterianos por um período de tempo prolongado não tem sido bem sucedido, possivelmente devido à inactivação ou à difusão dos mesmos [9].

No presente trabalho e com base em estudos anteriores, usamos como agente antibacteriano a prata. Os efeitos antimicrobianos da prata são já conhecidos há centenas de anos. Em 1800 era utilizada pelos médicos para tratar as feridas e na Primeira Guerra Mundial para combater as infecções nas feridas das tropas. Nos dias de hoje a prata continua a ser utilizada como agente antibacteriano e antifúngico para prevenir e tratar infecções em zonas de pele queimada (sulfadiazina de prata), ou ainda sob a forma de cloreto de prata para eliminar ou expulsar o mercúrio do corpo, sendo também utilizado sob forma de uma fina camada sobre a superfície dos eléctrodos das máquinas de electrocardiograma - ECG [13].

Em relação à toxicidade, embora a prata faça parte do grupo dos metais pesados, é muito mais bem tolerada pelo corpo humano do que a maioria dos metais pesados. O nível de concentração da prata para que seja eficaz contra as bactérias e que não seja prejudicial para o organismo humano é muito importante. Estudos feitos em tecnologias médicas revestidas por prata relatam que concentrações superiores a 10 mg/L podem tornar-se tóxicas para determinadas células humanas. Outros estudos apontam como limite máximo 18 mg/L para AgNO_3 .

Actualmente, o método para se obterem revestimentos de prata antimicrobianos consiste na utilização de nanopartículas de prata no revestimento. A actividade antibacteriana da prata, no entanto, tem sido atribuída à sua forma oxidada, Ag^+ , uma forma de prata que não se encontra necessariamente presente numa superfície revestida com prata metálica. No que diz respeito à formação do biofilme de revestimento, as características da superfície do material constitui um factor determinante, uma vez que as suas propriedades químicas influenciam a adesão e proliferação bacteriana. Grupos funcionais diferentes determinam a carga superficial e a hidrofobicidade que afectam o comportamento das bactérias contra a superfície. Por outro lado, é de salientar também o papel fundamental da rugosidade no processo de formação do biofilme, sendo que irregularidades numa superfície lisa aumentam a adesão bacteriana.

1.3.1 Técnicas para a modificação de superfícies

As técnicas de deposição dividem-se sobretudo em Deposição Química em Estado de Vapor (*Chemical Vapour Deposition* - CVD) e Deposição Física em Fase de Vapor (*Physical Vapour Deposition* - PVD). Os processos CVD consistem, basicamente, na introdução de reagentes gasosos no interior de um reactor (câmara de deposição). Os reagentes levam a ocorrência de reacções químicas na superfície do material a ser revestido. Este processo conduz ao “crescimento” do revestimento na superfície do substrato.

A Deposição Física em Fase de Vapor (PVD) consiste num grupo de técnicas de deposição, as quais tem em comum o facto de permitirem o transporte material no estado sólido entre o material do alvo e o substrato a ser revestido. O processo decorre numa câmara com atmosfera rarefeita [14]. Entre as principais técnicas PVD destacam-se a evaporação e a pulverização catódica (“*sputtering*”), cuja finalidade reside na transferência controlada de átomos de um alvo para um substrato onde ocorre, a nível atómico, a formação e crescimento de um filme [15].

Por evaporação o material é aquecido até alcançar a fase de vapor, e posteriormente, a condensação, ou seja, os átomos são removidos do alvo termicamente. Algumas das técnicas de revestimento por evaporação são a evaporação por efeito de Joule, a evaporação por feixe de electrões, a evaporação por arco eléctrico e a evaporação por ablação laser [14].

No caso da pulverização catódica o material do alvo é bombardeado com partículas energéticas, mais propriamente, iões gasosos. Após a ejeção dos átomos do alvo por processos físicos de transporte de momento linear estes depositam-se formando o revestimento.

Dentro do processo de pulverização destaca-se a pulverização catódica, a pulverização com magnetron, a pulverização por rádio-frequência e a pulverização com fonte pulsada, entre outros. Até 1960 a evaporação era preferida em relação à pulverização catódica, uma vez que as taxas de deposição mais elevadas e a utilização de sistemas de vácuo mais eficazes, impunham um ambiente mais limpo durante a formação dos revestimentos, permitindo assim a utilização dos filmes produzidos em, praticamente, todas as áreas necessárias. No entanto, a necessidade da utilização de ligas na produção de filmes para aplicação na indústria da microelectrónica, impunha limites estequiométricos muito restritos implicando que os revestimentos fossem depositados com óptima adesão sobre vários tipos de substratos. Estas exigências, conjuntamente com a introdução de rádio-frequência, polarização e variantes de magnetron, bem como a maior disponibilidade de alvos e gases de descarga puros, ajudaram a promover a pulverização catódica.

Quer na evaporação, quer na pulverização catódica, a deposição dos revestimentos compreende basicamente três etapas: passagem do material a depositar para o estado

gasoso; transporte do vapor entre o alvo e o substrato; e, condensação do vapor na superfície do substrato com a formação de um filme. Especialmente a primeira e a última etapa podem ser independentemente controladas permitindo um maior grau de flexibilidade na estrutura, nas propriedades e na velocidade de deposição.

Tendo em consideração que o processo de pulverização catódica, utilizado neste trabalho, apesar de utilizado há mais de 20 anos no grupo de investigação onde este trabalho foi desenvolvido, é ainda pouco conhecido na área da engenharia biomédica, ele será abordado de forma relativamente pormenorizada em seguida.

a) Pulverização catódica

1. *Passagem do material a depositar para o estado gasoso*

A ejeção do material é provocada pelo bombardeamento de um feixe de partículas emitindo diferentes tipos de radiação (raios-X, electrões secundários, electrões Auger, etc). Caso as partículas incidentes possuam energia e massa suficientes podem provocar a ejeção de átomos ou grupos de átomos por simples troca da quantidade de movimento. Esta ejeção pode verificar-se no local de impacto da partícula incidente ou a alguma distância do ponto de choque, no caso de a partícula causar apenas um deslocamento da posição de equilíbrio e assim originar uma colisão em cadeia. Na figura 9 está esquematizado o processo desta primeira etapa [15].

Nesta fase inicial, o rendimento da pulverização, ou seja, o número de átomos ejectados por cada partícula incidente, revela-se uma característica essencial, e que depende de factores como a natureza e a energia associada às partículas incidentes, a direcção do feixe incidente e de factores relacionados com a estrutura e composição do alvo – energia superficial do material do alvo e energia de deslocação da posição de equilíbrio dos átomos do alvo.

Assim, devido às diferenças de energia envolvidas neste processo, apenas os átomos mais próximos da superfície, isto é, aqueles que adquirem uma energia superior à energia potencial da superfície, sofrem ejeção.

Torna-se então clara a necessidade de animar as partículas incidentes com energia suficiente para induzir a ejeção. Para tal, iões de um gás raro são submetidos à acção de um campo eléctrico. A utilização de gases raros revela-se vantajosa uma vez que estes não reagem com o material do alvo. O gás inerte recorrente é o argon, pois possui grande compatibilidade de massa relativamente aos materiais empregues nos revestimentos (Ti, Zr, Si, Al, etc), permitindo otimizar o rendimento de pulverização [16], e é ainda facilmente encontrado no mercado a um preço acessível [15].

taxas de deposição sobre o substrato são afectadas pela deposição nas paredes da câmara. Para ultrapassar este problema sem encontrar obstáculos relativos ao aumento de pressão dentro da câmara, o cátodo dos sistemas díodo é dotado com um sistema magnetrão. Assim, estabelece-se um campo magnético que, simultaneamente com o campo eléctrico, limita as trajectórias dos electrões secundários emitidos pelo alvo.

Desta forma, o percurso dos electrões secundários no espaço inter-eléctrodos é aumentado consideravelmente, conferindo um maior número de colisões a cada electrão. Na prática, o uso do magnetrão confere pressões mais baixas de deposição e aumenta as taxas de ejeção, o que leva a uma pulverização com maiores taxas de deposição [15].

3. Condensação do vapor na superfície do substrato com formação de um filme

Quando alcançam a superfície do substrato, os átomos ejectados do alvo transferem a sua energia cinética para a superfície do substrato ou do filme em crescimento, convertendo-se em adátomos, ou ainda, átomos não ligados, que se movimentam na superfície de chegada. Os adátomos difundem-se ao longo da superfície podendo ser desadsorvidos, bem como ficarem acomodados num local de baixa energia da rede do substrato, ou podem ainda ligar-se a um átomo já adsorvido. Utilizando processos de difusão os átomos podem reajustar as suas posições após serem incorporados, como se pode visualizar na figura 10 [15].

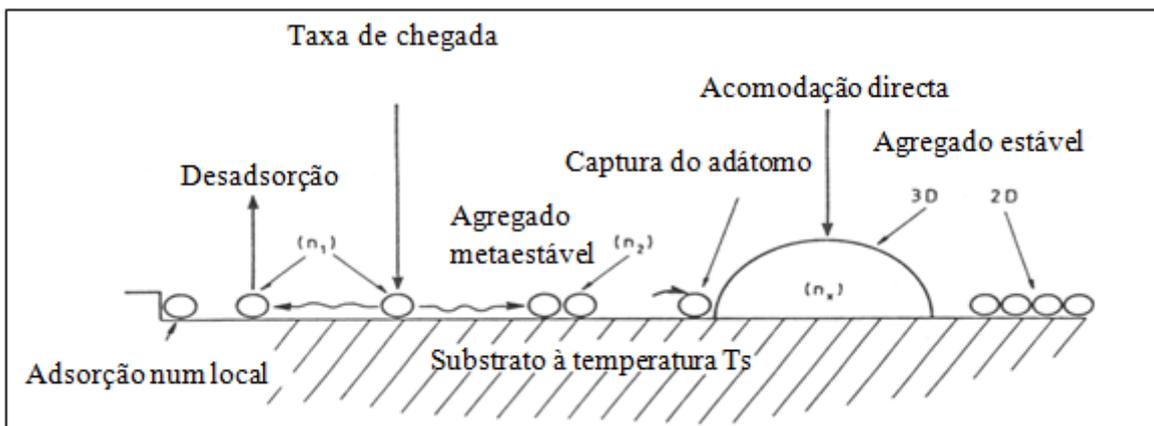


Figura 10 - Processo de nucleação e crescimento de um filme [15].

Com o aumento do número de átomos que alcançam a superfície do substrato são formados aglomerados que ao atingirem determinada dimensão tocam entre si e acabam por coalescer. Esta fase é normalmente acompanhada por uma brusca variação da forma do agregado que procura desta forma minimizar a sua área superficial total. Desta redução resultam novas zonas expostas de substrato que conduzem ao aparecimento de nucleações secundárias entre as “ilhas” já formadas que, tal como os agregados formados, acabam posteriormente por se ligar entre si e dar origem um filme contínuo [15].

A escolha da fonte de energia adequada a cada processo varia em função das características do material, bem como dos factores técnicos e económicos. De seguida irá detalhar-se alguns tipos de fontes de energia mais habituais na técnica de pulverização catódica.

Pulverização com fonte díodo ou tríodo

A pulverização com recurso a uma fonte díodo planar é o processo mais simples de obtenção de revestimentos por pulverização. O alvo cátodo comum apresenta forma circular com um diâmetro que varia entre cinco a dez centímetros. O alvo é normalmente fixado, soldado ou colado com cola condutora, a um suporte arrefecido a água.

O processo díodo apresenta a desvantagem de não permitir taxas elevadas de deposição uma vez que não utiliza de forma eficaz os electrões secundários. A escolha desta técnica para depositar filmes finos implica a aceitação de baixas taxas de deposição, face aos restantes processos. A figura 11 esquematiza este processo [14].

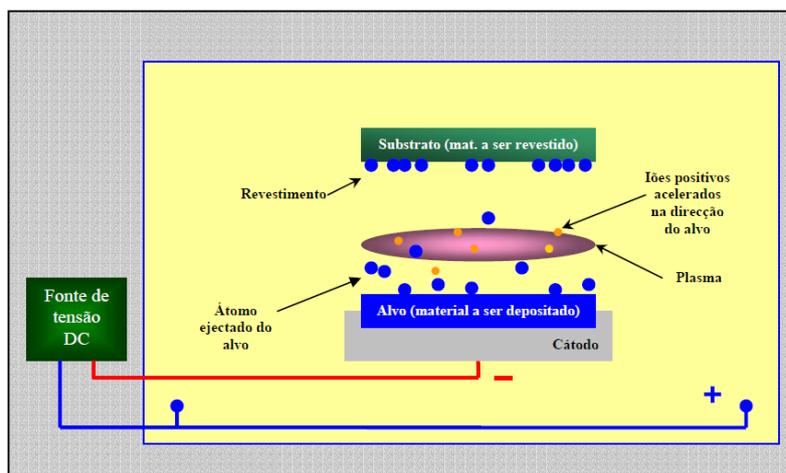


Figura 11 – Esquema do processo de pulverização catódica com fonte díodo [14].

No processo de pulverização catódica com fonte tríodo um filamento aquecido é adicionado à fonte de díodo planar. Desta forma são fornecidos electrões para sustentar a descarga e aumenta-se a ionização, permitindo a deposição de revestimentos a menores pressões e voltagens no alvo. Relativamente ao processo díodo, o processo tríodo permite taxas de deposição superiores.

Na prática, a introdução de um terceiro eléctrodo (fonte de electrões) e de um ânodo polarizado (positivamente) permite obter uma elevada corrente iónica associada a uma reduzida polarização do substrato.

A desvantagem deste processo reside no tempo de vida do filamento quando são utilizados gases reactivos. Na figura 12 está o esquema do processo tríodo.

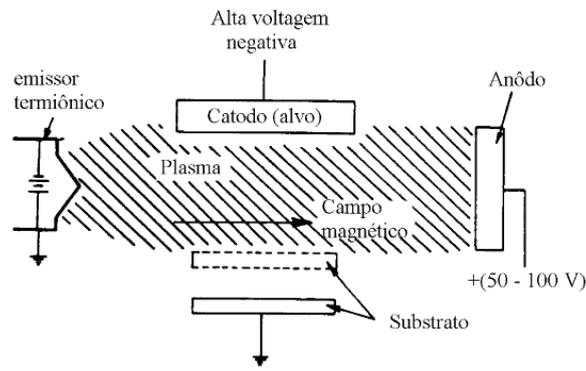


Figura 12 – Esquema de um sistema de pulverização com configuração tipo tríodo [17].

