

FILMES FINOS PARA SENSORES DE PRESSÃO EM PRÓTESES DE MEMBROS INFERIORES

DIÓXIDO DE TITÂNIO DOPADO COM PRATA



PEDRO MIGUEL FERNANDES DA FONSECA

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TESE SUBMETIDA PARA OBTENÇÃO DE GRAU
MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA (MSc)

SETEMBRO DE 2011

Constituição do Júri

Presidente:

Nome: Professor Doutor António Adriano Castanhola Batista

Categoria: Professor Auxiliar

Departamento: Departamento de Física

Orientadores:

Nome: Professora Doutora Cristina Maria Gonçalves dos Santos Louro

Categoria: Professor Auxiliar

Departamento: Departamento de Engenharia Mecânica

Nome: Professor Doutor José Filipe Vilela Vaz

Categoria: Professor Associado

Departamento: Departamento de Física da Universidade do Minho

Vogais:

Nome: Professor Doutor João Carlos Barbas de Oliveira

Categoria: Professor Auxiliar

Departamento: Departamento de Engenharia Mecânica

Nome: Professora Doutora Sandra Cristina Almeida Paiva

Categoria: Professor Auxiliar

Departamento: Departamento de Biologia da Universidade do Minho

Coimbra, 9 de Setembro de 2011

Aos meus pais e irmão

AGRADECIMENTOS

O trabalho de investigação realizado é o resultado da sinergia de professores, investigadores, auxiliares, colegas, amigos e família. Sem eles os objectivos não teriam sido alcançados. O meu imenso obrigado!

Institucionalmente, agradeço a todos os elementos que constituem o Centro de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra (CEMUP), o Departamento de Física e Departamento de Biologia da Universidade do Minho, pela disponibilização de recursos humanos e tecnológicos.

Aos meus orientadores, Professora Cristina Louro e Professor Filipe Vaz, expresso o meu profundo agradecimento pela oportunidade concedida, conhecimento e dinamismo transmitidos, pronta disponibilidade, e orientação dada. Foram incansáveis!

À Professora Andreia Gomes pela disponibilidade, orientação, e ajuda na discussão dos resultados dos ensaios citotóxicos.

À Professora Sandra Paiva pela ajuda prestada no decorrer dos ensaios microbiológicos.

À Teresa Matamá por toda a paciência, inteligência, conhecimento, disponibilidade e companheirismo demonstrado ao longo da minha estadia no Departamento de Biologia da Universidade do Minho! Muito obrigado “chefinha”!

AGRADECIMENTOS

À Carla Peixoto pela amizade e preciosa ajuda na execução laboratorial dos ensaios microbiológicos.

Ao Adão Ferreira pelos esclarecimentos e ajuda na produção dos revestimentos.

Ao Nélson, do Laboratório de Ensaio de Desgaste (LED) do Instituto Pedro Nunes (IPN), pela pronta disponibilidade na realização dos ensaios de difracção de raios-X.

Ao Professor João Carlos pela realização dos ensaios de microsonda electrónica e microscopia electrónica de varrimento no CEMUC.

Ao Evaristo pelo interesse demonstrado no projecto e pela ajuda realização dos ensaios de nanoindentação.

Ao Ricardo Serra do DEM pela disponibilidade demonstrada ao longo dos ensaios de AFM.

Ao Professor Albano Cavaleiro, na qualidade de *chairman* do grupo de Engenharia de Superfície do CEMUC, pelo apoio na obtenção dos meios experimentais.

À Professora Helena Gil e Patrícia Coimbra do DEQ pela concessão e acompanhamento durante a aquisição dos dados do ângulo de contacto.

Às colegas, Rita Costa e Sara Pinto, pela partilha de anseios, motivações, alegrias, ao longo deste semestre.

Aos amigos Vitor Tomé, André Cortez, Alberto Cortez, Roberto Lucas, Tiago Almeida, Rui Rolo e a todos os outros que me presentearam momentos de descontração e de convívio. Obrigado pelo afecto e preocupação demonstrados.

À Ana Magalhães pelo auxílio, compreensão, motivação e amizade ao longo dos últimos anos. Foste imprescindível!

Por fim, um agradecimento especial a todos os meus familiares, particularmente aos meus pais e irmão, por tudo o que me inculcaram durante a vida e que me fizeram ser o que sou! Apoio incondicional, carinho, dinamismo, perseverança, acreditar, esforço, preocupação são palavras a que corresponderam actos que me ajudaram a vencer as dificuldades.

A investigação foi financiada pelos fundos FEDER, através do programa COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade e por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, sob o título de projecto “PROTSENSOR – Um novo sistema de sensores em rede para medidas de pressão estática e dinâmica. Aplicação no mapeamento de pressões exercidas em membros amputados/próteses” – PTDC/CTM-NAN/112574/2009. O trabalho foi desenvolvido sob o regime de mobilidade interna Almeida Garrett, entre as Universidades de Coimbra e Minho

Um especial agradecimento às instituições citadas pelo apoio e disponibilização de recursos financeiros.

AGRADECIMENTOS

RESUMO

O crescente aumento de amputações, fundamentado no estilo de vida ocidental, aliado à elevada taxa de rejeição de próteses dos membros inferiores são os ingredientes promotores do presente trabalho. O desenvolvimento de uma rede de sensores que mapeie as pressões exercidas pela prótese no coto parece ser um das chaves do problema. Para tal, requer-se um sistema multicamadas constituído por materiais piezoeléctricos e/ou piezoresistivos, uma camada TiN condutora do sinal e uma camada isolante superficial, TiO_2 , que permita a não interferência de pontos de pressão e evite curto-circuito. Mais, a interface encaixe-coto é propícia ao desenvolvimento de microorganismos oportunistas e nesse sentido a escolha de prata, reconhecidamente bactericida, permite ainda moldar as propriedades mecânicas do TiO_2 tornando o material mais dúctil.

O presente estudo incidiu na produção de filmes finos de TiO_2 dopado com prata pela técnica pulverização catódica modo magnetron em atmosfera reactiva. Objectivou-se investigar cinco filmes com composições atómicas de prata compreendidas de 0 a 30%, no que concerne à avaliação das propriedades físico-químicas dos filmes como depositados e após tratamento térmico, e dos efeitos tóxicos quando em interacção com células eucarióticas e procariotas.

Os resultados demonstraram diferenças significativas a nível estrutural, morfológico, mecânico e biológico entre os filmes como depositados e após tratamento térmico. A presença de prata induziu a amorfização da matriz TiO_2 , crescimento do filme tipo Stranski-Krastanov e consequente microestrutura tipo 1 do diagrama de Thornton. Por efeito de coalescência houve formação de aglomerados de prata à superfície, que despoletaram o aumento da rugosidade e a diminuição da dureza. O tratamento térmico amplificou as propriedades referidas. Os filmes finos como depositados com composição de prata superior a 10% at. manifestaram toxicidade em células animais e procariotas.

Concluiu-se que o intervalo de composição de prata favorável será entre 0,1 e 12% at. de modo a actuar como agente bactericida e não afectar as células humanas. Paralelamente, dever-se-á realizar um estudo a incidir na composição de prata adequada para moldar as propriedades mecânicas do material, nomeadamente nanodureza, bem como na manutenção do carácter isolador do TiO_2 .

ABSTRACT

The increasing amount of amputations, based on lifestyle, coupled with high rejection of lower limb prostheses are the key ingredients for this work. The development of a sensor network that maps the exerted pressures by the prosthesis on the stump seems to be one of the solutions to the problem. For this purpose, it is required a multi-layered, composed by piezoelectric and/or piezoresistive materials, a conductive TiN layer signal and an insulating superficial layer, TiO_2 , that allows no interference from pressure points and avoids a short circuit. Furthermore, the fitting-stump interface is propitious to the development of microorganisms and, in this sense, the choice of silver, known as bactericide, will allow the molding of mechanical properties of TiO_2 , making the material more ductile.

The present study is focus on the production of TiO_2 thin films doped with silver by sputtering in reactive mode. Five films were obtained with silver content in the range of 0-30 at.%, besides the evaluation of physico-chemical properties of the films in as deposited state also thermal effect on the toxic affects when interacting with eukaryotic and prokaryotic cells were done.

The results showed significant differences at structural, morphological, mechanical and biological level, from as deposited and after annealing. The presence of silver induced amorphization of the TiO_2 matrix, Stranski-Krastanov film growth and consequently type 1 microstructure of Thornton diagram. By the effect of coalescence there was the formation of clusters of silver on the surface, which triggered the increase of roughness and a decrease of hardness. The annealing process amplified the mentioned properties. Thin films with a silver content above 10 at.% show high toxicity in animal and prokaryotes cells.

Finally, it can be conclude that the best of silver content must be between 0.1 and 12 at.%, in order to act as a bactericidal agent and does not affect human cells. In parallel, it should be conduct a study that will focus on the suitable silver composition for molding the material's mechanical properties, particularly nanohardness, as well as maintaining non-conductivity nature of the TiO_2 .

ABSTRACT

CONTEÚDO

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Siglas e Símbolos.....	xxiii
1. Introdução.....	1
1.1. Retrato Social das Pessoas Portadoras de Deficiência	1
1.2. Amputação de Membros Inferiores.....	3
1.2.1. Diabetes Mellitus e Arteriosclerose.....	3
1.2.2. Anatomia dos Membros Inferiores	4
1.2.3. Nível de Amputação.....	6
1.3. Próteses.....	6
1.3.1. Composição de uma Prótese Transfemoral.....	6
1.3.2. Problemas Associados	8
1.4. A solução e Objectivos do Projecto	9
2. Os Materiais	11
1.5. Os elementos: Oxigénio, Prata e Titânio	11
1.6. Dióxido de Titânio.....	13
1.6.1. Estrutura Cristalina.....	14
1.6.2. Modelo Löbl	16
3. Produção de revestimentos.....	17
1.7. Materiais	17
1.7.1. Substrato.....	17
1.7.2. Alvo.....	18

1.8.	Pulverização Catódica.....	18
1.8.1.	Princípio e Funcionamento	18
1.8.2.	Modo Magnetirão	20
1.8.3.	Modo Reactivo	21
1.8.4.	Microestrutura dos Filmes Finos.....	21
1.8.5.	Equipamento e Condições de Ensaio.....	23
1.9.	Tratamento Térmico	26
1.9.1.	Forno Eléctrico	26
4.	Métodos e Técnicas de Caracterização.....	29
4.1.	Técnicas Físicas.....	29
4.1.1.	Micro-Análise Sonda Electrónica	29
4.1.2.	Difracção Raios-X.....	31
4.1.3.	Microscopia Electrónica de Varrimento	33
4.1.4.	Microscopia de Força Atómica.....	36
4.1.5.	Nanoindentação	39
4.1.6.	Ângulo de Contacto	42
4.2.	Métodos de Caracterização Biológica.....	45
4.2.1.	Avaliação da Citotoxicidade	46
4.2.2.	Avaliação do Efeito Antimicrobiano	49
5.	Estudo da Influência do Teor de Prata nas Propriedades Físico-Químicas dos Filmes... 55	
5.1.	Composição Química	55
5.2.	Estrutura e Tamanho de Grão	59
5.3.	Morfologia e Tipo de Crescimento.....	62
5.4.	Rugosidade.....	65
5.5.	Dureza.....	68
5.6.	Molhabilidade.....	72
5.7.	Conclusões Parciais.....	74
6.	Estudo da Influência do Tratamento Térmico nas Propriedades Físico-Químicas dos Filmes	75
6.1.	A Temperatura de Recozimento.....	75
6.2.	Estrutura e Tamanho de Grão	80
6.3.	Morfologia	84
6.4.	Rugosidade.....	86
6.5.	Dureza.....	88
6.6.	Molhabilidade.....	89
6.7.	Conclusões Parciais.....	91

7. Estudo do Comportamento Biológico dos Filmes	93
7.1. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	94
7.1.1. Citotoxicidade por Contacto Indirecto	94
7.1.2. Citotoxicidade por Contacto Directo.....	99
7.2. Avaliação do Efeito Antimicrobiano	102
7.2.1. Taxa de Crescimento Específica	102
7.2.2. Halo de Inibição.....	106
7.3. Conclusões Parciais.....	110
8. Conclusões e Perspectivas Futuras	111
9. Bibliografia	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PERCENTAGEM DE INDIVÍDUOS COM DEFICIÊNCIA OU INCAPACIDADE SEGUNDO O TIPO DE ALTERAÇÕES NAS FUNÇÕES. AS ALTERAÇÕES NAS FUNÇÕES FÍSICAS CONTEMPLAM AS ALTERAÇÕES AO NÍVEL DAS FUNÇÕES DO APARELHO CARDIOVASCULAR, DO SISTEMA HEMATOLÓGICO E IMUNOLÓGICO, SISTEMA RESPIRATÓRIO, SISTEMA DIGESTIVO, METABÓLICO E ENDÓCRINO, FUNÇÕES GENITURINÁRIAS E REPRODUTIVAS, FUNÇÕES NEUROMUSCULARESQUELÉTICAS E RELACIONADAS COM O MOVIMENTO, PELE, PÊLOS E UNHAS BEM COMO ALTERAÇÕES EM MULTIFUNÇÕES FÍSICAS.	2
FIGURA 1.2: ESTRUTURA ÓSSEA DOS MEMBROS INFERIORES.	5
FIGURA 1.3: A) COMPONENTES DE UMA PRÓTESE TRANSFEMORAL: 1- PÉ PROTÉSICO; 2- JOELHO PROTÉSICO E TUBO DE LIGAÇÃO; 3- ADAPTADOR DE ENCAIXE E 4- ENCAIXE. QUANDO PRETENDIDO É ACRESCIDO O REVESTIMENTO COSMÉTICO. B) ENCAIXE QUADRILÁTERO; C) ENCAIXE ISQUIÁTICO; D) SUSPENSÃO COM CINTO ABAIXO DO OSSO PÉLVICO; E) SUSPENSÃO COM CINTO ACIMA DO OSSO PÉLVICO; F) SUSPENSÃO SUÇÃO.	8
FIGURA 2.1: DIAGRAMA DE FASES DE ÓXIDO DE TITÂNIO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E COMPOSIÇÃO RELATIVA O-Ti.	14
FIGURA 2.2: A) ARRANJO DO OCTAEDRO RELATIVAMENTE À CÉLULA UNITÁRIA. OS PARÂMETROS DE REDE PARA A ANATASE SÃO $a=3,7842\text{Å}$ E $c=9,5146\text{Å}$. PARA O RUTILO $a=4,5937\text{Å}$ E $c=2,9587\text{Å}$. [SPRINGER, 2004] B) DISPOSIÇÃO DOS IÕES NO OCTAEDRO [ADAPTADO - NALWA, 2004]. RUTILO (ESQUERDA) E ANATASE (DIREITA).	15
FIGURA 2.3: ESQUEMA QUE SALIENTA A DEPENDÊNCIA DA TEMPERATURA DO SUBSTRATO E DA ENERGIA DAS PARTÍCULAS NA FORMAÇÃO DAS FASES CRISTALINAS, PARA DIFERENTES TÉCNICAS DE DEPOSIÇÃO PVD.	16
FIGURA 3.1: DISTRIBUIÇÃO COSENO DE PARTÍCULAS EJECTADAS DO ALVO, EM FUNÇÃO DO ÂNGULO. EM FUNÇÃO DO ÂNGULO DA PARTÍCULA INCIDENTE OCORRERÁ A EJEÇÃO NUM DETERMINANDO ÂNGULO.	19
FIGURA 3.2: MAGNETRÃO E ALVO UTILIZADOS.	21
FIGURA 3.3: REPRESENTAÇÃO DOS EFEITOS SOMBRA, DIFUSÃO SUPERFICIAL E DIFUSÃO EM VOLUME E ESTRUTURA DO REVESTIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DEO SUBSTRATO E DA PRESSÃO DE DEPOSIÇÃO.	22
FIGURA 3.4: EQUIPAMENTO DE PRODUÇÃO DE REVESTIMENTOS - PULVERIZAÇÃO CATÓDICA - SITUADO NO CAMPUS AZURÉM, UNIVERSIDADE DO MINHO. (1) FONTE DE TENSÃO PARA ETCHING; (2) SISTEMA DE CONTROLO GERAL; (3) CONTROLADOR DE TEMPERATURA; (4) FONTE DE TENSÃO DC PARA OS ALVOS; (5) CÂMARA DE PRÉ-VÁCUO; (6) SISTEMA DE VÁCUO; (7) CÂMARA DE VÁCUO PRINCIPAL; (8) BOMBA TURBOMOLECULAR.	24
FIGURA 4.1: ESQUEMA DA INTERACÇÃO DE UM FEIXE DE ELECTRÕES COM UMA AMOSTRA. QUANDO A ESPESURA DA AMOSTRA É DEMASIADO FINA, VERIFICAM-SE OS ACONTECIMENTOS ILUSTRADOS ABAIXO DA AMOSTRA.	30
FIGURA 4.2: ESQUEMA DA LEI DE BRAGG.	32
FIGURA 4.3: ESPECTRO DE EMISSÃO DE ELECTRÕES.	35
FIGURA 4.4: MONTAGEM DO EQUIPAMENTO FEI QUANTA 400F SITUADO NA FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO.	36
FIGURA 4.5: ENERGIA DE INTERACÇÃO ENTRE DOIS ÁTOMOS EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA ENTRE ELES. AS FORÇAS REPULSIVAS REGEM-SE PELA EQUAÇÃO brn , SENDO B CARACTERÍSTICO DA SUBSTÂNCIA, R A DISTÂNCIA E N É VARIÁVEL MAS EM GERAL SUPERIOR A 6. AS FORÇAS ATRACTIVAS SÃO DESCRITAS PELA RAZÃO $-ar6$. DADO QUE N É, GERALMENTE,	

SUPERIOR A 6, AS FORÇAS DE REPULSÃO SÓ SE TORNAM RELEVANTES PARA DISTÂNCIAS INTERATÓMICAS MUITO PEQUENAS.	37
FIGURA 4.6: EQUIPAMENTO VEECO DI INNOVA PERTENCENTE AO CENTRO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA.	39
FIGURA 4.7: CURVA DE TENSÃO - DESLOCAMENTO EVIDENCIANDO MEDIDAS IMPORTANTES PARA OS CÁLCULOS PRETENDIDOS. P_{MAX} REFERE-SE À CARGA MÁXIMA, H_{MAX} É A PROFUNDIDADE MÁXIMA, S O DECLIVE DA TANGENTE À CURVA DE DESCARGA E H_F PROFUNDIDADE DE CONTACTO RESIDUAL RELACIONADA COMO A DEFORMAÇÃO PLÁSTICA QUE PERMANECE APÓS O RECUO DO INDENTADOR.	40
FIGURA 4.8: PARÂMETROS RELACIONADOS COM A GEOMETRIA DE INDENTAÇÃO, DURANTE O PROCESSO DE DESCARGA.	42
FIGURA 4.9: ÂNGULO DE CONTACTO E TENSÕES SUPERFICIAIS.	44
FIGURA 4.10: AMOSTRA DOS MATERIAIS A TESTAR. TiO_2 , Ag_1 , Ag_2 , Ag_3 E Ag_4 EM SUBSTRATO VIDRO (ESQUERDA PARA A DIREITA EM CIMA), EM BAIXO O MESMO MATERIAL APÓS TRATAMENTO TÉRMICO.	47
FIGURA 5.1: RAZÃO ATÓMICA O/Ti E $O/Ti+Ag$ EM FUNÇÃO DO TEOR DE Ag	57
FIGURA 5.2: VARIAÇÃO DO TEOR DE PRATA EM FUNÇÃO DA RAZÃO DAS ÁREAS DE PRATA E TITÂNIO. O AJUSTE LINEAR AOS TRÊS ÚLTIMOS PONTOS DA RECTA FORNECEU UM COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO $R=0,986$	58
FIGURA 5.3: DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DOS DIFERENTES REVESTIMENTOS COMO DEPOSITADOS, OBTIDOS EM MODO RASANTE.	59
FIGURA 5.4: DESCONVOLUÇÃO DA BOSSA AMORFIZADA NO REVESTIMENTO Ag_3	61
FIGURA 5.5: MICROGRAFIAS DA SECÇÃO TRANSVERSAL DOS FILMES, TiO_2 E Ag_1 , POSIÇÃO ESQUERDA E DIREITA RESPECTIVAMENTE.	63
FIGURA 5.6: MICROGRAFIAS DOS REVESTIMENTOS Ag_2 E Ag_3 , EM SECÇÃO TRANSVERSAL.	64
FIGURA 5.7: MICROGRAFIAS DO REVESTIMENTO Ag_4 , OBTIDAS PELO MODO ELECTRÕES SECUNDÁRIOS E ELECTRÕES RETRODIFUNDIDOS.	65
FIGURA 5.8: IMAGENS A 3D E 2D DA SUPERFÍCIE DOS REVESTIMENTOS COMO DEPOSITADOS, OBTIDAS POR AFM.	66
FIGURA 5.9: RELAÇÃO ENTRE A RUGOSIDADE MÉDIA E TAXA DE DEPOSIÇÃO COM O TEOR DE PRATA NOS REVESTIMENTOS.	67
FIGURA 5.10: EVOLUÇÃO DA NANODUREZA E ESPESSURA PARA OS DIFERENTES FILMES.	70
FIGURA 5.11: EFEITO DO TAMANHO DE GRÃO NO VALOR DA DUREZA.	71
FIGURA 5.12: RELAÇÃO DA RUGOSIDADE MÉDIA COM O ÂNGULO DE CONTACTO PARA OS FILMES COM PRATA.	73
FIGURA 6.1: DIFRATOGRAMA, HTXRD, DE UM FILME DE TiO_2 , COM AUMENTO GRADUAL DE $100^\circ C$, COM INÍCIO À TEMPERATURA AMBIENTE E TÉRMINO A $700^\circ C$ (DIFRATOGRAMA MAIS PRÓXIMO). A IMAGEM INFERIOR REFERE-SE AOS DIFRATOGRAMAS A 400 E $700^\circ C$	77
FIGURA 6.2: DIFRATOGRAMAS OBTIDOS POR HTXRD PARA A AMOSTRA DE TiO_2 DOPADO COM Ag , COM TEMPERATURA INICIAL A $27^\circ C$ E AUMENTO GRADUAL DE $100^\circ C$ ATÉ ATINGIR OS $700^\circ C$. O ÚLTIMO PASSO É DE $50^\circ C$. A IMAGEM DO LADO DIREITO MOSTRA A EVOLUÇÃO ESTRUTURAL COM A TEMPERATURA.	79
FIGURA 6.3: DIFRATOGRAMA DOS REVESTIMENTOS APÓS TRATAMENTO TÉRMICO A $500^\circ C$	81
FIGURA 6.4: PADRÃO DE INDEXAÇÃO DA ANATASE E RUTILO NOS FILMES TiO_2 E Ag_2 APÓS TT.	81
FIGURA 6.5: EVOLUÇÃO DO TAMANHO DE GRÃO DA ANATASE EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO PARA OS DIFERENTES FILMES.	83
FIGURA 6.6: EVOLUÇÃO DO TAMANHO DE GRÃO DA Ag EM FUNÇÃO DO TRATAMENTO TÉRMICO. O CÁLCULO FOI REALIZADO PELA FÓRMULA DE SCHERRER, ATRAVÉS DO PICO DE MAIOR INTENSIDADE (111).	84
FIGURA 6.7: MICROGRAFIAS DE SECÇÃO TRANSVERSAL DOS REVESTIMENTOS TiO_2 E Ag_1 APÓS TT.	85
FIGURA 6.8: MICROGRAFIAS DOS REVESTIMENTOS Ag_2 E Ag_3 APÓS TT.	85
FIGURA 6.9: MICROGRAFIAS DO REVESTIMENTO Ag_4 EM SECÇÃO TRANSVERSAL, EM MODO ELECTRÕES SECUNDÁRIOS E ELECTRÕES RETRODIFUNDIDOS RESPECTIVAMENTE.	86
FIGURA 6.10: IMAGENS TOPOGRÁFICAS 3D DOS REVESTIMENTOS TiO_2 E Ag_2 APÓS TT, RESPECTIVAMENTE.	87
FIGURA 6.11: RELAÇÃO ENTRE O TEOR EM PRATA E A NANODUREZA PARA OS FILMES COM E SEM TT.	89
FIGURA 6.12: TENSÃO DE ADESÃO DOS REVESTIMENTOS ANTES A APÓS TT.	91
FIGURA 7.1: VIABILIDADE CELULAR RELATIVA DAS CÉLULAS MEF's APÓS CONTACTO COM MEIO CONDICIONADO DURANTE 1 DIA COM OS REVESTIMENTOS. DADOS DO TESTE ANOVA (GRAPH PAD PRISM) COM 95% DE CONFIANÇA REVELAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE: O TiO_2 E Ag_2 , Ag_3 E DMSO; O TiO_2 TT E Ag_2 , Ag_3 , DMSO; O Ag_1 E Ag_2 , Ag_3 . PARA ALGUNS TEMPOS EXISTEM ALGUMAS DIFERENÇAS.	95
FIGURA 7.2: IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA, PARA UMA AMPLIAÇÃO 100 X.	96
FIGURA 7.3: VIABILIDADE CELULAR RELATIVA DAS CÉLULAS MEF's APÓS CONTACTO COM O MEIO CONDICIONADO DURANTE 5 DIAS COM OS REVESTIMENTOS. OS REVESTIMENTOS Ag_4 E Ag_4 TT NÃO FORAM TESTADOS POR LIMITAÇÕES TÉCNICAS. OS RESULTADOS ESTATÍSTICOS REVELAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE: O TiO_2 E Ag_2 , Ag_3 , DMSO; O TiO_2 TT E Ag_2 , Ag_3 , DMSO; O Ag_1 E Ag_2 , Ag_3 , DMSO; O Ag_2 E Ag_2 TT; O Ag_3 E Ag_3 TT; O Ag_2 TT E DMSO.	97