Pulverização com fonte magnetrão

O processo de pulverização com fonte magnetrão permite controlar eficazmente os parâmetros de deposição, bem como a qualidade dos revestimentos produzidos. Tal como já foi anteriormente referido, nas fontes de pulverização magnetrão existe um campo magnético paralelo à superfície do alvo, o qual combinado com o campo eléctrico origina electrões secundários que entram em circuito fechado na proximidade do alvo.

Com a introdução de um campo magnético que confina o plasma o efeito de ionização é aumentado uma vez que este campo se associa à descarga. Com este método o bombardeamento do alvo por electrões é reduzido evitando-se o seu aquecimento.

Devido às trajetórias helicoidais dos electrões, e ao consecutivo aumento do número de choques proporcionados por cada electrão, a probabilidade de ionização aumenta.

A desvantagem apresentada por esta técnica encontra-se na reduzida utilização do material do alvo – tipicamente 20-30% da do material-alvo. A concentração de plasma nas zonas em que o campo magnético é aplicado leva à erosão preferencial destes locais. É possível minimizar este problema promovendo o movimento relativo do alvo em relação aos magnetes. A título de exemplo, nos magnetrões cilíndricos, o alvo roda em torno de um magnete com posição fixa, revelando, segundo alguns autores, taxas de utilização de cerca de 90%.

Pulverização com fonte de rádio-frequência

O processo de produzir a ionização através de uma tensão contínua entre duas placas de um condensador, em que uma delas é o alvo, só é possível quando o material do alvo é electricamente condutor. Para alvos isolantes ou sólidos orgânicos ocorre uma acumulação de carga na superfície, que provoca um aumento do potencial levando à extinção da descarga.

Para permitir a deposição de filmes finos isoladores foi desenvolvida a técnica de pulverização por rádio-frequência, que evita a acumulação de cargas na superfície do material.

Na pulverização por rádio-frequência no lugar da fonte dípodo existe uma fonte rádio-frequência. Este processo apresenta a desvantagem de ser muito complicado, apresentar custos elevados e ainda baixas taxas de deposição. No entanto, é uma das soluções mais imediatas a adoptar quando se pretende depositar materiais cerâmicos ou poliméricos.

Pulverização com fontes magnetrão não balanceadas

Os processos típicos de deposição de materiais apresentam baixas taxas de deposição, baixa eficiência de ionização e elevado aquecimento do substrato. Limitações estas que podem ser superadas recorrendo à técnica de pulverização com magnetrão, ou ainda à técnica de pulverização com fonte magnetrão não balanceada.

A diferença entre estas duas técnicas diz respeito ao confinamento do plasma. Na primeira, o plasma é fortemente confinado à região do alvo. Nessa zona o plasma é denso e estende-se a aproximadamente 60mm em frente ao alvo. Durante o processo de crescimento do filme fino os substratos posicionados dentro desta região estão sujeitos ao bombardeamento por iões, podendo resultar numa modificação das propriedades do revestimento obtido. Os substratos colocados fora da região de elevada densidade de plasma estão numa zona de bombardeamento por iões insuficiente, dificultando a densificação do revestimento.

Na pulverização com fonte magnetrão não balanceada é colocado um outro anel de magnetes. Deste modo alguns electrões do plasma não são confinados no alvo em largura, mas conseguem seguir as linhas de campo magnético e dirigirem-se até ao substrato. Como resultado ocorre o bombardeamento do substrato com iões, o que conseqüentemente promove uma melhoria na qualidade do revestimento obtido. Na prática a deposição de revestimentos uniformes de componentes complexos através deste método revela-se difícil. Assim, diversas soluções recorrendo a múltiplos magnetrões têm sido apresentadas comercialmente. Utilizando dois magnetrões não balanceados opostos um ao outro estes podem ser configurados com magnetes opostos com a mesma polaridade (espelho), ou com magnetes opostos com polaridade oposta (campo fechado). Este último sistema tem conduzido a grandes melhoramentos na estrutura e propriedades dos revestimentos pulverizados. Na configuração campo fechado as linhas de campo magnético formam uma armadilha para os electrões no plasma. Deste modo, poucos electrões são perdidos nas paredes da câmara, mantendo-se um plasma denso na região do substrato, originando elevados níveis de bombardeamento com iões no filme em crescimento.

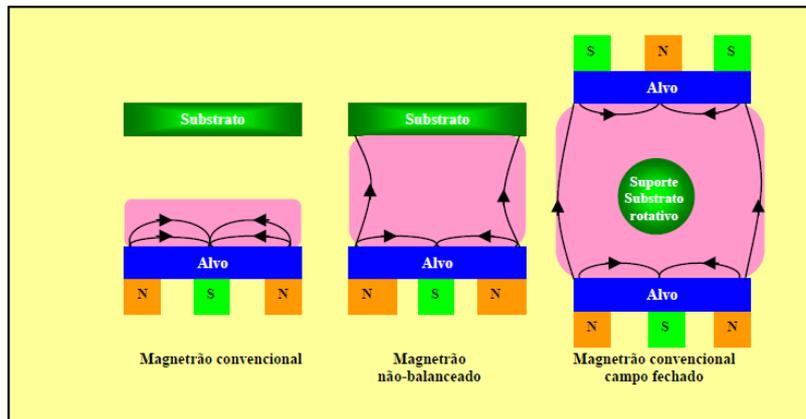


Figura 13 - Esquema dos processos de pulverização com magnetração convencional, magnetração não balanceado e magnetração convencional campo fechado [14].

Pulverização com fonte magnetração pulsada

Os problemas ligados à pulverização reactiva tais como a redução dos valores da taxa de deposição e a ocorrência de arcos induzidos são os principais responsáveis por defeitos nos revestimentos. Os arcos podem conduzir à ejeção de agregados de material do alvo causando defeitos no filme em crescimento. A taxa de deposição do processo reactivo com recurso a uma fonte de pulverização magnetração pulsada é semelhante do processo não reactivo.

A descarga de magnetração pode ser pulsada tanto em modo unipolar como bipolar, em ambos os casos o tempo de “pulso-on” é limitado de forma a não atingir o limite em que ocorre um arco. A descarga é dissipada através do plasma durante o “pulso-off”. No modo unipolar a voltagem do alvo varia entre 0V e o valor normal de voltagem em operação. No modo bipolar a voltagem do alvo é de facto invertida, tornando-se positiva durante o período “pulse-off”. Devido à maior mobilidade dos electrões comparativamente à dos iões, apenas é necessário inverter a voltagem do alvo entre 10 a 20% da voltagem negativa para dissipar totalmente a descarga.

A inversão periódica de pólos promove o efeito de auto-limpeza nos alvos, o que torna a deposição de ligas estável em longos períodos de tempo de deposição.

Na figura 14 encontram-se representadas as formas das curvas de voltagem dos modos de pulverização pulsada quando opera em unipolar ou em bipolar.

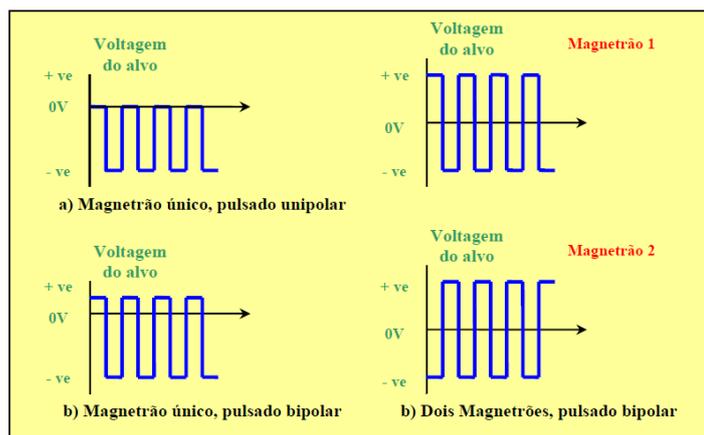


Figura 14 - Formas das curvas de voltagem dos modos de pulverização pulsada em modo unipolar ou bipolar [18].

Pulverização reactiva

No processo de deposição catódica reactiva pelo menos um dos constituintes do revestimento é introduzido na câmara de deposição na fase gasosa. As vantagens da utilização desta técnica residem no facto de que alvos metálicos simples serem mais fáceis de fabricar. Esta técnica permite a deposição de substâncias electricamente isoladoras partindo de alvos condutores. A maior desvantagem, porém, diz respeito à possibilidade de poder ocorrer uma diminuição da taxa de deposição associada ao envenenamento da superfície do alvo. O envenenamento ocorre devido à formação de óxidos isoladores na superfície do alvo tornando o processo de deposição mais difícil de controlar.

Para o presente trabalho, as deposições foram realizadas utilizando uma Edwards Coating System E306A. Este equipamento possui dois cátodos permitindo operar em modo díodo ou magnetrão, com ou sem polarização do substrato [15]. No nosso caso e para todas as deposições, foi utilizado o modo magnetrão sem polarização do substrato. Na figura 15 visualiza-se o equipamento referido.

Neste equipamento, a câmara de deposição consiste num cilindro em aço inoxidável de 300mm de diâmetro e 250mm de altura. Os cátodos, feitos de cobre, possuem um diâmetro de 120mm. O ânodo apresenta um diâmetro de 250mm e encontra-se posicionado em frente ao cátodo a uma distância de 65mm, possuindo a hipótese de rodar em torno do seu eixo, mantendo a polarização do substrato. O sistema de vácuo permite que a câmara seja inicialmente evacuada a uma pressão inferior a 1,5Pa através de duas bombas: uma bomba rotativa de dois estágios com capacidade de bombagem de $0,14\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, seguida por uma bomba turbomolecular com uma velocidade de $0,32\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ até um vácuo limite inferior a 10^{-4}Pa . A leitura das pressões dentro da câmara é feita por meio de duas células: uma Pirani PRL-10 que mede pressões até 0,1Pa e uma célula Penning CP25-K para pressões inferiores. O gás de descarga é introduzido dentro da câmara, sendo ajustado

automaticamente através de uma válvula de fuga servoassistida MV12 com um controlador modelo 80-1 [15].



Figura 15 - Equipamento de pulverização catódica - Edwards Coating System E306A.

Vantagens da técnica PVD

Para técnica de pulverização catódica são citadas como vantagens os seguintes aspectos:

As temperaturas de deposição são relativamente baixas; a ionização directa dos átomos do material a depositar providencia benefícios previamente só conseguidos em substratos aquecidos.

- i. A possibilidade de operar em pressões de trabalho muito baixas permite sintetizar materiais de elevada pureza.
- ii. Melhora a adesão do revestimento ao substrato devido à possibilidade de se “limpar” pulverizando (“*etching*”), e ainda pré-aquecer os substratos através de bombardeamento iónico e neutral da superfície do substrato.

- iii. Controla a textura do revestimento; o bombardeamento iónico fomenta o crescimento epitaxial, isto é, a obtenção de camadas finas (com espessuras de alguns nanómetros a alguns micrómetros) sobre substratos cristalinos [19], e estimula a mobilidade atómica.
- iv. Processos como os efeitos dispersivos dos gases e a possibilidade de se rodar ou deslocar as amostras relativamente à fonte de vapor durante a deposição permitem uniformizar as espessuras dos revestimentos.
- v. Normalmente efluentes ou poluentes não são utilizados, uma vez que na maior parte dos casos não intervêm produtos ou soluções tóxicas.
- vi. Evita a contaminação pelo hidrogénio, fenómeno recorrente no caso das electrodeposições.
- vii. Após o revestimento é eliminada a necessidade de maquinar ou polir, dado que na maioria dos casos a morfologia superficial do substrato é praticamente reproduzida à superfície do revestimento [20].

Desvantagens da técnica PVD

Quanto às desvantagens reveladas por esta técnica destacam-se:

- i. Custo do equipamento, sobretudo no que diz respeito aos acessórios responsáveis pela produção de vácuo.
- ii. Dificuldade em depositar com homogeneidade suficiente em peças de forma complexa.
- iii. Por vezes são detectados poros ou aglomerados nos revestimento.
- iv. Normalmente os revestimentos possuem estrutura colunar podendo afectar o seu comportamento em termos de resistência à corrosão [21].

Materiais e Métodos

Neste capítulo será apresentada a técnica de deposição escolhida para realizar o trabalho, bem como as técnicas experimentais de caracterização dos filmes finos produzidos.

2.1 Deposição de filmes finos

2.1.1 Procedimentos

a) Preparação das amostras

Na técnica de pulverização catódica designa-se por alvo o material a partir do qual se vai depositar um filme fino sobre uma fase condensada que fisicamente o vai suportar e que se designa por substrato.

Como substratos foram utilizadas pastilhas de silício, pastilhas de aço inoxidável 316L e lâminas de vidro; e como alvos a sílica, SiO₂, com n pastilhas de prata, com n=0,1,...,5 e polipropileno, PP, com n pastilhas de prata, com n=0,1,...,5. A utilização da lâmina de vidro teve como finalidade a determinação dos ângulos de contacto do filme. Por sua vez, os substratos de silício permitiram analisar a espessura do filme.

Antes de serem colocados na câmara de deposição os substratos foram limpos em banho de ultrassons, posteriormente em acetona, álcool e água desionizada, e após secagem em corrente de ar quente foram colocadas num porta-substratos. Uma amostra de silício escolhida ao acaso, foi parcialmente revestida com uma gota de cola cerâmica permitindo, após o seu destacamento, medir o degrau causado pelo filme e determinar a espessura do revestimento.

Depois de se terem introduzido as amostras na câmara de deposição, procedeu-se à evacuação da câmara para valores de pressão da ordem dos 10⁻⁴Pa, dando-se assim início ao processo de deposição. De seguida introduziu-se o gás de descarga (árgon) a uma pressão de 7x10⁻¹Pa e efectuou-se a limpeza dos alvos e dos substratos utilizando sempre as mesmas condições operatórias (ver tabela I). Para evitar a contaminação cruzada, alvos e substratos foram separados através de um anteparo.