FIGURA 7.4: VIABILIDADE CELULAR RELATIVA DAS CÉLULAS BJ5TA APÓS O CONTACTO COM OS DIFERENTES REVESTIMENTOS. EXISTEM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE: O TiO_2 E Ag1, Ag2, Ag3, Ag4, Ag1 TT, Ag2 TT, Ag3 TT, Ag4 TT, DMSO; O Ag1 E Ag2, Ag3, Ag4, Ag2 TT, Ag3 TT, Ag4 TT, DMSO; O Ag1 TT E Ag2 TT, Ag3 TT, Ag4 TT, DMSO.....	99
FIGURA 7.5: IMAGENS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA, PARA UMA AMPLIFICAÇÃO 100 X, PARA CONTACTO DIRECTO 48 H.	100
FIGURA 7.6: TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICA DA <i>E. COLI</i> QUANDO EM CONTACTO COM MEIO CONDICIONADO DE DIFERENTES REVESTIMENTOS.	102
FIGURA 7.7: TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICA RELATIVA DO AUREUS QUANDO EM CONTACTO COM MEIO CONDICIONADO DE DIFERENTES REVESTIMENTOS.	103
FIGURA 7.8: TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICA DA <i>C. ALBICANS</i> QUANDO EM CONTACTO COM MEIO CONDICIONADO DE DIFERENTES REVESTIMENTOS.	103
FIGURA 7.9: CURVAS DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA <i>E. COLI</i> QUANDO EXPOSTA A MEIOS CONDICIONADOS COM OS REVESTIMENTOS.....	105
FIGURA 7.10: CURVAS DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA <i>S. AUREUS</i> QUANDO EXPOSTA A MEIOS CONDICIONADOS COM OS REVESTIMENTOS.....	106
FIGURA 7.11: RESULTADOS DOS TESTES QUALITATIVOS PARA OS DIFERENTES REVESTIMENTOS E MICROORGANISMOS.	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. PROPRIEDADES QUÍMICAS, FÍSICAS E TERMODINÂMICAS DOS ELEMENTOS O, AG E TI.....	13
TABELA 3.1. ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DOS MATERIAIS UTILIZADOS COMO SUBSTRATOS. OS DADOS RELATIVOS AO VIDRO CONSTAM DE UMA FICHA DE PRODUTO ENVIADA ELECTRONICAMENTE.....	18
TABELA 3.2. VALORES DOS PARÂMETROS DE DEPOSIÇÃO.	25
TABELA 3.3. VALORES DOS PARÂMETROS DE PRÉ-PULVERIZAÇÃO (“ <i>ETCHING</i> ”)......	25
TABELA 4.1. CLASSIFICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO EM FUNÇÃO DA INFORMAÇÃO ADQUIRIDA.....	29
TABELA 4.2. CONDIÇÕES HABITUAIS DE CULTURA EM MEIO LÍQUIDO OU SÓLIDO, PARA OS MICROORGANISMOS ESTUDADOS.	51
TABELA 5.1. COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DOS REVESTIMENTOS, E RESPECTIVA ESPESSURA E TAXA DE DEPOSIÇÃO.	56
TABELA 5.2. VALORES DE RUGOSIDADE MÉDIA E ÁREA REAL OBTIDOS COM O PROGRAMA GWYDDION, PARA ANÁLISES 10 MM ²	68
TABELA 5.3. PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS DIFERENTES REVESTIMENTOS COMO DEPOSITADOS.	69
TABELA 6.1: VALORES DE PARÂMETROS AVALIADORES DA RUGOSIDADE DAS SUPERFÍCIES TiO ₂ E Ag ₂ , COMO DEPOSITADOS E APÓS TT.	87
TABELA 6.2: PROPRIEDADES MECÂNICAS DOS REVESTIMENTOS APÓS TT.	88
TABELA 7.1. PROPRIEDADES PASSÍVEIS DE INFLUENCIAR O COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS REVESTIMENTOS. O TAMANHO DOS AGLOMERADOS FOI INFERIDO POR AFM E SEM; “*” SIGNIFICA MESMA COMPOSIÇÃO DOS REVESTIMENTOS COMO DEPOSITADOS; “-” FALTA DE DADOS OU INFORMAÇÃO NÃO VÁLIDA.....	94

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AFM – Microscopia Força Atómica
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ATCC – American Type Culture Collection
ATP – Adenosina Tri-Fosfato
Aureus – Staphylococcus Aureus
BJ5TA – Fibroblastos de Pele Humana
CVD – Deposição Química por Fase Vapor
C.albicans – Candida albicans
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DO – Densidade Óptica
E.coli – Escherichia coli
EPMA – Micro-Análise por Sonda Electrónica
HTXRD – Difraccção de Raios-X a Quente
ICDD – Centro de Dados de Difraccção
ISO – Organização Internacional de Normalização
MEF's – Fibroblastos Embrionários de Ratinho
NP's - Nanopartículas
PC – Pulverização Catódica
PVD – Deposição Física por Fase Vapor
SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento
TT – Tratamento Térmico
TiO₂ – Dióxido de Titânio
XRD – Difraccção de Raios-X

Θ – Ângulo

R_a – Rugosidade Média

R_q – Rugosidade Quadrática Média

S_k – *Kurtosis*

S_{sk} - *Skewness*

Ag1 – Dióxido de Titânio dopado com percentagem de prata residual

Ag2 – Dióxido de Titânio dopado com 12% atômica de prata

Ag3 – Dióxido de Titânio dopado com 22% atômica de prata

Ag4 – Dióxido de Titânio dopado com 27% atômica de prata

D_g – Tamanho de Grão

1. INTRODUÇÃO

No mundo ocidental assiste-se a um crescente número de amputações motivadas por problemas vasculares, fundamentados em hábitos sociais pouco saudáveis.

Apesar de ser necessário dar mais ênfase a campanhas profiláticas, estas muitas vezes são incompatíveis com a sociedade de consumo e nesse sentido, após a consumação da amputação é fundamental assegurar um nível de qualidade de vida digno ao paciente. A melhoria da prótese, nomeadamente o conforto, é sem dúvida um dos grandes passos a dar.

1.1. RETRATO SOCIAL DAS PESSOAS PORTADORAS DE DEFICIÊNCIA

A história das pessoas com deficiência e incapacidade é um capítulo integrante da história das desigualdades sociais (Sousa *et al.*, 2007). Desde a Antiguidade Grega e Romana ao nazismo, assistiu-se a práticas segregacionistas que tenderam a eliminar seres humanos com base no culto da perfeição cultural e na suposta soberania da raça ariana, respectivamente. Felizmente, a evolução económica e social permitiu o término de muitas dessas práticas, colocando-se hoje em dia na sociedade ocidental a integração social dessas pessoas. Estudos revelam que a nível etário, verifica-se um aumento crescente das pessoas com deficiência ou incapacidade com o aumento da idade, atingindo o máximo no escalão etário 65-70 anos. Relativamente ao tipo de alterações nas funções, pode-se constatar da figura 1.1, que as funções físicas são as que revelam uma maior expressão, notando-se uma relação directa com a idade. De notar que 48,4% das alterações físicas são respeitantes à condição de mobilidade (Sousa *et al.*, 2007).

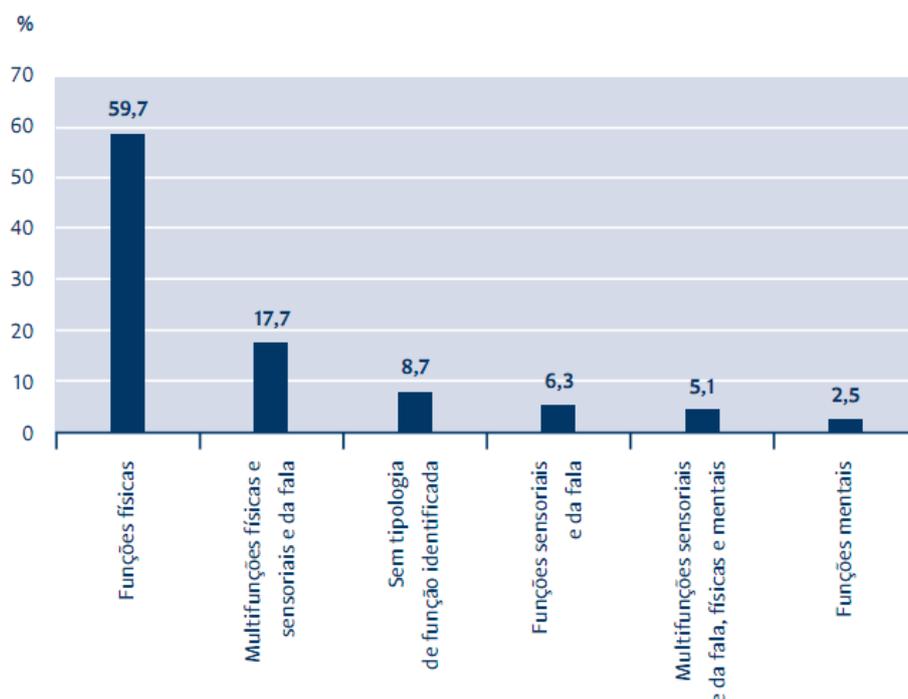


Figura 1.1: Representação gráfica da percentagem de indivíduos com deficiência ou incapacidade segundo o tipo de alterações nas funções. As alterações nas funções físicas contemplam as alterações ao nível das funções do aparelho cardiovascular, do sistema hematológico e imunológico, sistema respiratório, sistema digestivo, metabólico e endócrino, funções geniturinárias e reprodutivas, funções neuromuscularesqueléticas e relacionadas com o movimento, pele, pêlos e unhas bem como alterações em multifunções físicas.

(Fonte: Sousa *et al.*, 2007).

Com o aumento da esperança média de vida assiste-se a cada vez mais à preocupação de natureza social, económica e financeira por parte do Estado e das famílias com estas pessoas, sendo a qualidade de vida um parâmetro relevante e ligante das vertentes referidas.

O grupo especialista da organização mundial da saúde, WHOQOL¹, define qualidade de vida: “percepção biológica do indivíduo acerca da sua posição na vida, de acordo com o contexto cultural e os sistemas de valores nos quais vive, sendo o resultado da interacção entre os seus objectivos e expectativas e os indicadores objectivos disponíveis no seu ambiente social e cultural” (Skevington *et al.*, 2004).

A definição sendo esclarecedora, promove o debate e o caminho a percorrer na inserção social destas pessoas. Se ao nível de alteração da mentalidade individual e colectiva é complicado no imediato, também é verdade que apenas e só a promoção de igualdade, ao nível de reabilitação física, extinção de barreiras arquitectónicas, acesso ao mercado de trabalho, à qualificação profissional, à escolarização, fornecendo sinais claros de apoios estatais e comunitários, se consegue alterar o preconceito e a desigualdade.

¹ Organização Mundial de Saúde para a Qualidade de Vida

1.2. AMPUTAÇÃO DE MEMBROS INFERIORES

Amputação, etimologicamente, deriva do latim: *ambi* – ao redor de/ em volta de – e *putatio* – podar/retirar, e define-se como a retirada total ou parcial de uma parte do corpo, a maioria das vezes de um membro e geralmente através de cirurgia.

As causas de amputação têm diversas origens: doenças, traumas e deficiências congénitas (7, 2011). Os traumas decorrem maioritariamente de acidentes de viação e industriais, que em conjunto com as deficiências congénitas somam cerca de 26% do total mundial de amputações (10, 2011) (Riele, 2003). As doenças podem ser de cariz vascular, neoplasias e infecções. Salienta-se o facto das doenças vasculares causarem 70% das amputações mundiais (10, 2011). As doenças vasculares têm como principais factores agravantes a diabetes mellitus e a arteriosclerose (Gan, 2006) (11, 2011). Neste campo medidas profilácticas são essenciais.

1.2.1. DIABETES MELLITUS E ARTERIOSCLEROSE

A diabetes mellitus é uma doença crónica de origem metabólica, caracterizada por hiperglicémia devido a uma deficiente ou ausência de secreção e/ou acção da insulina, potenciadora de complicações micro e macrovasculares, neurológicas, extremando-se na disfunção e falência de vários órgãos (Paiva, 2001; Correia, 2010).

A Associação Americana da Diabetes (ADA), classifica a doença em quatro categorias: tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos específicos. A diabetes tipo 1 e 2 são as mais frequentes, ocorrendo a primeira devido à destruição auto-imune das células produtoras de insulina e a segunda pela diminuição da acção da insulina baseado na resistência do organismo à hormona. Ao longo dos anos efectiva-se as complicações associadas à doença, podendo desenvolver-se complicações em diversos órgãos, como por exemplo retinopatia, nefropatia, neuropatia, entre outras.

Na neuropatia diabética, surgem lesões nos nervos autonómicos, sensitivos e motores devido directa e indirectamente à hiperglicémia. As lesões nos nervos autonómicos conduzem ao aparecimento de macerações e de descontinuidades na pele pela perda da capacidade vasoconstritora dos capilares. As lesões nos nervos sensitivos têm como consequência a perda progressiva da sensibilidade dos membros inferiores, aumentando o risco de ulcerações e amputações. Por último, atrofias musculares e alterações do padrão de marcha são consequências de alterações nos nervos motores (Seeley, 2005).

A problemática da doença está bem patente nos números. Segundo a Federação Internacional da Diabetes existirão em 2025 cerca de 380 milhões de diabéticos no mundo, contribuição dada em grande parte pelo estilo de vida baseado numa alimentação

desequilibrada e práticas sedentárias. Dados de 2009, estimam a existência de 1 milhão de diabéticos em Portugal (Correia, 2010; Gan, 2006).

A arteriosclerose é uma doença caracterizada pela alteração da elasticidade e espessura das artérias. Esta alteração é consequência da deposição de substâncias lipídicas ricas em colesterol, que mais tarde pode ser substituída por tecido conjuntivo denso e depósitos de cálcio. O espessamento e as alterações químicas verificadas tornam a túnica menos elástica que em conjunto dificultam a passagem do sangue. No local onde esse depósito ocorre, designado por placa, podem-se formar coágulos de sangue que ao desprenderem-se podem causar embolias arteriais. As consequências destas alterações são o aumento do trabalho cardíaco e da possibilidade de ocorrência de trombozes, bem como nas partes de baixa ou nula irrigação a isquémia, claudicação e em casos extremos a necrose com gangrena (Seeley, 2005).