Tabela I - Condições utilizadas nas deposições dos filmes finos.

	SiO ₂ + nAg	PP + nAg	C + nAg	
			SiO ₂ + nAg	PP
Pressão de limpeza (=Pressão deposição)	7,0x10 ⁻¹ Pa	7,0x10 ⁻¹ Pa	7,0x10 ⁻¹ Pa	7,0x10 ⁻¹ Pa
Potência de limpeza do alvo	150 W	100 W	150 W	100 W
Potência de deposição do alvo	200 W	100 W	200 W	100 W
Tempo de deposição	1h	1h	1h	1h

2.2 Técnicas experimentais de caracterização

A tabela II descreve as diferentes técnicas utilizadas para estudar as características dos filmes produzidos por pulverização catódica:

Tabela II – Técnicas utilizadas na caracterização dos filmes produzidos por pulverização catódica.

Característica em estudo	Técnica utilizada
Composição química	Microsonda electrónica
Morfologia	Microscopia electrónica de Varrimento
Estrutura	Difracção de Raios-X
Molhabilidade	Ângulo de contacto estático e dinâmico

2.2.1 Microsonda electrónica

A microsonda electrónica (“*Electron Probe Microanalysis*” – EPMA) permite avaliar a composição química elementar de amostras sólidas [15]. Um feixe de electrões acelerados é centrado sobre a superfície de uma amostra usando uma série de lentes electromagnéticas. Estes electrões energéticos produzem raios-X característicos dentro de um pequeno volume da amostra (geralmente 1 a 9 micrómetros cúbicos). Os raios-X característicos são detectados em comprimentos de onda específicos e as suas intensidades são medidas para determinar as concentrações. Uma vez que cada elemento emite um conjunto específico de raios-X, todos os elementos (à excepção de H, He e Li) podem ser detectados. Esta técnica é caracterizada por elevadas resolução espacial e sensibilidade. A microsonda electrónica, se equipada com os detectores apropriados permite, tal como um microscópio electrónico de varrimento (SEM), obter imagens de electrões secundários e retrodifundidos da superfície de uma amostra [22].

Os elementos principais de qualquer microsonda são: o sistema de produção da sonda e o espectrómetro que detecta os raios-X acoplado a um sistema de aquisição e tratamento de dados [15].

No presente trabalho, o equipamento utilizado foi um Cameca, modelo camebax SX50 manuseado com as condições operatórias da tabela III.

Tabela III - Condições de calibração e análise da microsonda.

Elementos	Tensão (KV)	Corrente (nA)	Padrão
C	10	40	Grafite
O	10	40	Sílica
Si	10	40	Sílica
Ag	10	40	Prata



Figura 16 - Microsonda electrónica (Cameca, modelo camebax SX50).

2.2.2 Microscopia electrónica de varrimento

Neste sistema um filamento de tungsténio emite electrões, por efeito termoiónico, que são acelerados por uma diferença de potencial (1-50kV) estabelecida entre o cátodo (filamento) e o ânodo. Posteriormente, um conjunto de lentes condensadoras foca este feixe de electrões reduzindo-o de uma dimensão inicial de 10 a 50 μm , para valores da ordem de 10 a 100nm e um diafragma controla a sua dimensão final antes de incidir sobre a amostra. Um sistema de bobines de deflexão varre o feixe de electrões sobre a amostra, o sinal resultante da interacção do feixe com a amostra é utilizado para a reprodução de uma imagem no ecrã de tubos de raios catódicos,

(*Cathode Ray Tube CRT*), em sincronia com o varrimento da amostra. O poder de resolução dos SEM é da ordem dos 10 nm, e a ampliação atinge valores da ordem de 20.000x.

A microscopia electrónica de varrimento (SEM – *Scanning Electron Microscopy*) é uma importante técnica de análise da morfologia dos revestimentos bem como da avaliação da espessura dos mesmos. As secções transversais observadas, quer para medir a espessura dos revestimentos, quer para análise da morfologia transversal do revestimento, foram obtidas por fractura, após impacto, do conjunto substrato/revestimento [15].

O princípio de funcionamento do microscópio electrónico de varrimento encontra-se esquematizado na figura 17.

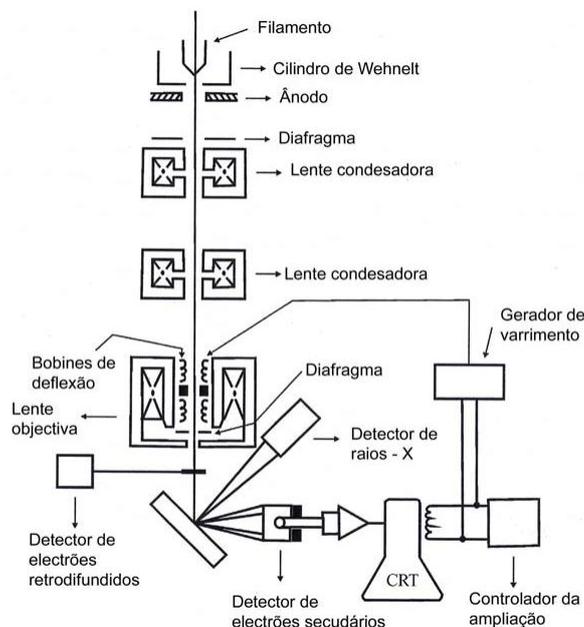


Figura 17 - Esquema de funcionamento de um microscópio electrónico de varrimento [23].

Da interacção do feixe primário de electrões com a amostra resulta uma grande variedade de sinais, nomeadamente, electrões Auger, raios-X característicos, fluorescência, etc. (Fig.18).

Na caracterização de materiais com este tipo de microscopia os sinais mais importantes são os electrões secundários e os electrões retrodifundidos. O primeiro tipo de electrões provem das colisões inelásticas dos electrões primários com os electrões das camadas exteriores dos átomos que compõe a amostra, recebendo assim energia suficiente para se libertarem do seu átomo e propagarem-se ao longo do material. Uma vez que só os electrões secundários gerados perto da superfície (10nm) escapam da amostra, faz com que este tipo de electrões possibilite a obtenção de contraste topográfico.

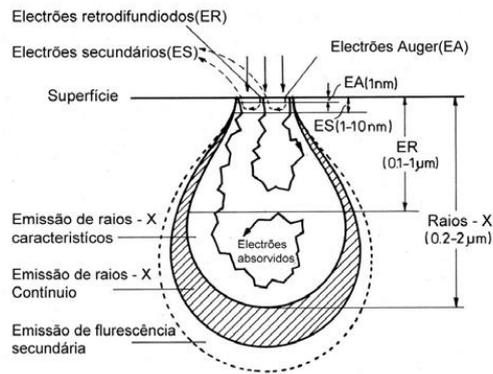


Figura 18 - Representação dos sinais resultantes da interação do feixe primário de electrões com a amostra [23].

Os electrões retrodifundidos são electrões do feixe incidente que emergem da superfície da amostra com ângulos de difusão elevados uma vez que sofrem múltiplas colisões elásticas. Estes electrões possuem elevada energia cinética (superior a 50eV) pelo que conseguem emergir do volume de interacção a partir de maiores profundidades da amostra, originando por isso imagens de menor resolução espacial do que as obtidas com electrões secundários. O contraste dado pelos electrões retrodifundidos provém essencialmente das diferenças na composição química das fases: elementos químicos com maior densidade electrónica possuem coeficientes de retrodifusão superiores originando maior brilho [23].

Neste trabalho foi utilizado um equipamento Philips, modelo XL30 equipado com detector EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*), normalmente com uma tensão de aceleração de 10 kV e ampliações de 5.000 e 10.000x.



Figura 19 - Microscópio electrónico de varrimento.

2.2.3 Difracção de raios-X

Por pulverização catódica, consoante o material depositado e as condições de preparação, podem obter-se filmes finos cristalinos ou amorfos. Nos revestimentos policristalinos cada um dos grãos pode apresentar uma orientação cristalográfica diferente da do seu vizinho, mas observando os grãos como um todo, estes podem estar distribuídos aleatoriamente em relação a um determinado plano de referência ou podem apresentar-se segundo uma ou várias orientações particulares, dizendo-se neste último caso que o filme apresenta uma orientação cristalográfica preferencial. Uma vez que os comprimentos de onda dos raios-X são da mesma ordem de grandeza das várias intensidades interplanares nos sólidos cristalinos, podem obter-se planos de difracção de várias intensidades quando o feixe de raios-X interage com um sólido cristalino [24]. A ocorrência de um pico resulta da interferência construtiva dos feixes difractados nos planos cristalinos da amostra. Para um conjunto de planos cristalinos de índices de Miller (hkl), a condição para observação de uma reflexão de raios-X é traduzida pela lei de Bragg:

$$n \times \lambda = 2 \times d_{(hkl)} \times \sin(2\theta) , \quad (\text{equação 1})$$

onde $d_{(hkl)}$ é a distância entre planos cristalinos, θ é o ângulo entre o vector do feixe incidente e o plano de Bragg responsável pela difracção e n é a ordem de difracção [24].

Na figura 20 está representado o esquema de um difractómetro de raios-X com geometria $\theta/2\theta$ semelhante ao utilizado neste trabalho para a aquisição dos padrões de difracção das amostras estudadas.

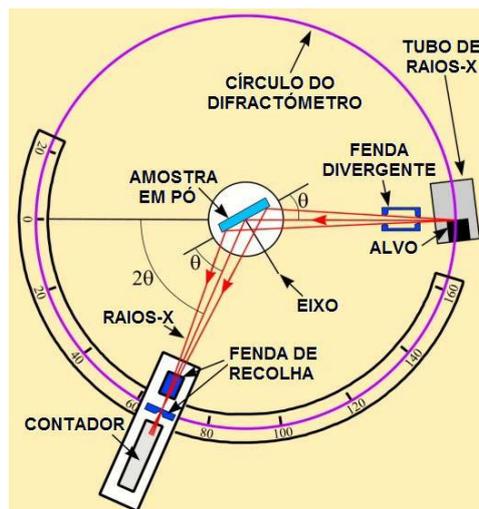


Figura 20 - Representação de um difractómetro de raios-X [25].

Segundo esta geometria, quando a amostra é movida de um ângulo θ , o detector é movido de 2θ . Quando a lei de Bragg é satisfeita obtém-se um pico no sinal do detector. Assim, sabendo o valor de 2θ e o valor do comprimento de onda, λ , é possível determinar o espaçamento entre os planos cristalinos que difractam os raios-X. Desta forma é obtido o espectro característico da amostra.

O equipamento utilizado foi um microdifratômetro Philips, modelo X'Pert com uma tensão de aceleração de 40 kV e uma corrente de 35 mA. O equipamento possui um detector unidireccional, em arco de círculo de 120° com uma resolução de $0,01^\circ$ e geometria Bragg-Brentano, e anticátodo de cobre ($K\alpha = 0,154056$ nm). A área de análise na superfície da amostra é de cerca de 150 micrómetros.



Figura 21 - Difratômetro de raios-X Philips modelo X'Pert.

Na tabela IV estão especificados os parâmetros de aquisição utilizados para a análise estrutural das superfícies modificadas.

Tabela IV - Parâmetros de aquisição utilizados no difratômetro.

Parâmetros de aquisição	Valores
Intervalo angular	$5^\circ - 100^\circ$
Modo de aquisição	Multipassagens
Tempo por passo	30.6 s
Radiação	Cu
Número de scans	6

A interpretação dos dados obtidos foi auxiliada pelo programa de computador PC-APDW Philips e a identificação e indexação das fases presentes nos filmes foi realizada por comparação dos resultados com os tabelados nas fichas ICDD (*International Center for Diffraction Data*).

2.2.4 Ângulos de contacto e molhabilidade

A molhabilidade de uma superfície depende do equilíbrio termodinâmico entre um sistema de três interfaces: sólido, líquido e vapor. Assim, para se estudar a molhabilidade de uma superfície coloca-se uma gota sobre a mesma e determina-se o ângulo de contacto que representa então uma medida quantitativa do processo de molhabilidade. A molhabilidade depende essencialmente da estrutura química da superfície e da sua rugosidade. Desta forma, o ângulo de contacto pode ser útil como medida de limpeza de superfícies ou para identificar se um tratamento químico foi executado com sucesso [26].

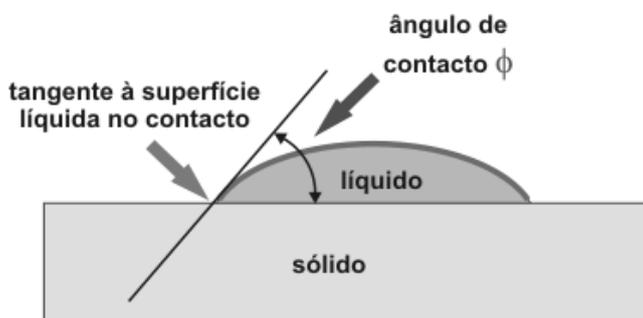


Figura 22 - Molhabilidade avaliada pela medição do ângulo de contacto do líquido com a superfície sólida [27].

Quanto menor for o ângulo de contacto maior a molhabilidade, isto é, mais o líquido molha a superfície sólida em contacto. Quando o líquido molha completamente a superfície sólida espalha-se numa fina camada de espessura praticamente monomolecular, como sucede no espalhamento do petróleo sobre o vidro. No caso do mercúrio sobre o vidro, líquido não molha a superfície sólida e divide-se em porções praticamente esféricas.

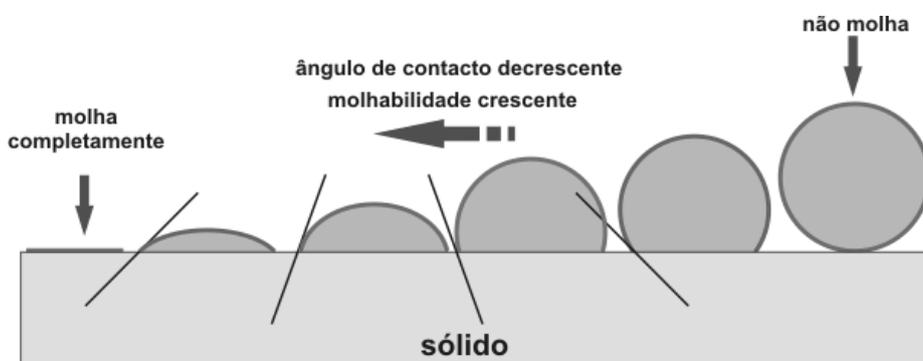


Figura 23 – Relação entre o ângulo de contacto e a molhabilidade [27].

Para calcular o ângulo de contacto considera-se o contacto entre as três fases, sólida, líquida e gasosa. A figura 24 mostra a representação das tensões superficiais.

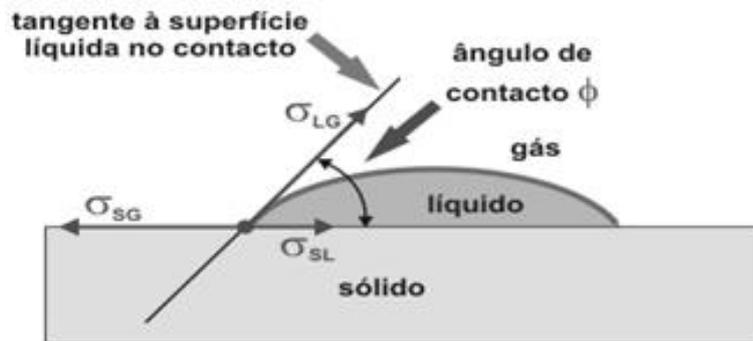


Figura 24 - Representação das tensões superficiais no contacto entre as três fases [27].

O ângulo de contacto, θ , é então obtido a partir da equação de Young:

$$\sigma_{SG} = \sigma_{SL} + \sigma_{LG} \cdot \cos \theta \Rightarrow \cos \theta = \frac{\sigma_{SG} - \sigma_{SL}}{\sigma_{LG}}, \quad (\text{equação 2})$$

sendo σ_{SG} , σ_{SL} e σ_{LG} , as tensões superficiais das interfaces sólido-gás, sólido-líquido e líquido-gás, respectivamente [27].

No presente trabalho, os ângulos de contacto foram medidos através de um goniómetro Krüss GmbH, modelo G-23 (Fig.25).

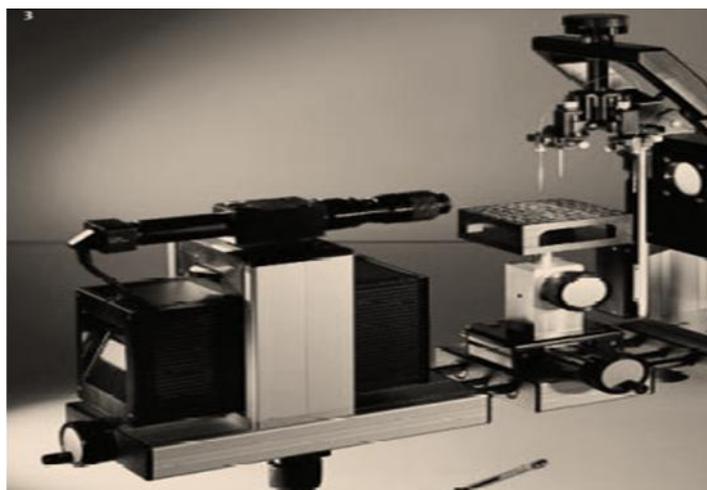


Figura 25 – Goniómetro Krüss GmbH, modelo G-23.

2.3 Preparação da solução de fluido cefalorraquidiano

Para avaliar a libertação da prata depositada por pulverização catódica, os filmes finos de sílica, polímero e compósito foram imersos em líquido cefalorraquidiano artificial (*cerebrospinal fluid* - CSF), mais precisamente do líquido cefalorraquidiano endógeno, e, portanto, fisiologicamente mais compatível. A preparação consistiu na mistura de duas soluções, A e B, na razão de 1:1 com a seguinte composição [28]:

1.Preparação da solução A:

Dissolveu-se em 500ml de água desionizada:

Composto	(g)
NaCl	8.66
KCl	0.224
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.206
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.163

2.Preparação da solução B:

Dissolveu-se em 500ml de água desionizada:

Composto	(g)
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	0.214
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.027

As amostras foram imersas em 20 mL da mistura de fluídos em condições dinâmicas asseguradas por uma bomba peristáltica e mantidas a 37°C. A superfície das amostras foi posteriormente observada por microscopia electrónica de varrimento.

Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados da deposição e caracterização dos filmes finos dos sistemas SiO₂, SiO₂/Ag, PP, PP/Ag e SiO₂/PP/Ag.

3.1 Composição química

A composição química elementar dos filmes foi determinada através da microsonda electrónica. Na tabela V é apresentada a composição química, em percentagem atómica, apenas dos filmes de sílica. Tal é devido ao facto de a microsonda não detectar, nem quantificar o elemento hidrogénio, elemento este que faz parte da composição química dos filmes dos sistemas poliméricos e compósito polímero/cerâmico, pelo que, para os filmes finos destes sistemas, apenas foi determinado o teor em prata. A designação dos filmes finos foi efectuada de acordo com o seu teor em prata conforme os dados da tabela VI.

Tabela V - Composição química dos filmes finos de sílica e sílica/prata.

Nº de pastilhas de prata adicionadas	Composição química (% atómica)		
	O	Si	Ag
0	69,0	31,0	--
1	67,4	30,6	2,0
2	65,7	28,6	5,7
3	62,2	25,2	12,6
4	63,7	26,5	9,8
5	62,3	26,8	10,9

O resultado da composição química do filme fino de sílica evidencia uma relação próxima de 2:1 para os teores de oxigénio e de silício, respectivamente. Com efeito, a pulverização catódica, a partir de alvos compostos por mais do que um elemento químico, normalmente induz no filme fino a composição do alvo que lhe deu origem. O processo de pulverização começa pela pulverização do elemento químico com maior taxa de ejeção o que induz, nos estágios iniciais, um enriquecimento do filme neste elemento. O alvo, por sua vez, fica enriquecido no elemento com menor taxa de ejeção, o que torna a probabilidade da sua ejeção maior. Este processo é

repetido ao longo do tempo que dura a pulverização, levando a que o filme fino, no seu global, apresente composição química semelhante ao alvo.

Tabela VI – Designações e teor em prata dos filmes finos depositados.

Alvo(s) e número de pastilhas de Ag	Ag %at.	Designação
SiO ₂ + 0Ag	0	S ₀
SiO ₂ + 1Ag	2,0	S ₂
SiO ₂ + 2Ag	5,7	S ₆
SiO ₂ + 3Ag	12,6	S ₁₃
SiO ₂ + 4Ag	9,8	S ₁₁
SiO ₂ + 5Ag	10,9	S ₁₀
PP + 0Ag	0	P ₀
PP + 1Ag	2,6	P ₃
PP + 2Ag	17,2	P ₁₇
PP + 3Ag	19,6	P ₂₀
PP + 4Ag	32,5	P ₃₃
PP + 5Ag	27,4	P ₂₇
SiO ₂ (0Ag) e PP	0	C ₀
SiO ₂ (1Ag) e PP	0,8	C ₁
SiO ₂ (2Ag) e PP	3,3	C ₃
SiO ₂ (3Ag) e PP	7,3	C ₈
SiO ₂ (4Ag) e PP	6,8	C ₇

No que concerne a composição química dos filmes dopados com prata não existe, aparentemente, uma relação entre o número de pastilhas adicionadas e o teor em prata para qualquer um dos sistemas estudados. Com efeito, o teor máximo em prata quantificada em cada um dos sistemas não corresponde ao número máximo de pastilhas colocadas sobre o alvo. Tal facto pode ser consequência de as pastilhas de prata se encontrarem apenas pousadas sobre os alvos e não coladas a eles. Com efeito, para evitar a contaminação dos alvos com cola as pastilhas foram pousadas sobre o círculo correspondente à distribuição dos magnetes e que corresponde à zona de maior erosão e, consequentemente, à zona de maior pulverização. Deste modo é maximizada a ejeção dos átomos do elemento dopante, mas, em contrapartida, diminui-se a ejeção dos elementos constituintes do alvo. Por outro lado a taxa de ejeção da prata (1,7) é muito superior à da sílica (0,23) em idênticas condições de pulverização, o que conduz a teores de prata elevados apenas com pequenas quantidades deste elemento como dopante. Deve ainda ser referido que a composição das espécies presentes no plasma é muito complexa, uma vez que existem diferentes estados energéticos para cada elemento químico ejetado. A sua presença num ambiente tão energético conduz a múltiplas recombinações químicas que dão origem a que algumas espécies percam energia durante as colisões, ou desvio de trajectória levando à sua deposição nas paredes da câmara e não no substrato [29]. Através das caracterizações efectuadas não foi possível saber qual ou quais os factores que mais contribuiriam para o comportamento

observado, sendo evidente que para os filmes finos dopados com maior número de pastilhas de prata parece ocorrer uma saturação para a quantidade deste elemento susceptível de ser incorporado no filme em crescimento.

3.2 Morfologia (após deposição)

A morfologia superficial e da secção transversal dos filmes finos de sílica pode ser observada nas micrografias da figura 26.

As micrografias permitem desde logo observar que a espessura de todos os filmes finos é inferior a 1 μm . Este facto é importante uma vez que é objectivo modificar a superfície do silício com revestimentos que não sejam espessos, pois, por um lado, apenas se pretende tornar a superfície mais compatível com o tecido cerebral, e, por outro lado, o aumento da espessura deste tipo de revestimentos leva, em alguns casos, ao destacamento do filme fino devido às tensões que ocorrem durante o processo de nucleação e crescimento.

Pela observação das imagens é também evidente que o crescimento do filme fino apresenta uma continuidade em relação às características morfológicas do substrato. Com efeito, após a fractura do conjunto substrato/revestimento não ocorreu destacamento dos filmes finos e a sua morfologia indica a referida continuidade. Tal facto deve ser realçado uma vez que uma das razões para ter sido seleccionada a sílica como composto para a modificação da superfície do silício era precisamente a compatibilidade química que deveria induzir uma forte adesão entre substrato e revestimento, tal como estas micrografias validam.

Tanto a morfologia superficial como a da secção transversal mostram que os filmes finos deste sistemas, com ou sem a adição de prata, não apresentam, para as ampliações utilizadas, número significativo de defeitos ou porosidade, sendo designadas por morfologia “*featureless*” de acordo com o modelo de Thorton [30,31], o que indica uma morfologia densa e sem características aparentes e que foi já observada por outros autores para os filmes de sílica [32]. A presença de prata não parece perturbar o tipo de crescimento do filme fino durante a deposição uma vez que, quer a morfologia superficial quer a transversal, não sofrem alterações. Alguns autores [33] referem que a presença de outros elementos químicos durante a deposição de filmes finos de sílica permite diminuir o número de ligações pendentes que existem na sua superfície, pelo que diminuem a probabilidade da existência de defeitos, contribuindo também para o efeito densificador que dá origem a este tipo de morfologia.

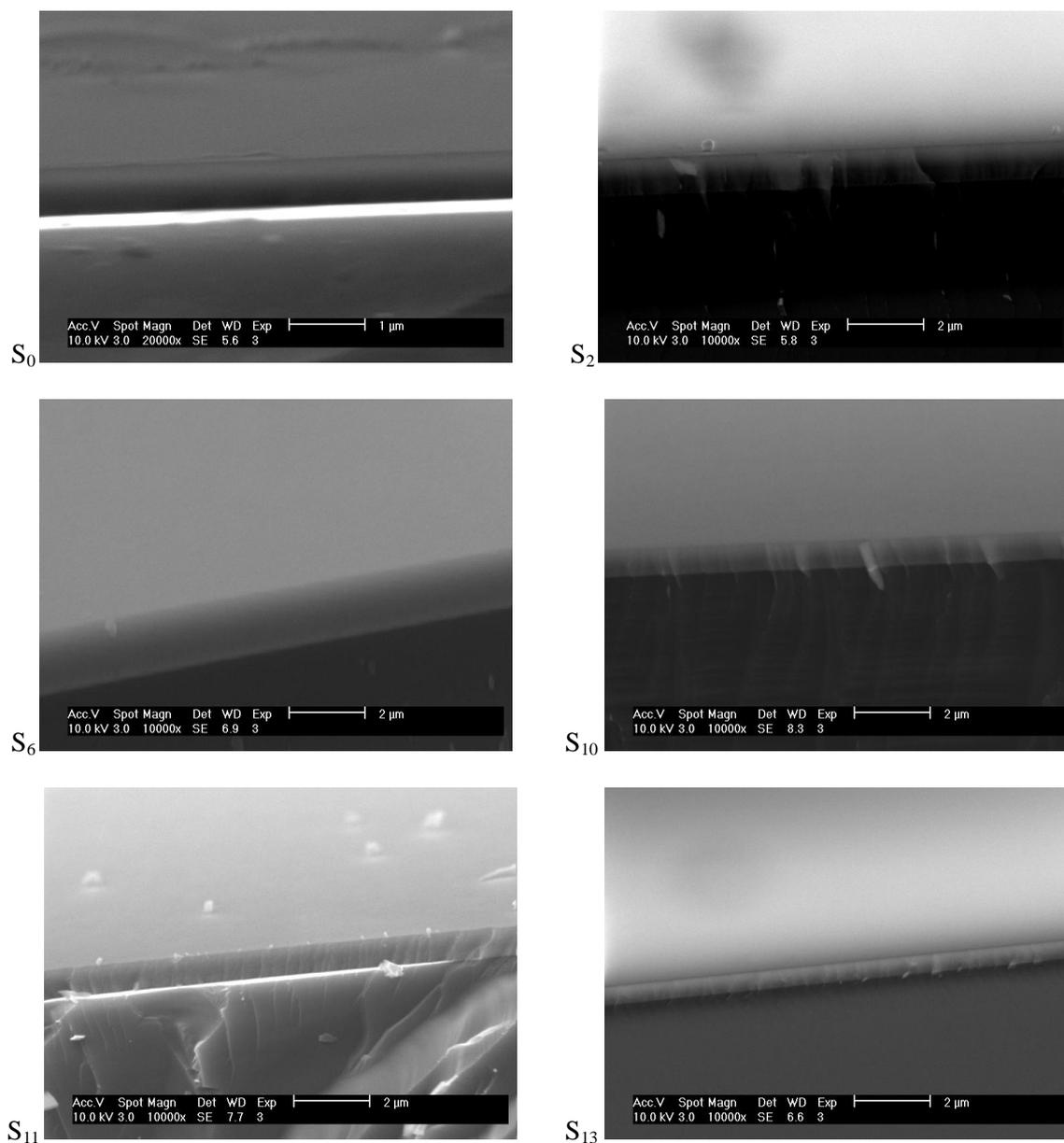


Figura 26 – Micrografias das amostras de sílica após a deposição.