A combinação das complicações associadas à diabetes, arteriosclerose e susceptibilidade a infecções predispõe o aparecimento de lesões nos pés. Quando existe pelo menos uma lesão com perda da descontinuidade da pele designa-se por pé diabético. O pé diabético é o principal factor de risco de amputação das extremidades. De notar que a cada 30 segundos ocorre uma amputação no mundo devido à diabetes (5, 2011).

1.2.2. ANATOMIA DOS MEMBROS INFERIORES

Os membros inferiores que suportam e estabilizam o tronco, são constituídos pela cintura pélvica, coxa, perna e pé. A cintura pélvica é uma base circular estável que sustenta o tronco e forma um local de fixação para os membros inferiores. É constituída pelo sacro, formado por cinco vértebras sagradas, e pelos ilíacos. Cada ilíaco é formado na sua origem pelos ílio, ísquio e púbis que se fundem tornando-se num único osso no adulto. O ilíaco estreita-se até à região média do acetábulo, onde se articula com o fémur. O ísquio é um local de inserção de inúmeros músculos sobre os quais a pessoa se senta (Seeley, 2005). No total, a cintura pélvica é formada por três articulações, duas articulações sacro-ilíacas, tipo sinovial, que unem o sacro a cada ilíaco, e a sínfise púbica que une anteriormente os ossos ilíacos (Kapandji, 1990).

A coxa é a parte do membro inferior situada entre a área da nádega e o joelho, e contém um único osso, o fémur. Este tem uma cabeça arredondada que é articulada com o acetábulo do ilíaco, e um colo fazendo um ângulo significativo com o corpo do fémur. Na parte proximal salientam-se o grande e o pequeno trocânter onde se inserem importantes grupos musculares, nomeadamente os ligamentos iliofemural e redondo. A extremidade distal do fémur apresenta os côndilos interno e externo que articulam com a tíbia. A articulação coxo-femural, tipo esferóide, permite movimentos em três eixos, tendo a função de orientar

especialmente o membro inferior (Kapandji, 1990). O joelho é formado pelas articulações fêmuro-tibial e fêmuro-rotuliana, ambas tipo sinovial, que permitem a flexão, extensão e uma pequena rotação da perna (Seeley, 2005). A rótula localiza-se à frente do joelho e liga o músculo quadricípete fémural à tibia através do tendão rotuliano. Além do tendão referido, os ligamentos do joelho, cruzado anterior e cruzado posterior, estabilizam a articulação impedindo os movimentos de deslocação anterior e posterior da tibia em relação ao fémur (Seeley, 2005).

Entre o joelho e o tornozelo encontram-se a tibia e o perônio, ligados pela articulação tíbio-társica. Esta articulação é indispensável à marcha e suporta o peso corporal, permitindo movimentos de flexão, extensão e inversão (Seeley, 2005).

O pé é constituído por 26 ossos, setes ossos do tarso (tálus, calcâneo, cubóide e os três cuneiformes, o lateral, o intermédio e o medial), cinco ossos do metatarso e quatorze falanges (três para cada dedo, à excepção do hálux, que tem apenas duas). Possui numerosas articulações, a saber: astrágalo-calcaneana, médio-társica (Chopart), tarso-metatarsiana (Lisfranc), escafo-cuboidea, metatarso-falângicas e metatarso-interfalângicas (Kapandji, 1990).



Figura 1.2: Estrutura óssea dos membros inferiores.

1.2.3. NÍVEL DE AMPUTAÇÃO

O nível de amputação é definido consoante a situação clínica do paciente, fundamentando-se a escolha na eliminação do tecido necrótico e conseqüente dor, eliminação do foco infeccioso e a obtenção de um coto funcional (Gabriel, 2001). Apesar de ser conjectural, é reconhecido que para uma boa protetização, o nível ideal de amputação para os ossos longos, fémur e tibia, situa-se no terço médio da diáfise óssea devido aos tecidos moles possuírem maior elasticidade e portanto proporcionando maior “almofadamento” (Gabriel, 2001).

Pela importância das articulações, a amputação deve ser realizada o mais distante destas quer a nível proximal quer distal. Esta consideração baseia-se no maior abaulamento ósseo junto a metafises, à dissipação de massa muscular, ganho de elasticidade dos tecidos, facilidade de colocação e remoção da prótese e ao menor gasto energético durante a marcha (Gabriel, 2001; 6, 2011). A regra geral é a maior conservação da extremidade.

Quanto à classificação, os níveis de amputação são designados de acordo com o local da cirurgia, a saber: hemipelvectomy, desarticulação da anca, transfemural, desarticulação do joelho, transtibial, desarticulação do tornozelo, Syme (entre a tibia e o perónio) e parcial do pé (7, 2011). Os dois níveis de amputação de membros inferiores mais realizados são o transtibial (56%) e o transfemural (37%) (7, 2011).

1.3. PRÓTESES

As partes do corpo humano traduzem uma organização mecânica e fisiológica ideal que potencia ao ser humano a capacidade de desenvolver diversas actividades no dia-a-dia. A prótese surge como um dispositivo capaz de repor a mobilidade, “adaptando-se” ao paciente, em forma e tamanho. Objectivamente, a mimificação deve ser confortável, funcional e esteticamente agradável. No design deve-se ter em conta a saúde do paciente, o peso, o nível de actividade, o comprimento e a forma do membro residual (coto), a condição da pele, a circulação e o ambiente onde se insere. A ISPO² e a norma ISO-10328 regulam os testes a que as próteses devem ser sujeitas para garantir qualidade.

1.3.1. COMPOSIÇÃO DE UMA PRÓTESE TRANSFEMORAL

O presente estudo não diferencia o nível de amputação e a respectiva prótese. Neste sentido, fazer-se-á a título de exemplo a descrição de uma prótese transfemoral.

² Sociedade Internacional de Próteses e Orteses

Uma prótese transfemoral é um dispositivo médico concebido por medida (decreto de lei 35/2009) composto por (7, 2011):

- Componente de contacto com o coto ou interface, denominado encaixe;
- Estrutura de ligação entre os diversos componentes (tubos e adaptadores);
- Componentes funcionais como articulações de joelho e pé;
- Componentes de apoio à suspensão.

O encaixe é efectuado à medida do coto, minimizando-se o seu volume de modo a proporcionar uma pressão negativa entre o coto e o encaixe. O design pode ser concebido com o intuito de distribuir as forças uniformemente ao longo do coto ou de forma diferenciada. Os dois encaixes mais utilizados são o encaixe quadrilátero, figura 1.3.b., e o encaixe isquiático, figura 1.3.c. Diferenciam-se pela distribuição de forças, no quadrilátero o peso é sustentado no osso isquíu ou no osso das nádegas e há um estreitamento da frente para trás. Enquanto no encaixe isquiático, o isquíu e o osso das nádegas são inseridos no encaixe (7, 2011).

A produção desta componente pode ser por laminagem recorrendo usualmente a resina acrílica com metacrilato reforçado com nylon, vidro, carbono, etc. O outro processo recorre a um sistema de sucção para moldar as formas sobre o molde de gesso. Neste utilizam-se termoplásticos, tais como o polipropileno.

Os tubos e adaptadores fornecem a coerência mecânica ao sistema. Os materiais mais frequentemente utilizados são metais, madeira e plástico devido à durabilidade que apresentam.

O joelho protésico funciona como a dobradiça da prótese, tal como o joelho humano. Por esse motivo é fundamental para a mobilidade e estabilidade do paciente. A estabilidade da articulação é influenciada por diversos factores tais como o tipo de articulação, o alinhamento da prótese e a força que é exercida no coto. Por estes motivos, há a possibilidade de escolha de próteses sem joelho protésico, por questões de segurança.

Relativamente á suspensão, podem-se enumerar dois mecanismos: cinto ou sucção. As suspensões por sucção têm a vantagem de proporcionar maior liberdade de movimento, sendo por isso utilizadas por jovens ou pessoas activas. Contudo, estas suspensões exigem que o encaixe esteja em contacto directo com a pele, não usando meias protésicas. O mecanismo de sucção é activado por uma válvula existente no fundo do encaixe, controlada pelo paciente, que cria pressão negativa dentro do encaixe. A desvantagem deste tipo de suspensão é o controlo do peso que tem que existir, não podendo o paciente ultrapassar mais de 5 Kg do peso aquando da concepção. A alternativa é o uso de suspensões com cinto. Estas suspensões dividem-se em duas consoante onde se coloca o cinto: abaixo ou

acima do osso pélvico. Esta última é indicada para pacientes com coto reduzido e/ou musculatura da anca fraca.

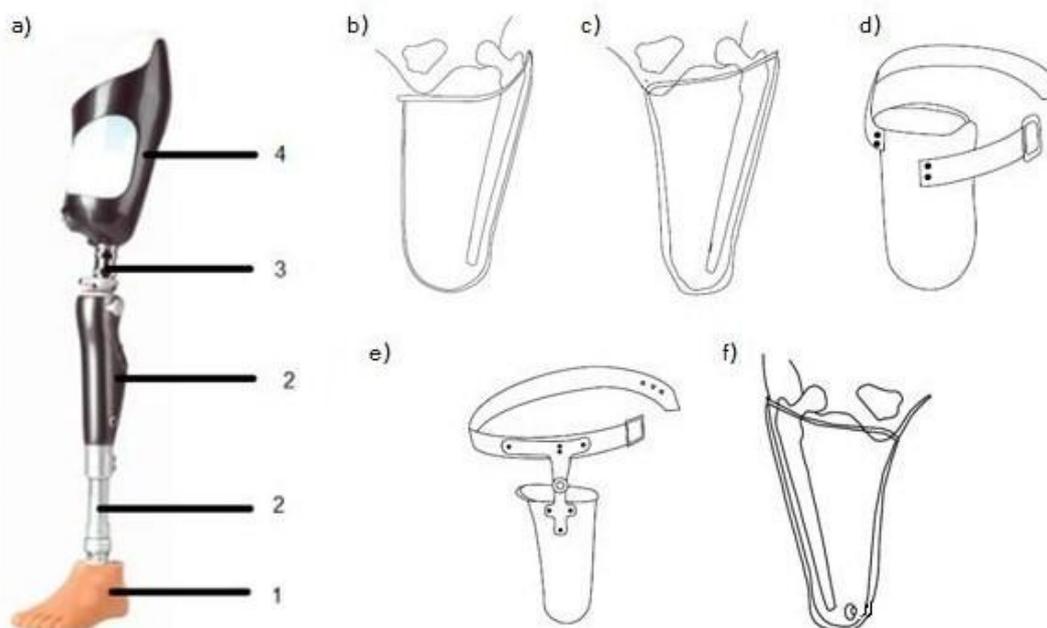


Figura 1.3: a) Componentes de uma prótese transfemoral: 1- pé protésico; 2- joelho protésico e tubo de ligação; 3- adaptador de encaixe e 4- encaixe. Quando pretendido é acrescido o revestimento cosmético. b) encaixe quadrilátero; c) encaixe isquiático; d) suspensão com cinto abaixo do osso pélvico; e) suspensão com cinto acima do osso pélvico; f) suspensão sucção.

[Fontes: a) <http://www.en.andamkar.ir/images/content/Above%20Knee%20Prosthesis.jpg>;
Restantes imagens - <http://www.posna.org/news/Amputations.pdf>]

Basicamente as etapas de produção da prótese envolvem a medição do coto e do outro membro inferior, obtendo um molde negativo pela aplicação de uma ligadura gessada em volta do membro debilitado. A partir deste molde é criado um molde positivo que é trabalhado e rectificado com o objectivo de se obter os contornos e pressões óptimas. Por fim é fabricado o encaixe rígido pelos métodos já referidos e procede-se á união com os outros componentes, culminando com o alinhamento do sistema. O processo de optimização ao paciente é demorado e envolve pequenas alterações no decurso do uso.

1.3.2. PROBLEMAS ASSOCIADOS

A qualidade de uma prótese de membro inferior refere-se principalmente ao nível do conforto, facilidade de locomoção e durabilidade. Dados estatísticos provenientes de diversas faxas etárias comprovam o insucesso das próteses, medido pela taxa de rejeição e substituição das mesmas. Geertzen *et al.* (2001) mencionam que de 85% de amputados com origem vascular com prótese, apenas 5% a usa por mais de meia hora durante o dia. A

percentagem de amputados com prótese decai para 31% após cinco anos e após dois anos apenas 26% dos pacientes a utiliza para andar (Geertzen *et al.*, 2001; 8, 2011). Este insucesso deve-se a variados factores, a saber: edema, contracções articulares, dores, neuromas, problemas cutâneos, infecções, problemas ósseos, entre outros (Kapp & Cummings, 2011). Alguns destes factores têm em comum a má adaptação do encaixe ao coto, nomeadamente edema, contracções articulares devido ao mau posicionamento, dores causadas por pressões exercidas, problemas cutâneos como consequência de congestão venosa e reacções alérgicas sejam provenientes do material usado seja da abrasão (Geertzen *et al.*, 2001; Murray & Fox, 2002; 8, 2011). Wagner *et al.* (2007), Mak (2001), Neumann (2001) e Gailey *et al.* (2010) comprovam a importância da correcta adaptação da prótese ao coto e referem que o desconforto é a maior causa associada à rejeição. Objectivamente, a qualidade do interface bem como a distribuição de forças exercida pelo par chão/prótese e coto/tronco é vital para a integração do paciente na sua nova vida.