As morfologias superficiais dos filmes finos do sistema polimérico e do sistema cerâmico/polímero podem ser observadas nas figuras 27 e 28. Em geral, e à semelhança do que ocorre para o sistema de sílica, as morfologias aparentam ser densas e sem defeitos, excepto aqueles que existiam previamente na superfície dos substratos e que são incrementados pelo processo de deposição por pulverização catódica. A aparente excepção parece ser a morfologia do filme C₇ que apresenta alguma densidade de defeitos que parecem corresponder a aglomerados de um material distinto. No entanto, esta hipótese não foi possível de ser comprovada através de um mapa de distribuição elementar.

A pulverização catódica, em modo r.f.magnetron, usualmente produz filmes finos cerâmicos e poliméricos densos e sem morfologia aparente, mesmo que depositados a partir de alvos com estrutura cristalina, de acordo com o observado por outros autores [15]. Se a pulverização a partir

de um alvo de sílica, bem como a obtida a partir de um alvo de polímero dão origem a filmes densos, não há razão para que os produzidos a partir de uma co-deposição dos dois alvos apresentem outro tipo de morfologia. Conforme será discutido no subcapítulo seguinte normalmente esta morfologia está relacionada com a falta de ordem estrutural dos revestimentos.

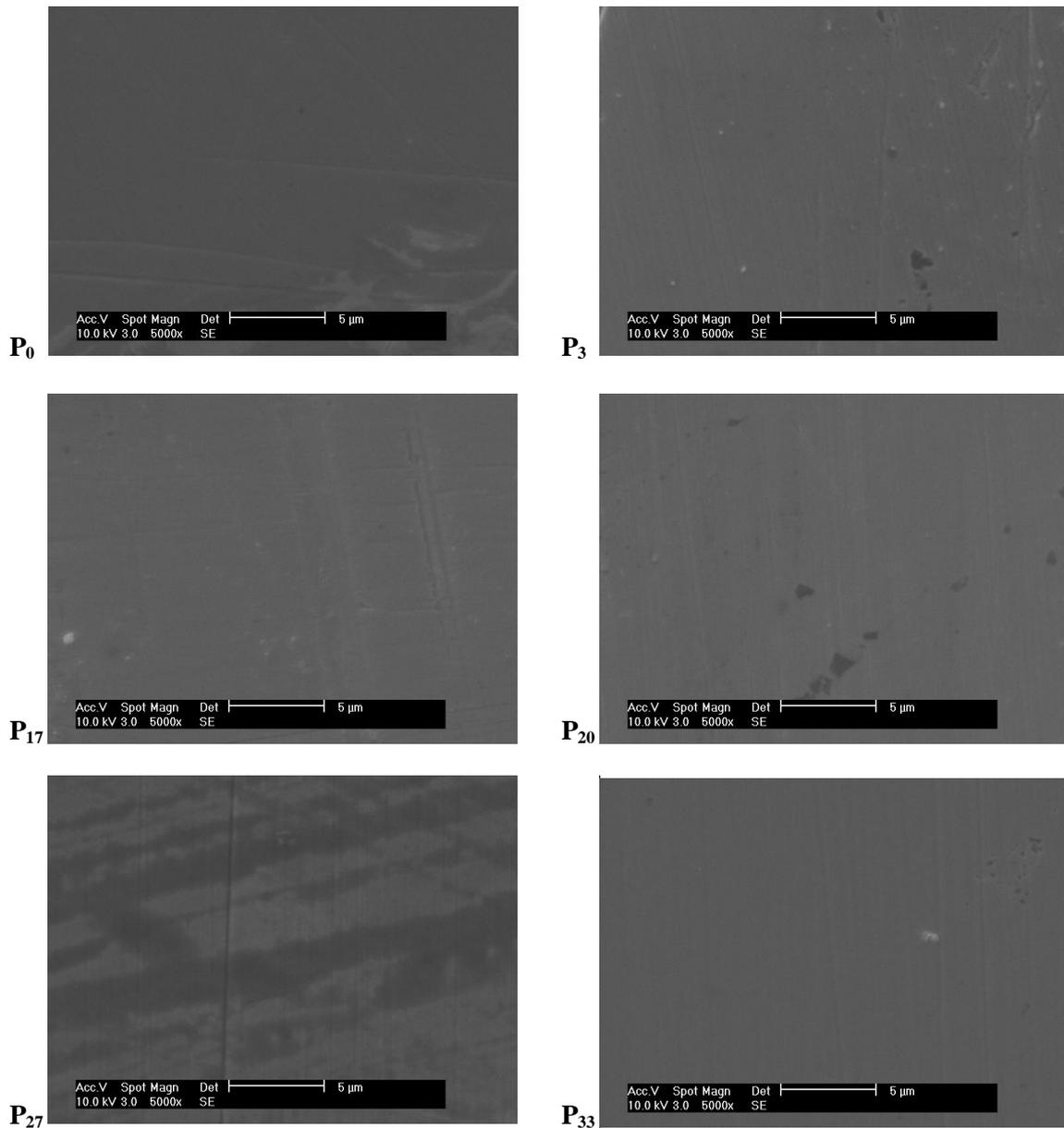


Figura 27 – Micrografias da superfície dos filmes finos de polímero, com e sem prata, após a deposição.

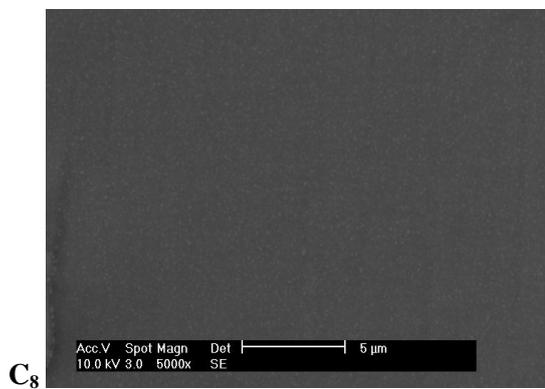
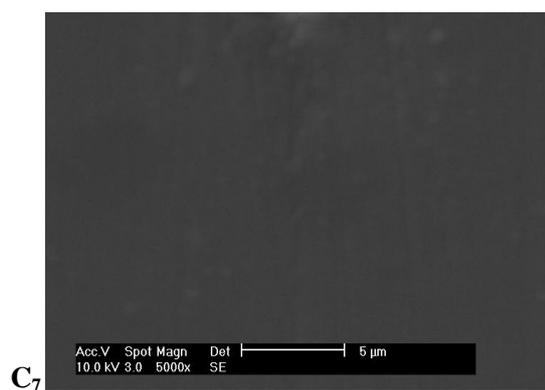
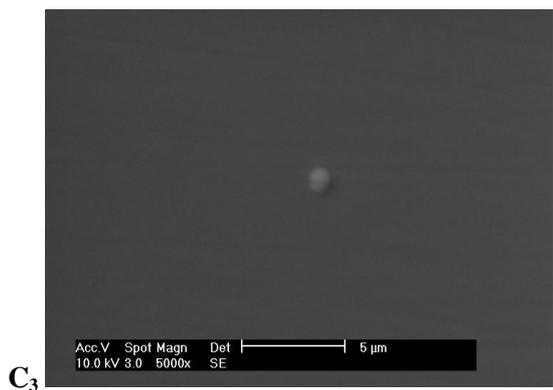
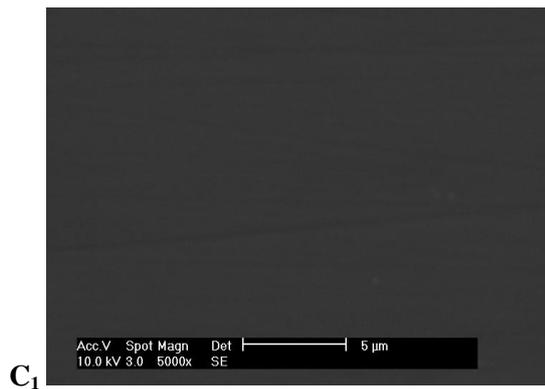
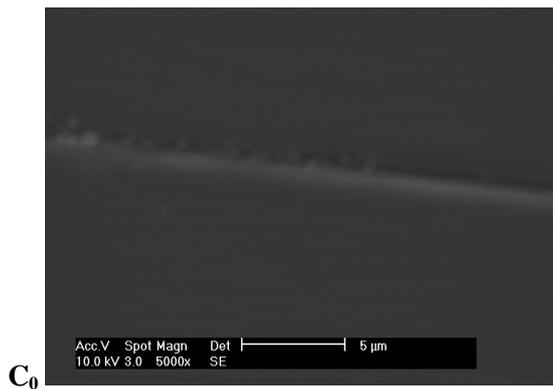


Figura 28 – Micrografia superficial dos filmes finos do sistema cerâmico/polímero após a deposição.

3.3 Estrutura

A estrutura cristalina e a identificação dos planos de difracção das amostras foram estudadas por difracção de raios-X. Tendo em consideração que quer a sílica, quer o polímero não apresentam ordem estrutural, e por conseguinte nem o compósito, não serão observados planos de difracção destes constituintes das amostras. Deste modo, apenas os planos de difracção referente à prata serão observados nos difractogramas de raios-X, independentemente da composição química dos filmes finos. Por este motivo apenas os difractogramas dos filmes finos de polímero (Figura 29) são apresentados e representativos também da estrutura dos filmes finos de sílica e de compósito.

Tal como se torna evidente pela observação do difractograma da amostra P_0 os planos de difracção do substrato são coincidentes com os de difracção da prata, o que torna a interpretação dos resultados mais difícil. No entanto, o substrato, adquirido comercialmente, não apresenta orientação preferencial, ou seja, os planos de difracção detectados são sempre os mesmos e com intensidades relativas constantes. Tal não é o observado nos difractogramas dos filmes que se encontram dopados com prata, pelo que podemos assumir que as variações nas intensidades relativas têm origem na difracção da prata e não devido à presença do substrato.

Um estudo anteriormente realizado sobre a estrutura de filmes finos de prata pura, depositados por r.f. magnetron, revela que, para deposições em condições idênticas às utilizadas neste estudo, os filmes finos apresentavam uma orientação cristalográfica preferencial segundo o plano (111). Segundo este mesmo estudo, a energia elevada dos adátomos favorecem esta orientação por um ou ambos dos seguintes motivos: a alta energia das espécies que atingem o substrato produz um efeito de *re-sputtering* que ocorre preferencialmente em planos com energia de superfície superior e com menor densidade - os planos (200); e, a alta energia dos adátomos permite-lhes que se difundam de superfícies com energia elevada (200) para as superfícies com uma energia de superfície inferior (111) [34].

No entanto, neste trabalho, o alvo utilizado foi de material cerâmico e/ou polimérico dopado com prata e não foi apenas de prata. De acordo com o referido anteriormente, a recombinação das diferentes espécies químicas presente no plasma, bem como a sua constituição, dão origem a uma orientação preferencial da prata mas segundo um plano com menor densidade. Tal facto coincide com um dos objectivos a que este trabalho se propõe, uma vez que se pretende a libertação da prata. Esta só ocorrerá se a estrutura do metal estiver susceptível ao ataque de espécies químicas que induzam a sua oxidação a Ag^+ . Estudos anteriores demonstraram [34] que a orientação segundo um plano menos denso permite este tipo de interacção química, o que não é possível se a orientação for segundo o plano de maior intensidade relativa e de maior densidade – o plano (111).