De notar que a redução da área corporal conduz à diminuição da área de pele, e sendo a regulação da temperatura corporal uma das funções do órgão, o processo de amputação provocará um aumento de transpiração em todo o corpo, incluindo no coto (Hagberg & Branemark, 2001; 9, 2011). O aumento de transpiração que advém da diminuição da área da pele, mas também o aumento do esforço de locomoção provoca o aparecimento de macerações que predispõe à ocorrência de infecções bacterianas e fúngicas (9, 2011). Santos *et al.* (2006) num estudo desenvolvido em doentes com pé diabético constatou a presença de bactérias Gram positivas e Gram negativas, nomeadamente o *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*.

1.4. A SOLUÇÃO E OBJECTIVOS DO PROJECTO

O potencial crescimento do número de pessoas amputadas aliado ao facto das próteses desempenharem um dispositivo alternativo válido para a melhoria da mobilidade, torna-se imperativo a investigação no que concerne à compatibilidade biológica e comodidade mecânica. O facto de o ajuste do dispositivo ao paciente ser realizado qualitativamente pelo médico, subjaz a uma série de questões de ordem técnica, que no limite tem-se revelado inadequado a julgar pelas elevadas taxas de rejeição.

O presente estudo é englobado num projecto que consiste na formulação e execução de um dispositivo de sensores, que pretende mapear o campo de pressões existentes na interface prótese e membro amputado. Os sensores são desenvolvidos a partir de materiais inteligentes piezoeléctricos (sensíveis a campos de pressões dinâmicas) e piezoresistivos (sensíveis a deformações estáticas e dinâmicas). Estes materiais de detecção são funcionalizados com

filmes finos condutores, TiN, e à superfície deste haverá uma camada protectora isolante de TiO_2 . Proceder-se-á à inclusão de nanopartículas de prata na matriz do TiO_2 com o objectivo de evitar a proliferação de fungos e bactérias, favorecidas pela humidade derivada de fenómenos fisiológicos, nomeadamente a transpiração.

O presente trabalho pretende estudar a quantidade de prata a incorporar na matriz de TiO_2 de modo a reduzir a dureza do material, exibir efeito antibacteriano e não revelar citotoxicidade para com as células animais. Estes objectivos primordiais serão alcançados através de um conjunto de objectivos inerentes, a saber:

- Depositar revestimentos do tipo TiO_2/Ag por pulverização catódica modo magnetron com um alvo de titânio incrustado com um número variável de pastilhas de prata em atmosfera reactiva com gás oxigénio; pretende-se obter revestimentos com composição química variável desde 0 até 30% atómica de prata;
- Caracterizar os revestimentos química, estrutural, morfológica e mecanicamente e relacionar os resultados com o teor de prata;
- Proceder ao recozimento dos revestimentos a uma temperatura que permita a obtenção de propriedades que salientem os materiais usados; caracterizar os filmes do mesmo modo que o ponto anterior e relacionar os resultados com o efeito da temperatura do recozimento;
- Estudar a interacção dos revestimentos com células animais e procariotas, relevando na análise a caracterização anterior;
- Estabelecer o melhor compromisso relativamente ao teor de prata que promova uma diminuição da dureza, comportamento citotóxico para com as células procariotas e não citotóxico para com as células animais.

2. Os MATERIAIS

O dióxido de titânio possui propriedades que o tornam num dos materiais mais utilizados em aplicações desde a óptica à medicina. A sua elevada estabilidade química, dureza, constante dieléctrica, comportamento fotocatalítico, a não toxicidade, biocompatibilidade, transparência e o seu baixo preço de mercado são os fundamentos da aplicabilidade. Por outro lado, a prata é dúctil, condutora e reconhecidamente um agente antibacteriano. O facto de o dióxido de titânio ser um material com elevada dureza torna-o frágil à pressão, ou seja quebradiço, o que para a aplicação final é uma desvantagem. Desse modo a dopagem com prata é uma solução, tendo a vantagem de ser microbicida. Interessa que o material final seja isolante de modo a evitar curto-circuito dos pontos de medição de pressão, o que ressalva um estudo posterior da condutividade do material TiO_2/Ag .

A sinergia destes dois materiais será estudada neste trabalho, com o objectivo de tornar o sistema TiO_2/Ag mais dúctil e com propriedades antimicrobianas.

2.1. OS ELEMENTOS: OXIGÉNIO, PRATA E TITÂNIO

O elemento oxigénio tem número atómico 8 e faz parte do grupo XI da tabela periódica que se caracteriza por possuir seis electrões de valência. É um não metal que à temperatura ambiente se encontra no estado gasoso, possuindo peso atómico 16. A sua forma alotrópica mais vulgar é o O_2 e a maioria dos elementos reagem com este formando compostos binários (Reger *et al.*, 1993). O oxigénio existe naturalmente nos estados de oxidação -II, -I, I e II, sendo o estado mais estável o -II (Dias, 2006). Possui um raio atómico de 60 pm e raio

covalente de 73 pm, o que o torna um elemento intersticial em muitas estruturas. O facto da atmosfera terrestre ser oxidante faz com que o oxigénio reaja com uma grande parte de materiais, formando uma camada protectora estável que impede o contacto dos átomos do material com o ambiente circundante.

A prata é um elemento metálico, pertencente aos elementos de transição na tabela periódica. Tem número atómico 47 e configuração electrónica [Kr] 4d¹⁰ 5s¹. Devido à estabilidade química que apresenta, resistência à corrosão mesmo a elevadas temperaturas é considerada um metal nobre (Aaltonen, 2005). Exibe elevada condutividade térmica e eléctrica, baixa tensão de cisalhamento, elevada reflectividade e a seguir ao ouro é o metal mais dúctil. Estas propriedades tornam-na num metal atractivo para diversas aplicações, nomeadamente nas áreas de joalheria, electrónica e fotografia (Enghag, 2004) (Nordberg *et al.*, 1998).

Biologicamente, a prata quando em quantidade moderadas não exhibe efeitos negativos para o organismo humano manifestando por outro lado efeito antibacteriano (Margaret *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2007). No entanto, recentemente foram publicados estudos que relatam a toxicidade da prata tanto ao nível procariota como eucariota, manifestando-se esta tendência predominantemente em nanopartículas (Cheng *et al.*, 2006; Panyala *et al.*, 2008; Schrand *et al.*, 2010).

O titânio tem número atómico 22 e por não possuir as camadas de valência totalmente preenchidas permite a formação de soluções sólidas com a maioria dos elementos substitucionais de tamanho $\pm 20\%$ do seu, produzindo uma vasta gama de ligas metálicas (Joshi, 2006). O titânio cristaliza em estrutura hexagonal compacta (α Ti) a temperaturas inferiores a 882°C, e a fase β , estrutura cúbica de faces centradas, é estável para temperaturas entre 882°C e 1668°C, a sua temperatura de fusão. Intersticialmente, o oxigénio, azoto e carbono e substitucionalmente o alumínio conduzem a um aumento da temperatura a que se dá a transformação alotrópica, e por esse motivo são denominados estabilizadores α . Metais de transição como o molibdénio, nióbio e vanádio actuam como estabilizadores da fase β (Lütjering & Williams, 2003).

O titânio apresenta baixa densidade, elevada resistência mecânica e elevada resistência à corrosão (Enghag, 2004). Estes ingredientes fazem com que este material seja atraente industrialmente, com aplicações desde a aeronáutica à medicina.

Na tabela 2.1 podemos constatar algumas das propriedades que tornam estes materiais atraentes industrialmente.

Tabela 2.1. Propriedades químicas, físicas e termodinâmicas dos elementos O, Ag e Ti. [Fonte: Enghag, 2004]

	Oxigénio	Prata	Titânio
Número atómico	8	47	22
Massa atómica	16	107,87	47,88
Config. electrónica	[He] 2s ² 2p ⁴	[Kr] 4d ¹⁰ 5s ¹	[Ar] 3d ² 4s ²
Estrutura cristalina	Monoclínica FC ³ < 23,8K Romboédrica < 43,8K Cúbica FC < 54,8K	Cúbica FC $a = 4,09\text{Å}$	Hexagonal Compacta Cúbica FC
Electronegatividade (Pauling)	3,44	1,93	1,54
Raio atómico (pm)	60	160	140
Raio iónico (pm)	128 (O ²⁻)	142 (Ag ⁺)	88 (Ti ⁴⁺)
Densidade (273K) Kg.m ⁻³	1,429	10490	4505
Ponto fusão (°C)	-218,4	961,8	1668
Calor específico (298K) (J.K ⁻¹ .Kg ⁻¹)	918	235	522
Condutividade térmica (273K) (W.m ⁻¹ .K ⁻¹)	0,0245	428	22
Coef. exp. linear	-	$18,9 \times 10^{-6}$	$8,6 \times 10^{-6}$
Módulo Young (GPa)	-	82	116
Entalpia de fusão (KJ.mol ⁻¹)	0,444	11,30	19,2
Entropia (298K) (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	205,14	42,55	30,63
ΔG° formação óxido (298K) (kJ.(mol O ₂) ⁻¹)	-	-22,4	-889

2.2. DIÓXIDO DE TITÂNIO

O titânio devido à sua elevada reactividade com o oxigénio, ΔG° de formação óxido -889 kJ.(mol O₂)⁻¹, quando em contacto com o ar, água ou outro electrólito forma-se espontaneamente uma camada superficial de óxido. Esta camada isolante confere resistência

³ Faces Centradas

química a ambientes corrosivos e por esse motivo o titânio é amplamente utilizado em implantes ortopédicos (Hwang *et al.*, 2006; Nasab & Hassan, 2010).

A incorporação intersticial dos átomos de oxigênio na estrutura cristalina hexagonal do titânio provoca uma diminuição gradual das características metálicas bem como um aumento da célula unitária. Observa-se do diagrama de fases, figura 2.1, que à temperatura ambiente encontram-se principalmente as fases Ti, Ti₂O, TiO, Ti₂O₃, Ti₃O₅ e TiO₂. O comportamento metálico do sistema é verificado até a estequiometria TiO_{0,42}, possuindo estrutura hexagonal compacta. Razões de O/Ti compreendidas entre 0,42 e 1,46 dão origem a estruturas cúbicas de corpo centrado com fases intermediárias, δ e segunda fase. A fase γ com arranjo hexagonal é dividida em duas fases, estendendo-se até Ti₃O₅.

Entre as fases Ti₃O₅ e TiO₂ encontram-se uma série de fases de estequiometria Ti_nO_{2n-1} (n ≥ 4), em que ocorrem mudanças bruscas das propriedades físicas. Estas séries designam-se por Magnéli e têm sido alvo de estudo nomeadamente em aplicações fotocatalíticas (Liborio & Harrison, 2008). Finalmente para razões O/Ti superiores a 1,90 obtém-se a fase α, correspondente ao TiO₂ estequiométrico.

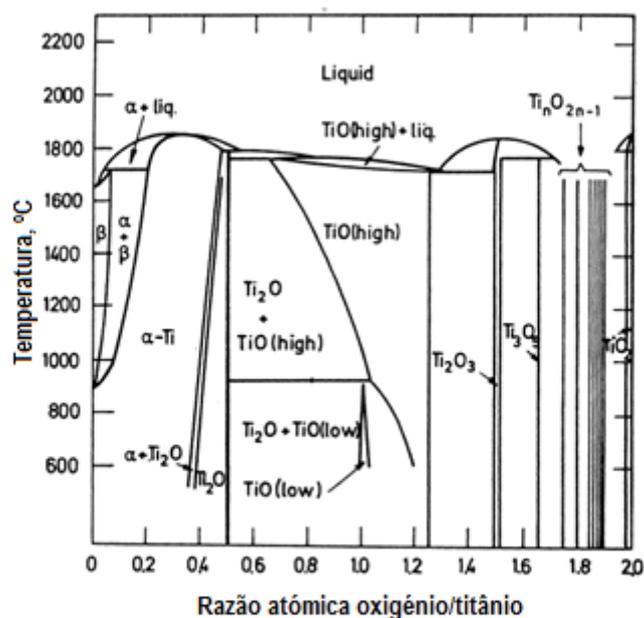


Figura 2.1. Diagrama de fases de óxido de titânio em função da temperatura e composição relativa O-Ti. [Fonte adaptada - Springer, 2004]

2.2.1. ESTRUTURA CRISTALINA

Na natureza o dióxido de titânio cristaliza em três estruturas distintas: anatase, rutilo e brookite (Ranade *et al.*, 2002). No entanto sob condições extraordinárias, p.e. pressão elevada, podem-se formar estruturas tipo *columbite*, *baddeleyite*, *hollandite*, entre outras (Nalwa, 2005).

Em diversos métodos de síntese, deposição catódica modo magnetron (Takeda *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2006), deposição química a vapor (Gotic *et al.*, 1996; Schuisky *et al.*, 2000) e método sol-gel (Pawar *et al.*, 2011; So *et al.*, 1998) são reportadas as fases anatase e rutilo.