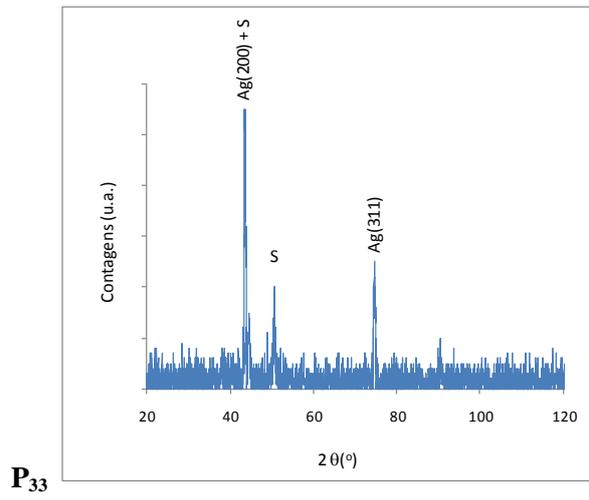
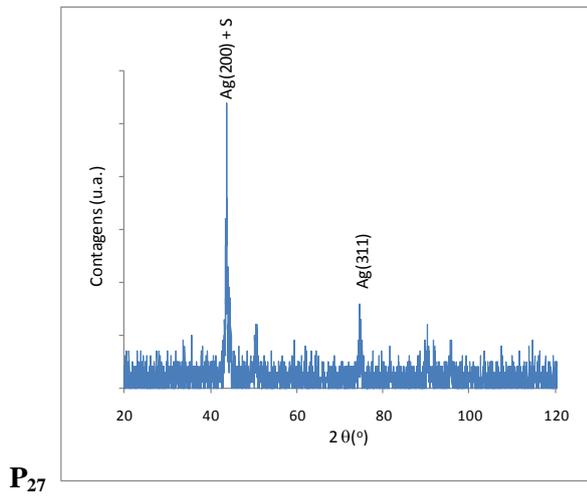
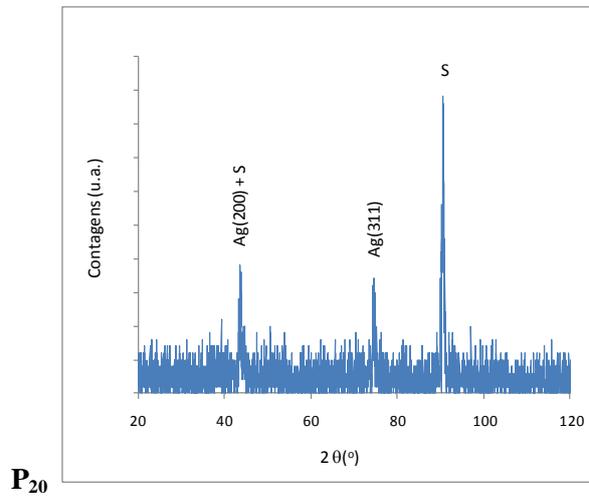
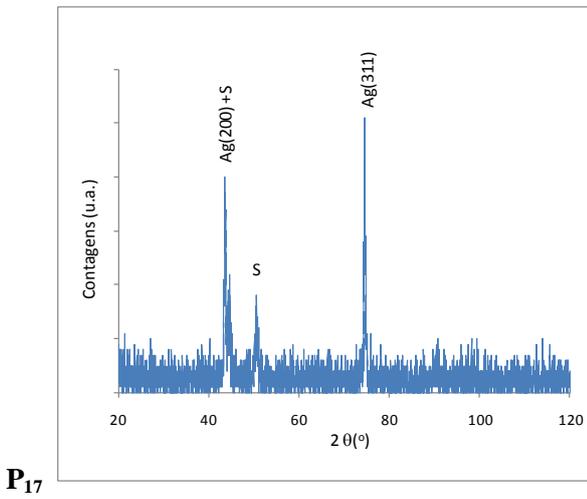
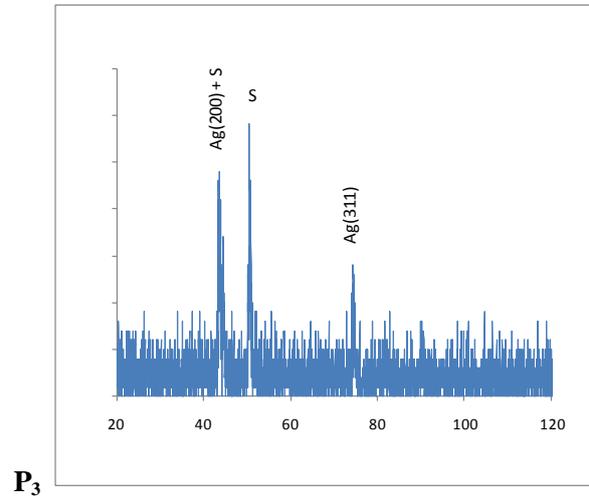
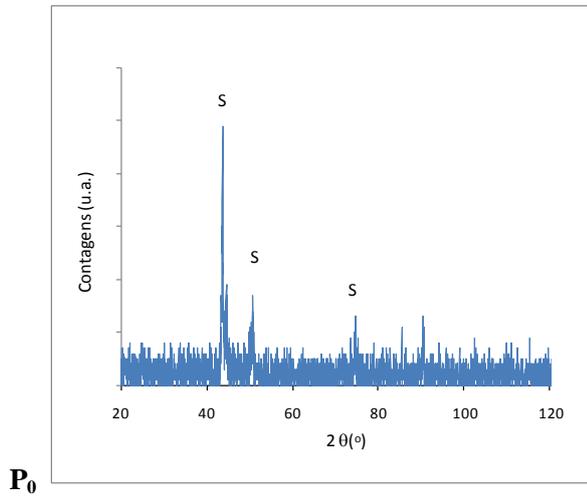


Figura 29 – Difractogramas das amostras de polímero.

3.4 Molhabilidade

A medição do ângulo de contacto é um factor determinante na avaliação da hidrofiliicidade/hidrofobicidade de uma superfície, factor relevante na sua aplicação como biomaterial. Para a medição do ângulo de contacto foram utilizadas gotas de água destilada com volumes de 10µl. Nas figuras 30 e 31 estão representados os gráficos do valor médio dos ângulos de contacto estáticos medidos aquando da interacção da gota de água com as superfícies das amostras de sílica e de polímero, bem como os respectivos desvios padrão.

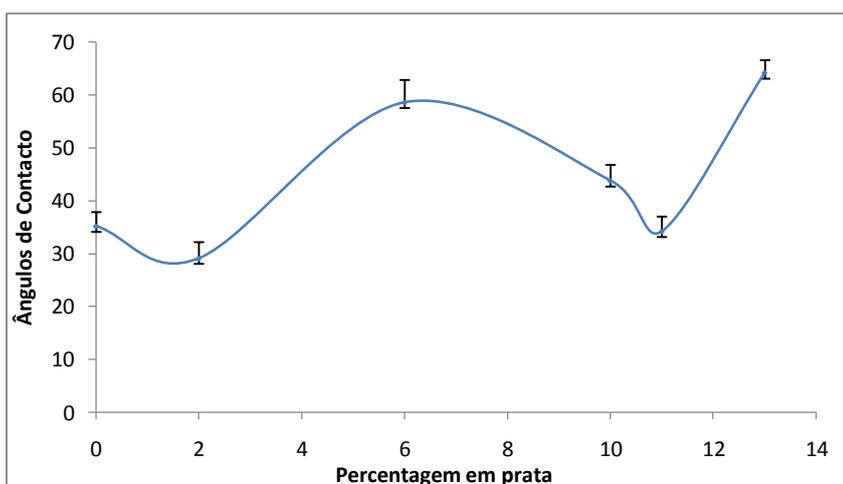


Figura 30 – Valor médio dos ângulos de contacto estático e respectivo erro associado das superfícies dos filmes finos de sílica com água.

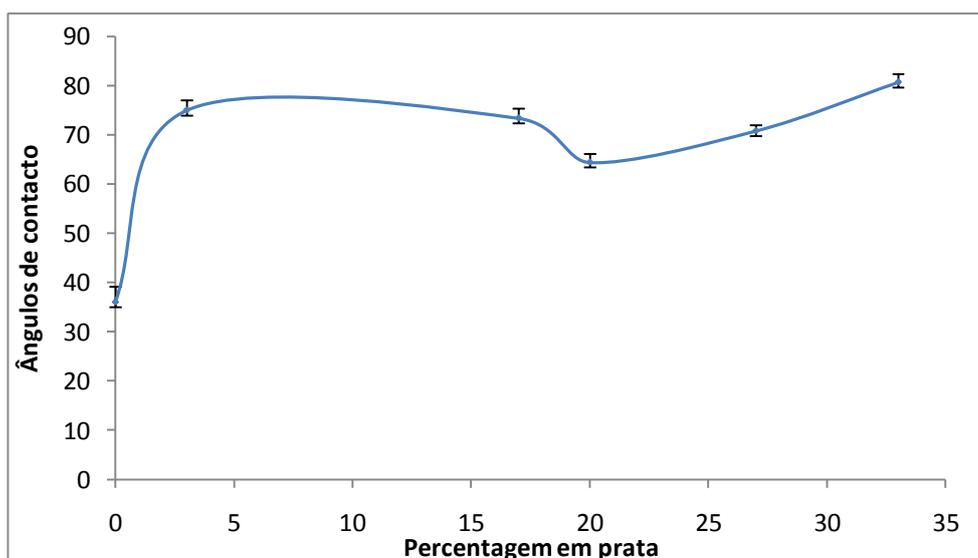


Figura 31 – Valor médio dos ângulos de contacto estático e respectivo erro associado das superfícies dos filmes finos de polímero com água.

Os valores dos ângulos de contacto das amostras de sílica não apresentam qualquer relação com o aumento do teor em prata, indicando que carácter hidrófilo ou hidrófobo da superfície não depende dessa quantidade. No entanto, e de um modo global, é evidente o aumento da hidrofobicidade induzida pela presença de prata na amostra. A variabilidade dos valores do ângulo de contacto estático é essencialmente induzida por diferente topografia superficial ou diferente distribuição de grupos químicos funcionais na superfície em estudo. Uma vez que as micrografias evidenciaram não existir alteração da morfologia superficial entre os vários filmes finos do sistema de sílica, a variação só pode residir numa química superficial distinta para as amostras. Para os teores iniciais de prata ocorre um aumento do ângulo de contacto, indicando um aumento da hidrofobicidade do sistema. Tal facto pode ser uma consequência do que foi referido anteriormente como sendo o efeito estabilizador de outros elementos durante a deposição da sílica, nomeadamente no que respeita a presença de ligações pendentes. Com efeito, se a presença de prata diminui o número de ligações pendentes, estas não têm tendência a reagir com a humidade atmosférica, logo que o filme é retirado da câmara de deposição, diminuindo assim a probabilidade da formação de grupos silanol (SiOH) que são hidrófilos, com o aumento da formação de grupos siloxano (-Si-O-Si-) que têm natureza hidrófoba [15].

Quando as concentrações de prata atingem valores superiores, estas correspondem aos filmes finos que foram depositados em ambientes de maior densidade de espécies químicas no plasma e, conforme referido, parece induzir alterações, quer a nível do teor da prata que a nível da distribuição de grupos químicos funcionais à superfície.

Nas superfícies produzidas pela deposição a partir do alvo de PP, o efeito hidrófobo que a prata induz na superfície é incrementado pelo facto de os materiais poliméricos constituídos por C e H serem por definição sistemas hidrófobos. Na figura 32 está representado o gráfico do valor médio dos ângulos de contacto estáticos medidos aquando da interacção da gota de água com as superfícies das amostras de compósito, bem como os respectivos desvios padrão.

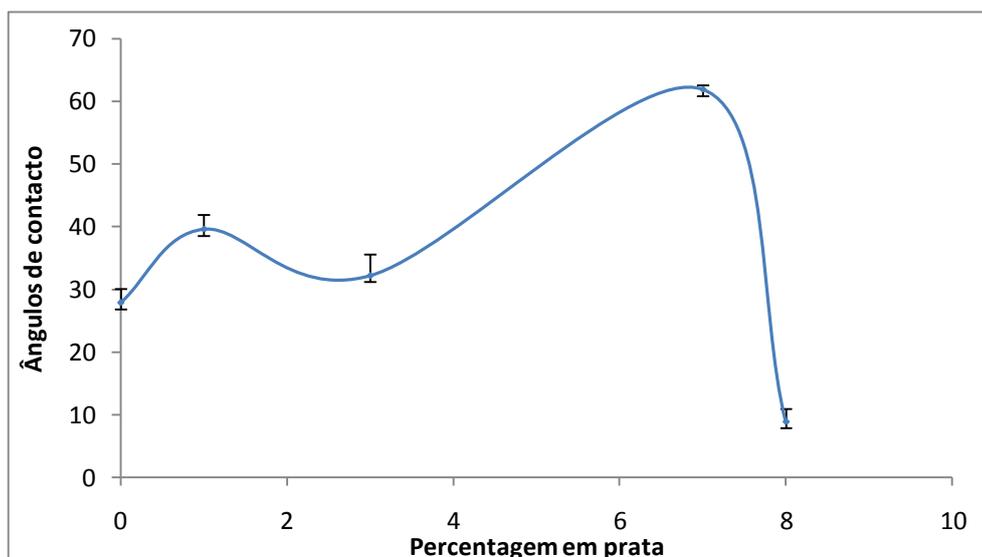


Figura 32 – Valor médio dos ângulos de contacto estático e respectivo erro associado das superfícies dos filmes finos de compósito com água.

Nas amostras de compósito, uma vez que o teor em prata nelas existente é bastante reduzido, os valores dos ângulos de contacto são inferiores aos observados nos casos anteriores. No entanto, ao contrário do que acontecia nas amostras de sílica e polímero, em que a amostra com maior teor em prata era a que se revelava mais hidrofóbica, isto é, a que apresentava maior ângulo de contacto, para o compósito, a amostra com maior teor em prata é a que apresenta menor ângulo de contacto, isto é, é a mais hidrófila. Em suma, os valores dos ângulos de contacto nos ensaios de molhabilidade das amostras não dependem do teor em prata unicamente, mas também dos grupos reactivos presentes na superfície do filme. Por exemplo, no caso do compósito em que se encontram presentes Silício (Si), Oxigénio (O), Carbono (C), Hidrogénio (H), a ocorrência de ligações entre os grupos O e H pode estar na base do carácter hidrófilo apresentado. No entanto, num meio altamente energético, como é o do plasma na pulverização catódica, a probabilidade de ocorrerem as mesmas ligações na presença de diversos teores de prata é bastante aleatória, pelo que não será a prata a única a ter influência no carácter hidrófilo ou hidrófobo das superfícies.

3.4.1 Histerese dos ângulos de contacto

A histerese do ângulo de, $\Delta\theta$, é a diferença entre o ângulo de contacto de avanço, θ_a , e o ângulo de retrocesso, θ_r , medidos em condições dinâmicas é interpretada como uma consequência das heterogeneidades de energias superficiais do sólido originadas ou pela presença de diferentes domínios hidrofóbicos/hidrofílicos ou pela presença de grupos químicos funcionais que reagem física ou quimicamente com a água.

Na tabela VII estão os valores dos ângulos de contacto dinâmicos (avanço e retrocesso), bem como da histerese dos ângulos para todas as superfícies estudadas.

Tabela VII – Valores dos ângulos de contacto dinâmicos e da histerese dos filmes finos.

amostra	% Prata	θ_a	θ_r	$\Delta\theta$
Sílica	0	35,1	11,4	23,7
	2	27,9	9,1	18,7
	5,7	42,6	14,0	28,6
	9,8	47,9	15,4	32,5
	10,9	66,9	14,7	52,2
	12,6	34,9	8,9	26,0
Polímero	0	31,8	12,4	19,4
	2,6	83,5	30,8	52,7
	17,2	15,5	4,2	11,3
	19,6	40,4	12,4	28,0
	27,4	83,5	30,9	52,6
	32,5	59,1	20,0	39,1
Compósito	0	27,9	14,5	13,4
	0,8	39,6	10,7	28,9
	3,3	32,2	9,7	22,5
	6,8	61,9	15,3	46,6
	7,3	ND	ND	ND

A figura 33 ilustra o gráfico de histerese do ângulo de contacto, traçado a partir do ensaio de molhabilidade, para a amostra de S₁₁ (sílica + 10,9% prata), cujo valor, como se pode ver na tabela VII, é de 52,17 e que corresponde a uma dos valores mais elevados.

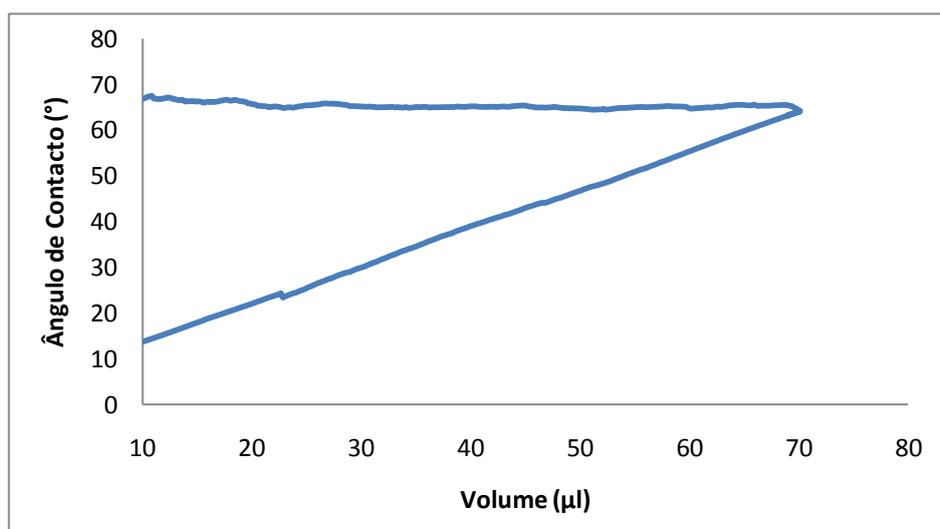


Figura 33 - Gráfico obtido através do ensaio de molhabilidade para S₁₁.

O facto de existir histerese nos ângulos de contacto indica que a química superficial das amostras modificadas é diferente dos alvos que lhes deram origem. Com efeito, de acordo com os dados obtidos, o facto de o valor do ângulo de retrocesso ser inferior ao ângulo de avanço aponta para a presença de grupos químicos superficiais hidrófilos.

3.5 Caracterização após testes de imersão

Após 96 horas de imersão das amostras no líquido cefalorraquiano (CSF) novas avaliações da morfologia superficial foram efectuadas por observação em microscópio electrónico de varrimento. As figuras 34, 35 e 36 apresentam as modificações ocorridas nas superfícies dos diferentes filmes finos dos sistemas de sílica, de polímero e de compósito, respectivamente.

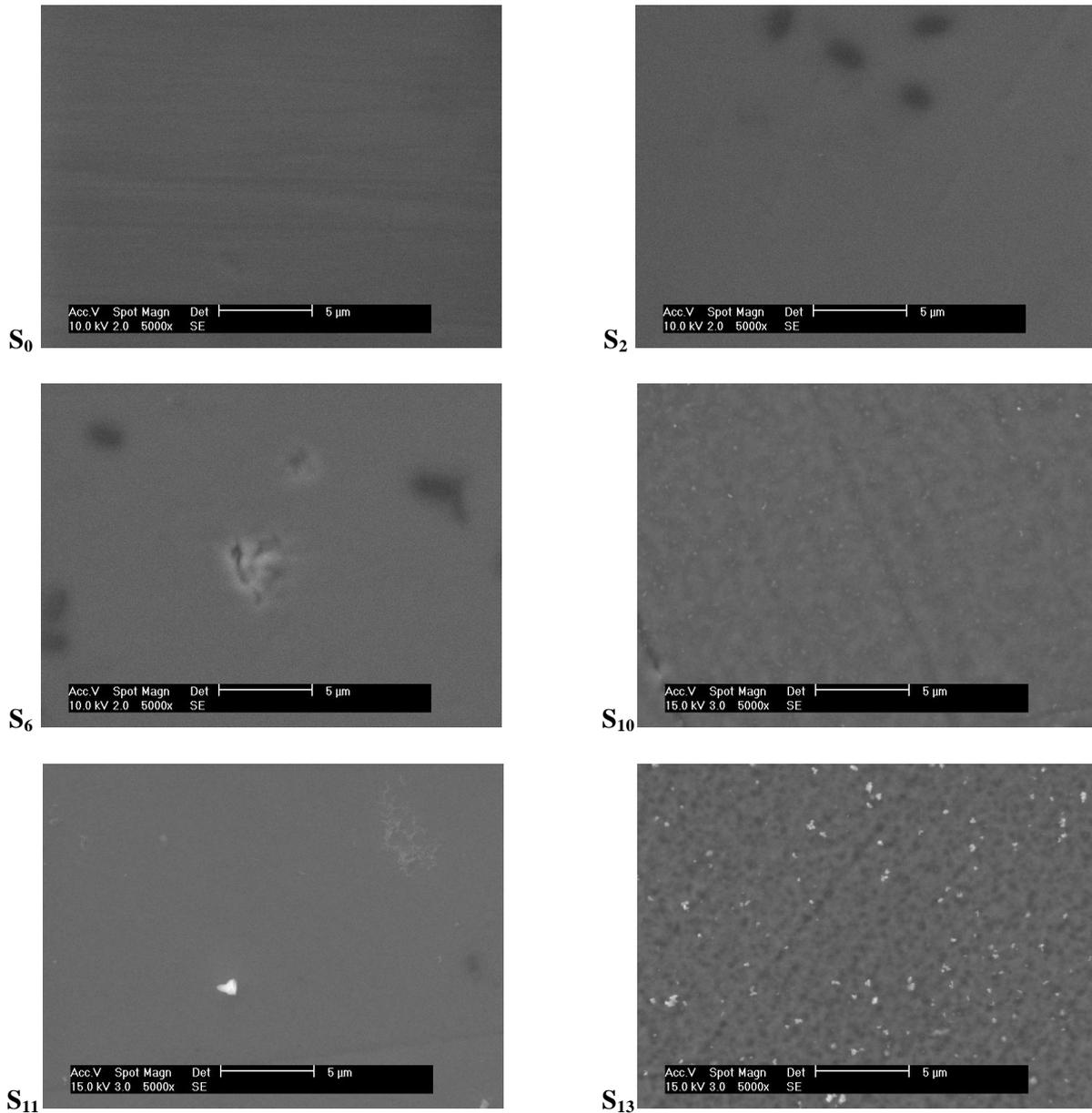


Figura 34 - Morfologia superficial dos filmes finos após imersão no líquido cefalorraquidiano artificial.

Após 96 horas de imersão, das amostras modificadas com o sistema de sílica em CSF artificial, é visível alguma microrrugosidade. Esta deve ter como origem a liberação baixos teores de prata uma vez que as partículas de forma irregular na superfície desta mesma amostra correspondem a precipitados de cloreto de sódio.

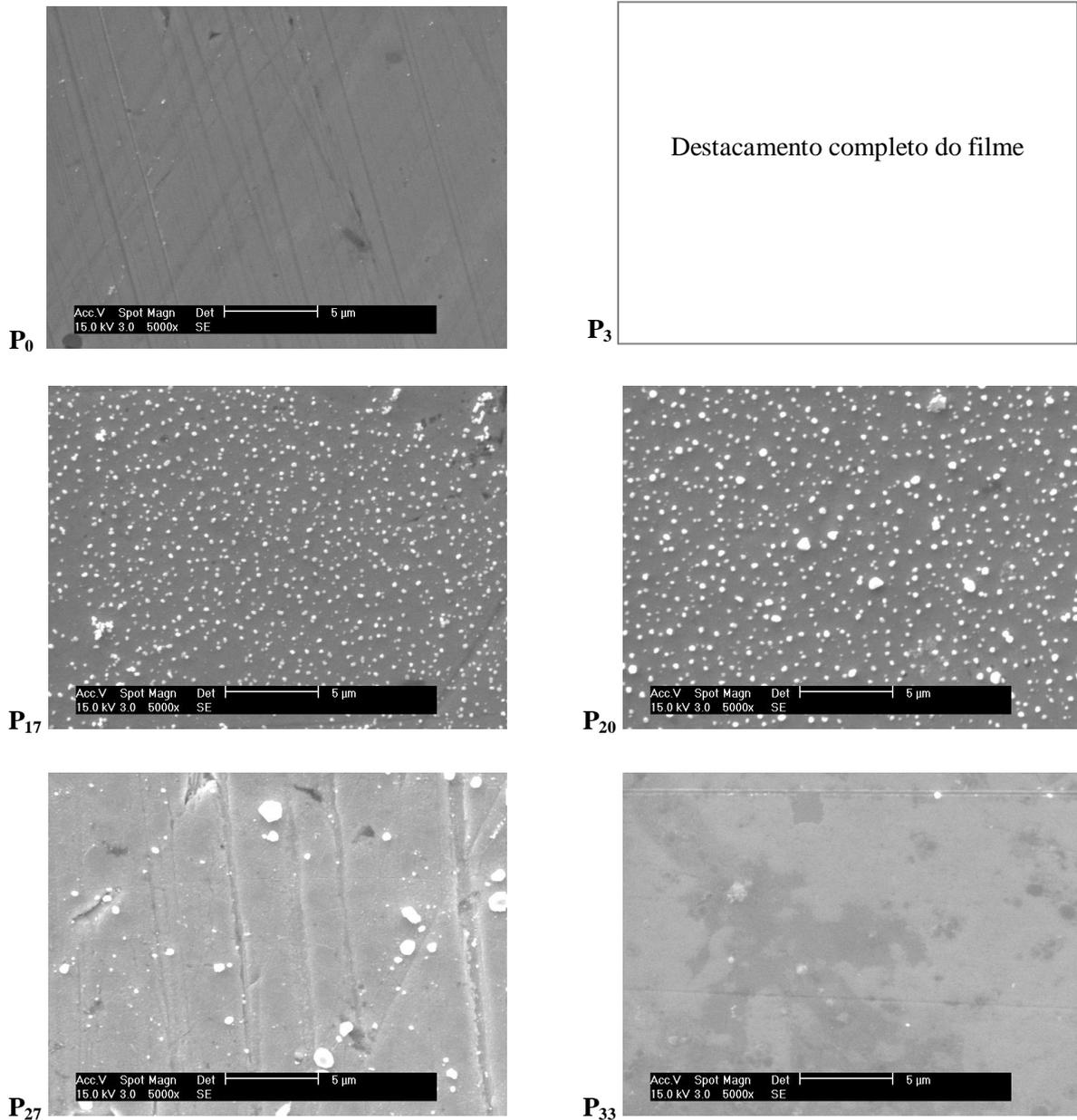


Figura 35 - Morfologia superficial dos filmes finos de polímero após imersão no líquido cefalorraquidiano artificial.

Em qualquer uma das superfícies do sistema polimérico, ao contrário do que sucedeu no caso das amostras de sílica, não foi possível observar nenhuma alteração topográfica que pudesse ser apontada como consequência da liberação de prata. No caso da amostra P₃ não foi possível realizar a micrografia devido ao destacamento do filme.

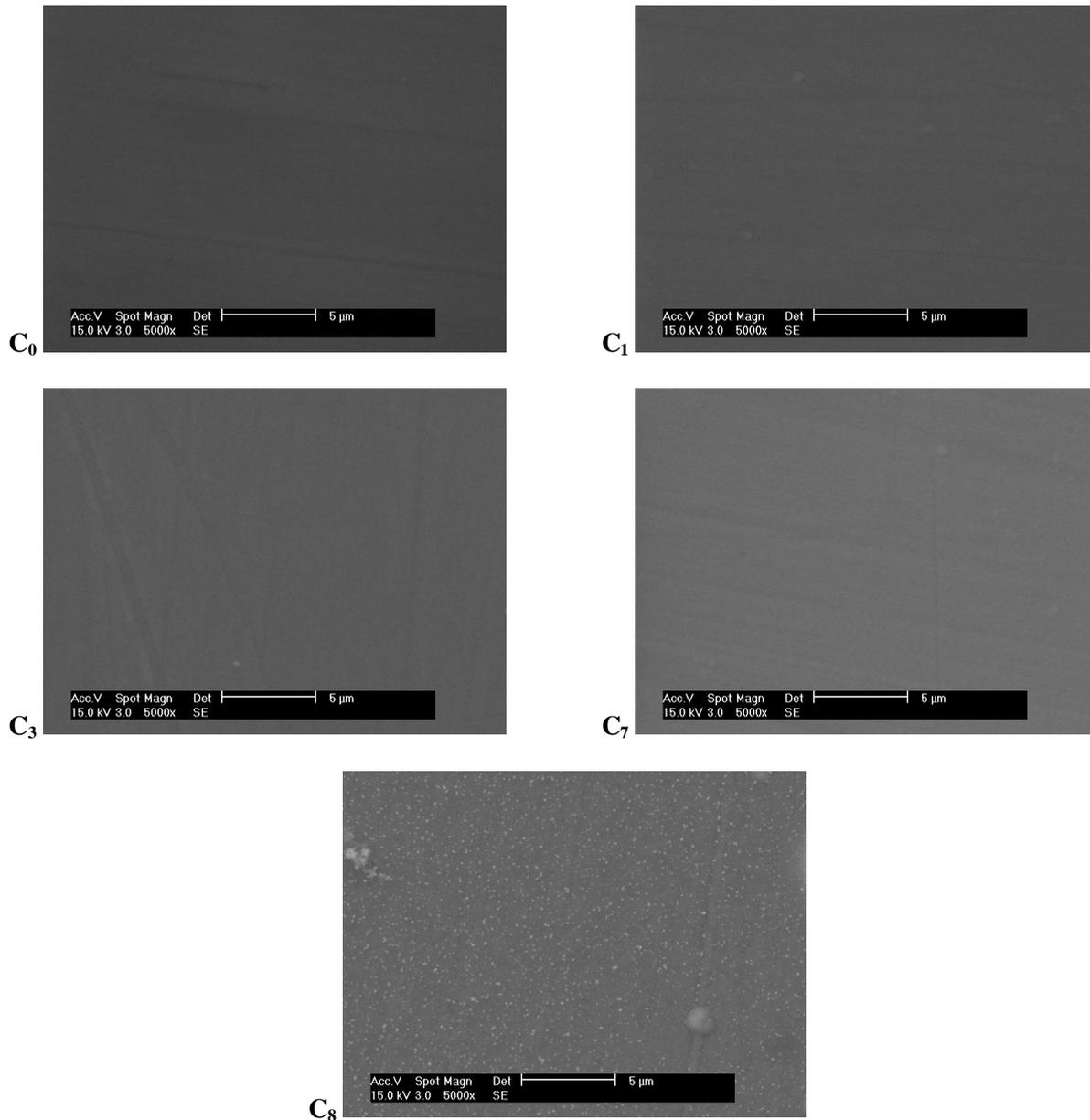


Figura 36 - Morfologia superficial dos filmes finos de compósito após imersão no líquido cefalorraquidiano artificial.