As estruturas da anatase e do rutilo, tetragonais, podem ser descritas com base no padrão e distorção das cadeias octaédricas TiO_6 (Nalwa, 2004). A célula unitária de cada estrutura é representada na figura 2.2. A célula unitária do rutilo contém dois átomos de Ti situados $(0,0,0)$ e $(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$ e quatro átomos de oxigénio. A célula unitária da anatase contém quatro átomos de Ti localizados $(0,0,0)$, $(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}, \frac{1}{2})$, $(0, \frac{1}{2}, \frac{1}{4})$ e $(-\frac{1}{2}, 0, -\frac{1}{2})$ e oito átomos de oxigénio (Springer, 2004). Observa-se que cada ião Ti^{4+} é rodeado por um octaedro de seis iões O^{2-} (Labat *et al.*, 2007). O octaedro do rutilo revela uma ligeira distorção ortorrômbica enquanto que na anatase essa é significativa. As distâncias ião Ti-Ti são superiores na anatase (0,379 e 0,304nm vs 0,357 e 0,296nm) enquanto que as distâncias Ti-O são maiores no rutilo (0,1934 e 0,198nm vs 0,1949 e 0,1980nm) (Nalwa, 2004). Cada octaedro está em contacto com 10 e 8 octaedros no rutilo e anatase, respectivamente. A superfície (101) é a mais estável na anatase e a (110) no rutilo (Hengerer *et al.*, 2010; Zhang & Lindan, 2003). Estas diferenças na rede cristalina são o fundamento para diferenças na densidade, 3,89 e 4,25g.cm⁻³, para a anatase e rutilo respectivamente (Nalwa, 2004).

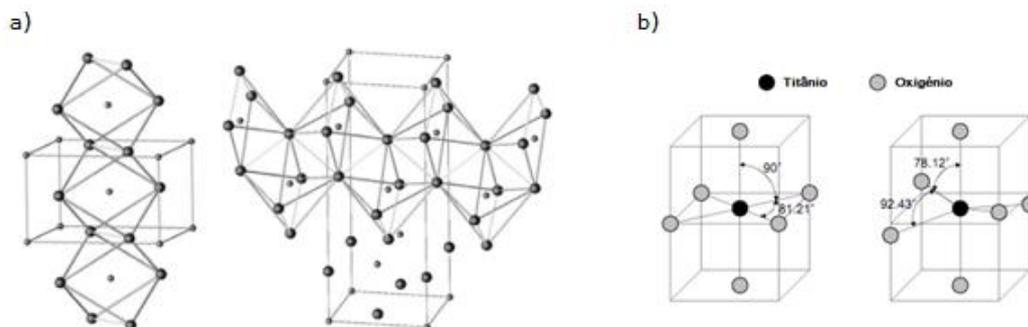


Figura 2.2. a) Arranjo do octaedro relativamente à célula unitária. Os parâmetros de rede para a anatase são $a=3,7842\text{Å}$ e $c=9,5146\text{Å}$. Para o rutilo $a=4,5937\text{Å}$ e $c=2,9587\text{Å}$. [Springer, 2004] b) disposição dos iões no octaedro [adaptado - Nalwa, 2004]. Rutilo (esquerda) e anatase (direita).

O facto da anatase ser a primeira fase metaestável relativamente ao rutilo, faz com que esta se transforme em rutilo exotérmica e irreversivelmente. A temperatura crítica varia de 400° a 1200°C dependendo da técnica utilizada, atmosfera, tamanho de grão, natureza e quantidade de impurezas, como referido anteriormente. À pressão atmosférica ocorre aproximadamente a 1000°C (Springer, 2004).

2.2.2. MODELO LÖBL

A formação das fases depende da técnica utilizada, como já foi referido. Retira-se que uma determinada técnica impõe determinadas condições e que estas são dependentes dos parâmetros da técnica.

O modelo de Löbl enfatiza o papel da temperatura e da energia cinética das partículas no mecanismo de formação e crescimento filme (Feil, 2006). A análise do esquema da figura 2.4 salienta o facto da energia das partículas ser dependente da técnica de deposição PVD. Uma análise mais atenta mostra que na gama de temperaturas 50-200°C e energia superior a 3eV formam-se as fases rutilo e anatase, para a técnica pulverização catódica modo magnetrão. Por outro lado, para temperaturas inferiores a 100°C e energias inferiores a 2 eV há a possibilidade de formação de fases amorfas. Há medida que a técnica empregue possibilita a ejeção de partículas com maior energia aumenta a possibilidade de formação da fase rutilo. O mesmo se verifica para o aumento da temperatura do substrato, o que sustenta a maior estabilidade termodinâmica do rutilo.

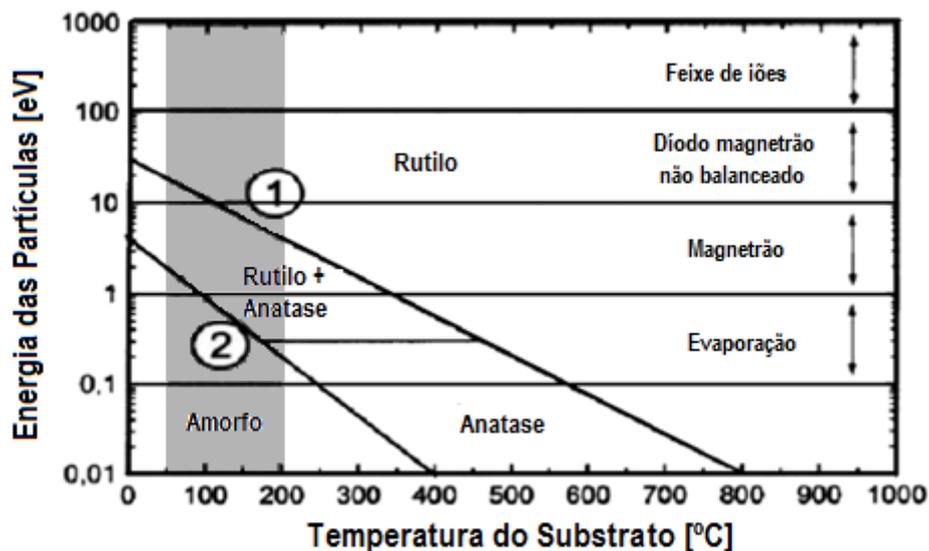


Figura 2.3. Esquema que salienta a dependência da temperatura do substrato e da energia das partículas na formação das fases cristalinas, para diferentes técnicas de deposição PVD [Fonte: adaptado - Feil, 2006].

3. PRODUÇÃO DE REVESTIMENTOS

A utilização de revestimentos na área da biomédica tem vindo a aumentar, manifestando o contínuo interesse de combinar diferentes propriedades estruturais num material. A técnica pulverização catódica, designada em inglês por “Sputtering”, pertence ao grupo de técnicas de deposição física em fase de vapor que se caracterizam pela formação do material a depositar através da troca de momento linear entre iões do gás de trabalho e um alvo do material depositante. Esta técnica é comumente usada académica e industrialmente devido à simplicidade do processo físico, versatilidade, produção de filmes com elevada adesão ao substrato e de ter impacto ambiental reduzido.

Os filmes em estudo, sistema TiO_2/Ag , foram produzidos por pulverização catódica em corrente contínua modo magnetron em atmosfera reactiva.

3.1. MATERIAIS

3.1.1. SUBSTRATO

Designa-se por substrato o material que se pretende revestir. Os filmes TiO_2/Ag foram depositados sobre dois tipos de substratos: lamelas de vidro e silício, para corresponder às exigências das técnicas de caracterização.

As lamelas de vidro *Pilkington*[®] obedecem à norma ISO 8037 para diagnóstico *in vitro*. Pelo facto destas lamelas não apresentarem indícios de toxicidade em células eucariotas e procariotas aliado ao preço acessível, tornam este material um óptimo substrato para o tipo de testes a realizar.

O silício (100), é amplamente utilizado como substrato para ensaios de caracterização estrutural, morfológica e química, devido às excelentes propriedades de compatibilização com a maioria dos materiais a depositar.

Tabela 3.1. Algumas características dos materiais utilizados como substratos. Os dados relativos ao vidro constam de uma ficha de produto enviada electronicamente.

Substrato	Composição Química (w.%)				Mód. Young (GPa)	Coef. exp. Térm. (K ⁻¹)	Dimensões (mm ²)
Vidro	SiO ₂ 72,5%	Na ₂ O 13,2%	CaO 8,89%	MgO 4,2%	73	9 x 10 ⁻⁶ (50-350°C)	76 x 26
Silício	Si				130	2,6 x 10 ⁻⁶ (Roberts, 1981)	50 x 20

3.1.2. ALVO

O componente constituído pelo material que se quer depositar designa-se por alvo.

Os filmes foram obtidos a partir da pulverização de um alvo de titânio (200x100x6 mm³ e pureza 99,9%) incrustado com pastilhas de prata (dimensão variável e pureza 99,8%) posicionadas na zona de maior erosão. A área total das pastilhas utilizadas variou de 0 a 2,4 cm². As deposições decorreram em atmosfera reactiva com o gás oxigénio (99,99% de pureza).

3.2. PULVERIZAÇÃO CATÓDICA

3.2.1. PRINCÍPIO E FUNCIONAMENTO

Na deposição de revestimentos pelas técnicas designadas por deposição física em fase de vapor (PVD), ocorrem três fases (Cavaleiro & Vieira, 1995):

- i) Transformação do material a depositar para a fase de vapor;
- ii) Transferência do vapor, desde a fonte até ao substrato;
- iii) Condensação do vapor à superfície do substrato e crescimento do filme.

Por acção de um campo eléctrico, iões provenientes da ionização do gás de trabalho, são acelerados em direcção ao cátodo (alvo) embatendo com os átomos constituintes. Da interacção dos iões com os átomos, através da troca de quantidade de movimento, podem ocorrer diferentes processos, salientando-se a emissão de electrões secundários dos átomos da superfície, a implantação de iões do gás no alvo e a **ejecção de átomos do alvo**. A ocorrência dos diferentes efeitos enumerados anteriormente, depende essencialmente da energia cinética dos iões do gás e da rede de átomos do alvo. Através da lei da conservação

da energia e da quantidade de movimento, a energia transferida para um átomo do alvo é descrita segundo a equação 3.1 (Mattox, 2010).

$$\frac{E_a}{E_i} = 4 M_i M_a \frac{\cos^2 \theta}{(M_i + M_a)^2} \quad (3.1)$$

onde E é a energia, M a massa, θ é o ângulo medido a partir da linha que une os centros de massa (figura 3.1), o índice i a partícula incidente e a a partícula do alvo. Retira-se da equação que o máximo energia transferida ocorre quando $\theta = 0^\circ$ e quando as massas das partículas são iguais.

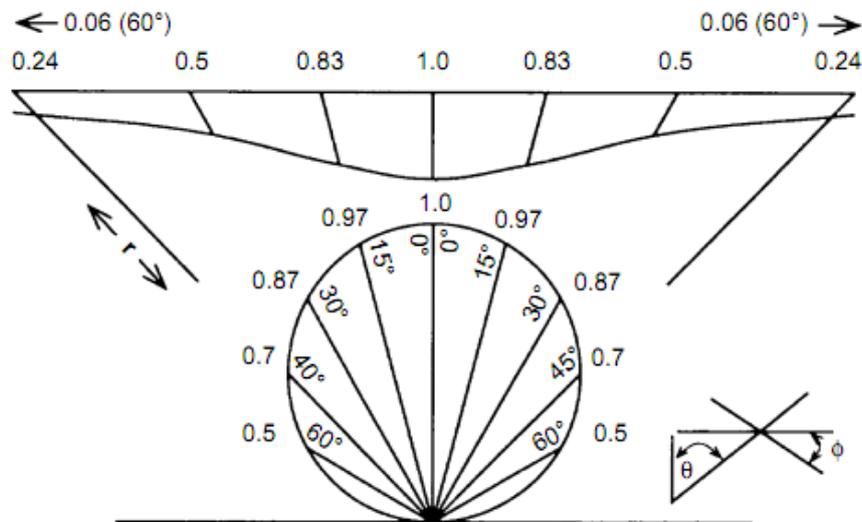


Figura 3.1. Distribuição coseno de partículas ejetadas do alvo, em função do ângulo. Em função do ângulo da partícula incidente ocorrerá a ejeção num determinado ângulo. [Fonte: Mattox, 2010]

Neste ponto importa salientar o porque do uso de gases inertes como gases de trabalho, sejam o Cripton ($Z=84$), Xénon ($Z=131$) e Árgon ($Z=40$). O facto de estes gases possuírem um número atómico elevado aumenta o rendimento de pulverização. Por outro lado, não reagem com os átomos do alvo, não formando composto indesejados. O uso do árgon prende-se fundamentalmente com a disponibilidade e preço no mercado em comparação com os gases referidos.

Os electrões secundários emitidos pela superfície do alvo ao deslocarem-se para o ânodo (substrato) colidem com átomos do gás, provocando ionizações sucessivas caso possuam energias elevadas. Este mecanismo é vital para a formação e manutenção do plasma promovendo que o processo de pulverização ocorra de forma contínua (Cavaleiro & Vieira, 1995).

As partículas ejetadas que possuem energia suficiente para **atravessar o espaço intereléctrodos**, depositam-se sobre o substrato. Este percurso não é pacífico, pois nele as partículas encontrarão uma mistura de átomos, iões e electrões que provocarão uma perda de

energia acentuada, podendo levar à termalização da partícula. Obviamente que há partículas que atravessam o espaço interelectrodos por difusão, atingindo o substrato com energia elevada e trajetórias distorcidas relativamente à normal. Contudo o facto de se usar pressões de deposição elevadas para formação de plasma, induz uma diminuição do livre percurso médio das partículas, objectivando-se em taxas de deposição reduzidas. Esta desvantagem é colmatada com o modo magnetirão, descrito no ponto 3.2.2.

A **deposição** de tais partículas (1-40 eV) ocorre por condensação, processo que pode ser descrito por três fases: a primeira em que as partículas incidentes transferem a energia cinética para a rede do substrato, tornando-se átomos não ligados (adátomos); posteriormente ocorre a estabilização energética da rede pela difusão e troca de energia entre os adátomos e espécies adsorvidas, alocando-se em regiões de baixa energia; e por último os átomos incorporados reajustam as suas posições na rede por processos de difusão em volume (Bogaerts *et al.*, 2002; Cavaleiro & Vieira, 1995).

A grande versatilidade da técnica pressupõe a existência de vários parâmetros de deposição, designadamente: potencial e corrente iónica para o alvo, gás de trabalho, pressão de deposição, intensidade do campo eléctrico, distância interelectrodos, geometria da câmara de deposição, polarização e corrente iónica para o substrato, temperatura do substrato, entre outros. A alteração num dos parâmetros induz alteração nos demais.

3.2.2. MODO MAGNETRÃO

O modo magnetirão difere do modo convencional pela aplicação de um campo magnético próximo da região do alvo, permitindo o confinamento do plasma nessa região. Deste modo, os electrões secundários emitidos da superfície do alvo são obrigados a percorrer determinadas trajetórias, dependentes das linhas de campo, onde ionizam os átomos do gás de trabalho (Mattox, 2010). O resultado desta configuração é indubitavelmente o aumento da taxa de ionização, que se traduz num aumento das taxas de pulverização e deposição. O aumento da taxa de deposição decorre da possibilidade de uso de pressões mais baixas, o que se traduz em menos processos de colisão das partículas ejectadas e consequentemente a não termalização das partículas, depositando-se no substrato com mais energia (Cavaleiro & Vieira, 1995).

A configuração magnetirão mais usual é planar, que se caracteriza por formar duas faixas paralelas erodidas, motivado pelo campo magnético ser paralelo à superfície e as linhas de campo passarem nessas trajetórias. O facto de o plasma não ser uniforme faz com que apenas uma parte do alvo seja pulverizada (10-20%) não permitindo o uso total do mesmo. A posição do substrato deve ser criteriosa de tal modo que se maximize a deposição (Mattox, 2010).



Figura 3.2. Magnetão e alvo utilizados.

3.2.3. MODO REACTIVO

Designa-se por processo não reactivo quando um dos gases injectados na câmara não participa directamente na formação do composto, ou seja, apenas participa na pulverização do alvo. O processo reactivo caracteriza-se por pelo menos uma das espécies reactivas entrar na câmara de deposição na fase gasosa. Os gases reactivos podem ser introduzidos na câmara na sua forma molecular (N_2 , O_2) ou na sua forma activada (N , O , N^+ , O^+) (Mattox, 2010). Tipicamente os gases reactivos tem baixo número atómico, não tendo capacidade de pulverização directa. Contudo a injeção de um gás de trabalho que tem essa função, provoca uma mistura de gases na câmara que despoleta a activação por processos de excitação/ionização. As espécies reactivas podem ser activadas por diversos processos, alguns dos quais por dissociação molecular ($O_2 + e^- \rightarrow 2O^-$), produção de novas espécies moleculares quimicamente reactivas ($O_2 + e^- \rightarrow 2O^0$ e $O^0 + O_2 \rightarrow O_3$), produção de iões nas superfícies, aumento da temperatura do gás, etc (Mattox, 2010)..

As vantagens da pulverização catódica reactiva são a facilidade de uso de elementos gasosos que pela produção de alvos compostos se tornaria dispendiosa, a possibilidade de deposição de substâncias electricamente isoladoras e o controlo do caudal do gás reactivo permitindo revestimentos com gradientes de composição química. Por outro lado, tem como principal inconveniente a possibilidade de “envenenamento” do alvo (formação camada de um composto), provocando uma diminuição da taxa de deposição.

3.2.4. MICROESTRUTURA DOS FILMES FINOS

O crescimento do revestimento dá-se pela contínua deposição de novas partículas e a sua nucleação em átomos anteriormente depositados. A forma como o crescimento se processa determina importantes propriedades dos filmes, nomeadamente a densidade do filme, área superficial, morfologia e o tamanho de grão. Estas propriedades exibem uma grande

dependência da pressão de deposição e da temperatura do substrato. *Thornton* explica o tipo de estrutura com base nestes dois parâmetros, como exemplificado na figura 3.3 (d).

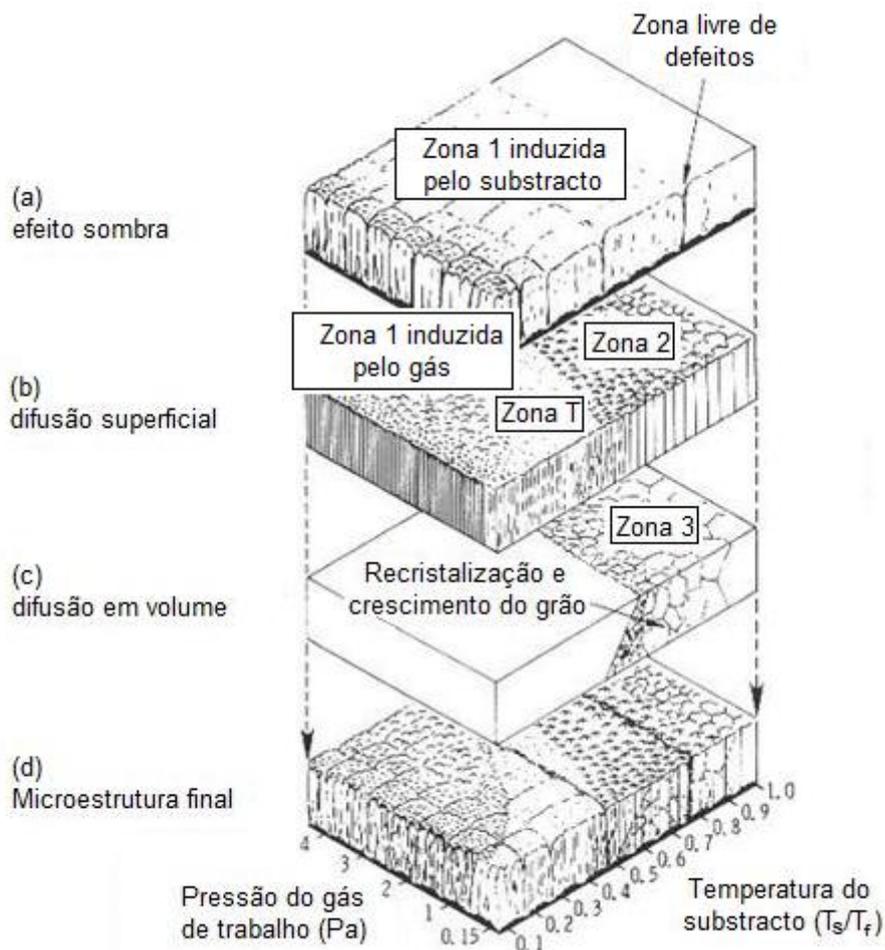


Figura 3.3. Representação dos efeitos sombra, difusão superficial e difusão em volume e estrutura do revestimento em função da temperatura do substrato e da pressão de deposição.

[Fonte adaptada - <http://www.pvd-coatings.co.uk/wp-content/uploads/tszmodel.jpg>]

São vários os factores que contribuem para o crescimento de um dado tipo de zona, contudo o ângulo de incidência dos adátomos [figura 3.3 (a)], a razão entre temperatura de deposição e temperatura de fusão do revestimento, a mobilidade dos adátomos [figura 3.3 (b)], o processo de difusão em volume [figura 3.3 (c)] e a rugosidade do substrato combinam-se para formar um tipo de microestrutura [figura 3.3 (d)] (Mattox, 2010). A influência do ângulo de incidência dos adátomos na microestrutura é explicada com recurso à figura 3 a), em que se mostra que os picos recebem o fluxo de adátomos provenientes de todas as direcções com excepção à direcção normal. Os adátomos ao chocarem com o revestimento se possuírem pouca energia aumenta a probabilidade de permanecerem no local

de embate, não se acomodando em locais de mais baixa energia, formando estruturas colunares. Por outro lado, se as partículas que chocam com o substrato/revestimento tiverem um maior afinidade entre elas do que com o substrato ou com determinadas partículas, pode ocorrer a segregação/coalescência das partículas, formando “montes” e deixando por isso locais vazios. Estes factores dependem essencialmente da pressão de deposição, temperatura e polarização do substrato. Deste modo, a formação de estruturas tipo zona 1, estrutura colunar aberta, obedece a pressões de deposição elevadas e temperaturas de substratos baixas, o que provoca uma elevada densidade de plasma e conseqüentemente uma diminuição do caminho médio livre entre colisões levando ao aumento da probabilidade de termalização das partículas entre eléctrodos (Cavaleiro & Vieira, 1995). Assim, a difusão dos adátomos à superfície é insuficiente para colmatar os efeitos do ângulo de incidência das partículas. Há produção de revestimentos com elevada área superficial. O efeito do ângulo de incidência pode ser minorizado com o movimento do substrato relativamente ao alvo.

A zona T, estrutura colunar densa, é considerada a zona de transição das zonas 1 e 2. Devido à diminuição da pressão de deposição, o bombardeamento do substrato por átomos neutros reflectidos na superfície do alvo aumenta, o que promove um alisamento da superfície, ou seja, há erosão dos picos e preenchimento dos vales, resultando numa morfologia colunar mais densa. Com o aumento da temperatura do substrato, o efeito do ângulo de incidência é atenuado com o aumento da mobilidade dos adátomos e difusão superficial, o que promove a densificação das colunas e conseqüente aumento de grão. A estrutura da zona 2 é uma mistura de colunar e granular. Na zona 3 verifica-se um crescimento de grão e a transformação das colunas em grãos promovido pelo crescente aumento da temperatura do substrato e alcançado por difusão em volume.

Resumindo, o aumento da temperatura do substrato provoca o aumento da densidade dos filmes, enquanto o aumento da pressão provoca um efeito contrário.

A polarização negativa do substrato, desencadeia o aumento de colisões de iões carregados positivamente com o mesmo. Este processo é acompanhado de um aumento da temperatura, geração de defeitos pontuais, aumento da mobilidade dos adátomos, etc., sob o efeito de mecanismos explicados anteriormente.

De notar que a densidade do revestimento é determinante para um conjunto de propriedades, entre as quais algumas que iremos estudar: dureza e ângulo de contacto.

3.2.5. EQUIPAMENTO E CONDIÇÕES DE ENSAIO

O equipamento de pulverização catódica utilizado é essencialmente composto por uma câmara de deposição, um sistema de vácuo, um sistema de controlo de fluxo de gás, um sistema eléctrico, uma ante-câmara e uma unidade de controlo.

A câmara de deposição tem forma cilíndrica, diâmetro aproximadamente de 0,4 m e um volume próximo de 14 m³, podendo conter um máximo de quatro magnetrons. No presente estudo, utilizou-se um magnetron plano de forma rectangular. Os substratos, silício e vidro, foram posicionados no centro da câmara num porta substratos polarizado e com movimento de rotação. Relativamente aos alvos, titânio incrustado com pastilhas de prata, estes posicionaram-se em extremidades opostas da câmara de frente para o porta-substratos.

O sistema de vácuo é constituído por três bombas rotativas e duas bombas turbomoleculares. O vácuo primário é conseguido com auxílio de duas bombas rotativas paralelas, *Trivac D&B* e *Balzres DUO 012A*, com velocidades nominais de bombeamento de 2,36 Ls⁻¹ e 3,33 Ls⁻¹, respectivamente. O vácuo secundário ou pressão base, inferior a 4x10⁻⁴ Pa, é alcançado através de duas bombas turbomoleculares *Balzres TPU200* e *Alcatel PTM5400*, com velocidades nominais respectivamente de 190 Ls⁻¹ e 400 Ls⁻¹. A pressão dentro da câmara é monitorizada através de dois manómetros da marca *Edwards, Pirani PRL10* (vácuo primário) e *Penning CP25-K* (vácuo secundário).



Figura 3.4: Equipamento de produção de revestimentos - pulverização catódica - situado no Campus Azurém, Universidade do Minho. (1) fonte de tensão para etching; (2) sistema de controlo geral; (3) controlador de temperatura; (4) fonte de tensão dc para os alvos; (5) câmara de pré-vácuo; (6) sistema de vácuo; (7) câmara de vácuo principal; (8) bomba turbomolecular.

A ante-câmara tem a função de diminuir o intervalo de tempo para alcançar-se a pressão de base e reduzir a contaminação da câmara. Para tal, está conectada a uma bomba rotativa

Edwards E2M18, de velocidade nominal $5,7 \text{ Ls}^{-1}$, que permite obter vácuo primário de cerca de 2 Pa.

O sistema eléctrico é composto por dois geradores *DC Huttinger*, modelos *PGF2500DC* e *PFG7500DC*, com potências máximas de 2,5 e 7,5 kW, respectivamente.

O porta-substratos é conectado a uma fonte de tensão, *ENI RPG50*, que permite a polarização do substrato. Finalmente, o sistema de controlo de fluxo de gás é composto por debitómetros e válvulas controladas por um computador.