Quanto aos filmes do sistema cerâmico/polímero apenas a superfície do filme fino com maior teor de prata apresenta alguma alteração na sua morfologia/topografia superficial, indicando um possível decréscimo no teor de prata do filme fino. Deve ser referido que esta superfície é a de, todos os filmes finos depositados e caracterizados, a que apresenta um valor de ângulo de contacto estático mais baixo, cerca de 9°. Logo à partida a quase completa molhabilidade desta superfície assegura uma proximidade física com o fluido CFS que pode induzir uma maior facilidade na reacção química com as espécies iónicas da solução e conseqüente oxidação da prata e sua libertação.

3.6 Testes preliminares em cultura celular

Com a finalidade de estudar o crescimento de células do sistema nervoso, comparou-se o comportamento destas *in vitro* na caixa de teste, sobre uma amostra de silício micromaquinado polido e sobre uma amostra de silício micromaquinado com alguma rugosidade. A figura 37 ilustra o crescimento celular em condições normais.

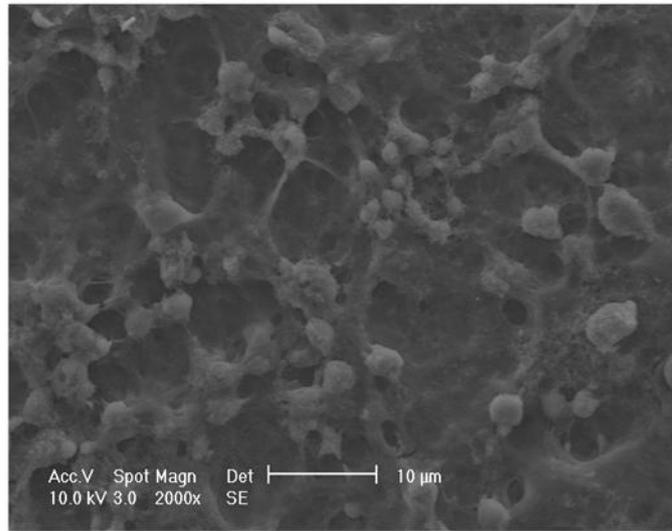


Figura 37 – Crescimento de células do sistema nervoso *in vitro* em caixa ‘multiwell’.

Como é evidente pela figura, em condições normais a presença de neurónios é abundante. Na figura 38 observa-se o comportamento destas mesmas células quando a superfície de crescimento é alterada.

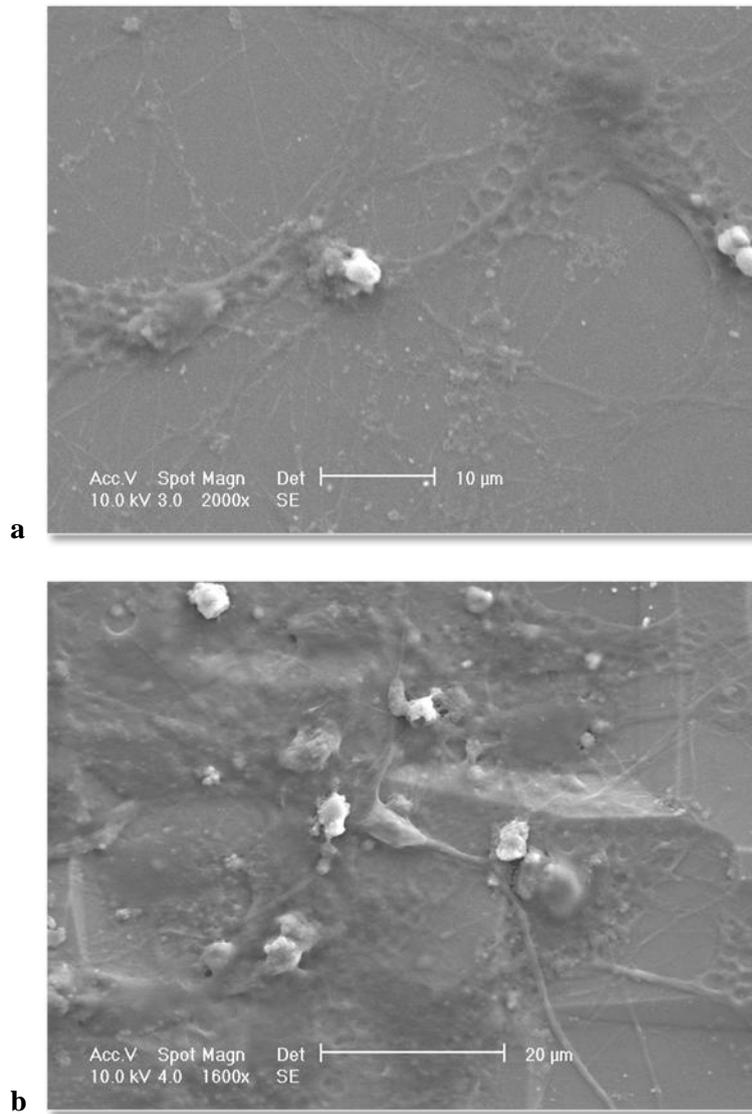


Figura 38 – Crescimento de células do sistema nervoso a) sobre amostra de silício micromaquinado polido e b) sobre uma amostra de silício micromaquinado com alguma microtopografia.

O crescimento celular é claramente dependente da topografia da superfície. Assim, nos testes *in vitro* sobre amostras de silício micromaquinado polido o crescimento do tecido neuronal é reduzido e é evidente a presença de apoptose (a branco na imagem). Os mesmos testes celulares em amostras de silício com alguma microtopografia e valores de rugosidade superiores à amostra anterior revelam que o número de células neuronais, bem como a interligação entre elas aumenta, evidenciando o efeito benéfico que apenas a topografia superficial pode induzir.

Conclusões

Do desenvolvimento do presente trabalho podemos concluir que:

- É possível depositar filmes finos densos e com excelente adesão ao substrato a partir de alvos, cerâmicos e poliméricos;
- A dopagem dos filmes finos de SiO₂ e PP com prata foi conseguida, com a condicionante de a quantidade de prata presente nos filmes finos não depender directamente da área das pastilhas dopantes;
- O teor de prata máximo incorporado em cada filme fino depende da composição química da matriz do filme que este metal dopa;
- A morfologia dos filmes finos apresenta-se como isenta de defeitos, de rugosidade (à escala observada) e sem morfologia aparente, logo bastante densos.
- A estrutura dos filmes finos evidencia que apenas a prata apresenta planos de difracção dando indicações que em qualquer um dos sistemas estudados, há uma estrutura compósita de matriz amorfa onde se encontram dispersos cristais de prata;
- A superfície dos filmes finos apresenta uma dispersão, mais ou menos homogénea, de grupos químicos funcionais física e quimicamente reactivos com a água, como é dado a entender pelos valores da histerese dos ângulos de contacto.
- Os testes de imersão em fluido cefalorraquidiano artificial mostraram que apenas em poucas superfícies ocorre libertação de prata para induzir um efeito antimicrobiano nestas superfícies.

Dadas as conclusões alcançadas neste trabalho, um dos objectivos, o de libertação da prata, não foi completamente atingido. Por este motivo, e como sugestão para trabalho futuro, podem ser considerados vários caminhos a desbravar com o intuito de solucionar estes problemas. Estes passam por induzir electroquimicamente, e num pré-estágio, uma libertação inicial que possa ser potenciadora de mais libertação. Outra abordagem passa por introduzir outro elemento metálico que possa, em conjunto com a prata, fazer um efeito galvânico e oxide a prata; o único elemento metálico que pode fazer este efeito é o ouro. A introdução deste outro elemento metálico pode ainda servir para, por imagiologia, observar a correcta ou incorrecta colocação dos implantes.

Referências Bibliográficas

1. HajjHassan M., Chodavarapu V., Musallam S. (2008) “NeuroMEMS: Neural Probe Microtechnologies” - *Sensors*, 8, 6704-6726.
2. Stroncek J.D., Reichert W.M.; “Overview of wound healing in different tissue types” in *Indwelling Neural Implants: strategies for contending with the in vivo environment*, Reichert W.M., Ed, CRC Press, Boca Raton, 2008.
3. <http://www.resumosgalois.com/?paged=3>, acessado em 27/02/2010.
4. Trentin J.A. (2008) “Produção de de domínios recombinantes de semaforina5B e identificação de seus Ligantes - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
5. Marin C., Fernández E. (2010) “Biocompatibility of intracortical microelectrodes: current status and future prospects” - *Front Neuroengineering* 28; 3:8.
6. Lemos K.R., Alessi A.C. (1999) “Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em sistema nervoso central de equinos normais e de equinos com leucoencefalomalácia” - *Pesq Vet Brás*, 19, 104-108.
7. Figueiredo C.M.S., Crispino A.F., Tinoco E.M.B (2003).” Níveis elevados de metaloproteinase da matriz-9 em sítios com destruição tecidual de pacientes com periodontite crônica generalizada” - *Rev Cien Med Biol*, 2(1), 40-47.
8. Cogan S.F. (2008) “Neural Stimulation and Recording Electrodes” - *Annu Ver Biomed Eng.* 10, 275-309.
9. Zhong Y., Bellamkonda R.V. (2008) “Biomaterials for the Central Nervous System” - *Journal of the Royal Society Interface*, 5,957.
10. Seymour J.P. (2009) “Advanced polymer-based microfabricated neural probes using biologically driven designs” – Universidade de Michigan.
11. Kim S., Bhandari R., Klein M., Negi S., Rieth L., Tathireddy P., Toepper M., Oppermann H., Solzbacher F. (2009) “Integrated wireless neural interface based on the Utah electrode array” *Biomed Microdevices.* 11(2), 453-66.
12. Abidian M.R., Martin D.C. (2009) " Multifunctional Nanobiomaterials for Neural Interfaces” - *Advanced Functional Materials*, 19, 4.
13. http://www.saltlakemetals.com/Silver_Antibacterial.htm, acessado em 29/10/2009.
14. Monteiro A.J.S.C. (2004) “Revestimentos multicamada pvd com comportamento electrocrômico” – Universidade do Minho, Braga.
15. Piedade A.P. (2001) “A pulverização catódica e os biomateriais” – Universidade de Coimbra, Coimbra.

- 16 Tavares C.J. (1997) “Caracterização estrutural e mecânica de multicamadas de TiN/ZrN depositadas por PVD” – Universidade de Aveiro e Universidade do Minho.
- 17 Alves J.C. (2001) ” Nitruração a Plasma: fundamentos e aplicações” – EDUFRN, Natal.
- 18 Arnell R.D, Kelly P.J. (1999) “Recent advances in magnetron sputtering” – Surface and Coatings Technology 112, 170-176.
- 19 http://www.ufv.br/dpf/mestrado/areas_epitaxial.html, acedido em 15/03/2010.
- 20 Tavares C.J. (2002) “Produção e caracterização de revestimentos nanoestruturados em multicamadas de TiAlN/Mo” – Universidade do Minho, Braga.
- 21 Cunha A.L.C.G. (2000) “Estudo dos mecanismos de degradação em revestimentos PVD baseados em nitretos metálicos no processamento de materiais plásticos” - Universidade do Minho, Braga.
- 22 http://probelab.geo.umn.edu/electron_microprobe.html, acedido em 3/11/2009.
- 23 Nunes B.M.F. (2008) “Funcionalização de superfícies de silício por radiação laser e implantação iónica: Estudo da molhabilidade” – Universidade de Lisboa, Lisboa.
- 24 Ribeiro E.M.F. (2003) “Preparação de revestimentos sobre superfícies tridimensionais” – Universidade do Minho, Braga.
- 25 Santos R.M. (2008) “Vidros cerâmicos nanocristalinos transparentes” - Universidade de Lisboa, Lisboa.
- 26 <http://fap.if.usp.br/~lff/ca.html>, acedido em 20/04/2010.
- 27 http://alfaconnection.net/pag_avsf/fqm0101.htm, acedido em 11/06/2010.
- 28 http://www.alzet.com/products/cfs_prep.php, acedido em 21/01/2010.
- 29 Cavaleiro, A. E Vieira M.T. (1995) “Textos de apoio às disciplinas de engenharia de superfícies e degradação e protecção de superfícies” – DEM, FCTUC, Coimbra.
- 30 Thorton, J.A. (1986) “The microstructure of sputter-deposit coatings” - Journal of Vacuum Science and Technology A, 4(6), 3059-3065.
- 31 Thorton, J.A. (1974) “Influence of the apparatus geometry and depositions conditions on the structure and topography of thick sputtered coatings” - Journal of Vacuum Science and Technology, 11(4), 666-670.
- 32 Bakaev, V.A. e Steele, W.A. (1999) “On the computer simulation of a hydrophobic vitreous silica surface” – Journal of Chemical Physics, 111(21), 9803-9812.

- 33 Serikawa, T. e Shirai, S. (1994) “Deposition characteristics and properties of SiO₂ films prepared by reactive sputtering in hydrogen, oxygen and nitrogen-argon mixtures” – Japanese Journal of Applied Physics, 33, 4465-4468.
- 34 Piedade AP, Vieira MT, Martins A e Silva F. (2006) “*In vitro* behavior of nanocrystalline silver-sputtered thin films” – Nanotechnology 18 (2007) 105103 (5pp)