Nas quatro deposições realizadas, os valores dos parâmetros de deposição, tabela 3.2, mantiveram-se inalterados.

Tabela 3.2. Valores dos parâmetros de deposição.

Parâmetro	Valor
Temperatura porta-substratos	ambiente
Polarização DC substrato	-50 V
Fluxo / Pressão de Árgon	60 sccm / 0,3 Pa
Fluxo / Pressão parcial de Oxigénio	9 sccm / 0,08 Pa
Distância alvo-substrato	7 cm
Pressão base	2×10^{-6} mbar
Corrente	2 A
Duração	3600 s

Previamente ao processo de produção dos filmes, os substratos foram sujeitos ao bombardeamento com iões de árgon ("*etching*") com o objectivo de limpar a superfície *in situ* (remoção de possíveis camadas de óxido e outras impurezas) e criar microdefeitos que favorecessem a nucleação de átomos a depositar. A adesão do filme é consideravelmente melhorada com esta pré-pulverização. Os parâmetros da pré-pulverização encontram-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Valores dos parâmetros de pré-pulverização ("*etching*").

Parâmetro	Valor
Fluxo de Árgon	60 sccm
Corrente	0,5 A
Duração	900 s
Frequência	200 kHz

3.3. TRATAMENTO TÉRMICO

Os filmes depositados foram sujeitos a tratamento térmico com o intuito de estudar as alterações estruturais e as propriedades daí resultantes.

O tratamento térmico é um conjunto de operações de aquecimento e arrefecimento sob condições controladas de temperatura, pressão, velocidades de aquecimento e arrefecimento, e composição da atmosfera do forno (Coblentz, 1991). O objectivo do tratamento é alterar a estrutura do material, alterando desse modo as suas propriedades, nomeadamente a dureza, resistência mecânica, resistência à corrosão, remoção de tensões internas, etc (Chiaverini, 1986). Contudo para que se efectivem as alterações desejadas, a temperatura máxima de aquecimento e a velocidade até alcançar a mesma deve ter em conta a temperatura de recristalização. Os diagramas de equilíbrio são um óptimo instrumento de análise. No que concerne ao tempo de permanência, este deve ser seleccionado de modo a que os efeitos da temperatura se objectivem uniformemente. A escolha da atmosfera (vácuo, hidrogénio, azoto) pende para evitar ou não processos de oxidação e descarbonatação. Quanto à velocidade de arrefecimento, esta deve ser um compromisso entre o arrefecimento rápido e lento. No primeiro constata-se o aparecimento de tensões internas elevadas, já o segundo pode impedir que as modificações estruturais alcançadas durante o aquecimento se realizem completamente (Chiaverini, 1986).

O tratamento térmico tem como fundamento o facto de os átomos oscilarem em torno das suas posições de equilíbrio possuindo uma energia atómica $3kT$, sendo k a constante de Boltzman e T a temperatura. Ao oscilarem transferem energia aos átomos em redor, possibilitando num determinado instante a acomodação do átomo noutra posição da rede (Ashby & Jones, 2007). Decorrente da implicação da temperatura na energia atómica, o aumento desta proporciona mais energia atómica, o que facilita a que seja alcançada mais rapidamente a energia da barreira do potencial. Por outro lado, haverá um aumento generalizado das energias promovendo-se trocas constantes, ou seja, a velocidade de difusão aumentará. A fórmula de *Arrhenius* exprime a velocidade de difusão em relação à temperatura (ScienTek, 2006).

3.3.1. FORNO ELÉCTRICO

O tratamento térmico foi realizado num forno eléctrico. Estes fornos baseiam-se na lei de Ohm, que postula que a aplicação de uma diferença de potencial nos terminais de uma resistência gera uma corrente eléctrica que por sua vez ao atravessar a resistência tem uma potência associada segundo a equação $P = I^2R$. Esta potência proporciona o aquecimento.

Os parâmetros do ciclo térmico estão expressos na figura 3.5.

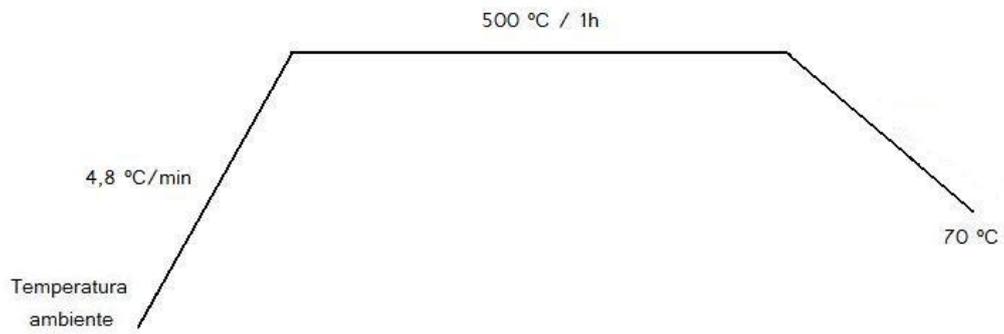


Figura 3.5: Ilustração dos passos do ciclo térmico. O vácuo primário foi alcançado à pressão 10^{-2} mbar e o secundário a 10^{-5} mbar.

4. MÉTODOS E TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

4.1. TÉCNICAS FÍSICAS

A caracterização físico-química dos revestimentos foi avaliada com recurso a diferentes técnicas, consoante a informação que se pretendia obter, como apresentado na tabela 4.1.

Tabela 4.0.1. Classificação das técnicas de caracterização em função da informação adquirida.

Caracterização	Técnica	Informação
Composição química	EPMA	Teor elementar
Morfológica	SEM	Morfologia
		Espessura
	AFM	Topografia Rugosidade
Estrutural	XRD/HTXRD	Identificação de fases Parâmetros de rede Tamanho de grão
Mecânica	Nanodureza	Dureza
Química	Ângulo de contacto	Hidrofobicidade

4.1.1. MICRO-ANÁLISE SONDA ELECTRÓNICA

A composição química elementar dos revestimentos é o ponto de partida para uma análise macroscópica. A compreensão da distribuição dos electrões nos átomos bem como o tipo de ligações interatómicas entre eles fornecem dados valiosos para o estudo das propriedades dos materiais. A técnica micro-análise por sonda electrónica permite a análise da composição química elementar qualitativa e quantitativamente, sendo uma técnica não destrutiva.

Interacção dos electrões com a matéria

Quando um feixe de electrões incide num material, podem ocorrer diversas interacções, classificadas em elásticas e inelásticas. Nas interacções elásticas não ocorre transferência de energia para o átomo enquanto que nas inelásticas os electrões incidentes cedem energia aos electrões atómicos. A energia cedida caso seja suficiente para ejectar um electrão atómico, provoca a ionização do átomo levando à ocorrência de transições electrónicas de modo a que o átomo “regresse” ao seu estado energético mais favorável, o estado fundamental (Eisberg, 1979). A transição de um electrão de uma camada exterior para uma vaga de uma camada mais interna, é acompanhada pela emissão de radiação electromagnética de alta energia, os raios-X (característicos). Ora, a energia emitida sob a forma de raios-X é igual à diferença entre os estados energéticos interveniente na transição electrónica e sabendo que cada elemento possui um número característico de electrões distribuídos segundo orbitais electrónicas conhecidas, a identificação do elemento torna-se fácil (Krumeick, 2011).

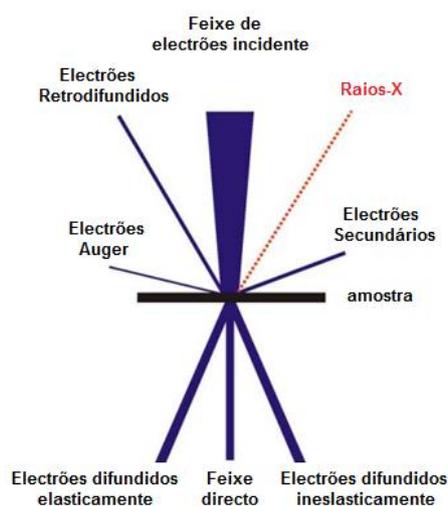


Figura 4.0.1: Esquema da interacção de um feixe de electrões com uma amostra. Quando a espessura da amostra é demasiado fina, verificam-se os acontecimentos ilustrados abaixo da amostra.

[Fonte adaptada <http://www.microscopy.ethz.ch/images/ww.jpg>]

Análise quantitativa

De uma forma simplista, a quantificação dos elementos da superfície da amostra é efectuada posicionando a amostra, os cristais e o detector de forma a que se verifique a lei de *Bragg* (equação 4.1). Os raios-X dependendo da energia e portanto do comprimento de onda que transportam são “seleccionados” por um cristal com determinada distância interplanar de modo a verificar-se a lei já referida. Seguidamente, os raios-X reflectidos entram num detector através de um colimador, onde são absorvidos pelos átomos de um gás (exemplo Ar), que provoca a emissão de fotoelectrões. Estes através de ionizações sucessivas

produzem um pulso eléctrico cuja amplitude é proporcional à energia dos fotões de raios-X originais. A contagem dos impulsos é comparada com valores padrão do elemento de interesse, aplicando o método de correcção ZAF (Z-correcção do efeito do número atómico, A-correcção do efeito de absorção e F-correcção do efeito da excitação por fluorescência) (Cahn, 2005; Henry & Goodge, 2011).

CAMECA - SX50

O equipamento utilizado nesta análise foi uma micro-sonda da marca CAMECA, modelo SX50, equipada com dois espectrómetros por dispersão angular de comprimento de onda e quatro cristais distintos que permitem a detecção de todos os elementos da Tabela periódica, desde o boro até ao urânio.

Os ensaios foram efectuados segundo tensões de aceleração de 15 kV e corrente de feixe de 40 mA. Para uma quantificação mais exacta foram realizadas quatro medições aleatórias pontuais na superfície dos filmes.

4.1.2. DIFRACÇÃO RAIOS-X

O estudo da microestrutura é essencial para compreender o comportamento macroscópico do material. Uma estrutura policristalina é constituída por diversos cristais que se organizam em pequenos domínios coerentes separados por redes de deslocações. Em cada domínio coerente consegue-se estabelecer planos de átomos separados por uma distância interplanar. Estes planos caracterizam-se por possuírem elevada densidade atómica e por conseguinte electrónica, facto que despoleta a difracção de fotões e consequente interferência dos mesmos. A difracção de raios-X é uma técnica não destrutiva que permite o estudo da microestrutura do material.

Lei de Bragg

Um feixe de raios-X monocromático quando interage com a superfície de um material cristalino, observa-se a difusão coerente da radiação pelos átomos do material. Parte da radiação incidente é reflectida no primeiro plano estrutural e a restante penetra na estrutura sendo reflectida nos planos sucessivos (hkl), originando um reforço da onda inicial caso se verifique igualdade entre as diferenças de percursos ópticos e um múltiplo inteiro do comprimento de onda do feixe incidente. Este modelo traduz as condições geométricas necessárias para ocorrência de difracção de raios-X, postuladas pela lei de *Bragg* (Cahn, 2005):

$$2 d_{hkl} \sin \theta = n \lambda \quad (4.1)$$

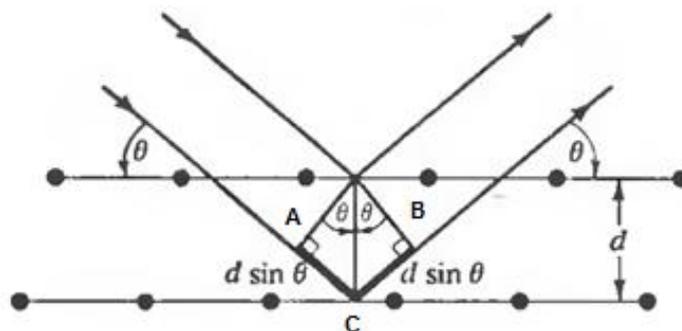


Figura 4.0.2: Esquema da lei de Bragg. [Fonte: ASHCROFT, 1976]

sendo d_{hkl} a distância entre planos cristalinos, θ o ângulo de difracção que corresponde ao ângulo descrito pelos raios incidentes e os planos difractantes e n a ordem de difracção que respeita à diferença de percursos entre as ondas difractadas por dois planos consecutivos, tomando sempre valores inteiros positivos.

A análise estrutural do material através da técnica mencionada, baseia-se fundamentalmente em três grandezas distintas obtidas da análise de cada pico de difracção, a saber: a posição, a intensidade e a forma do pico de difracção (Castanhola, 2010).

A posição do pico de difracção está relacionada com o valor médio das distâncias interplanares dos planos cristalográficos, fornecendo informação relativa à natureza do material e fase, bem como de tensões residuais. A intensidade do pico relaciona-se com a fracção volúmica de material a difractar, sendo afectada pela orientação dos domínios coerentes de difracção. Esta grandeza informa acerca da dosagem de fases cristalinas bem como da presença de texturas cristalográficas. A forma do pico é influenciada pela dimensão e deformação própria de cada domínio coerente de difracção, além da heterogeneidade dos mesmos. Esta grandeza também depende do alargamento instrumental do equipamento. O tamanho do cristalito (grão) e a presença de microdeformações são informações que se obtém analisando a grandeza referida.

Determinação da Estrutura e Tamanho de Grão

A identificação e indexação das fases foram efectuadas por comparação dos valores das distâncias interplanares dos difractogramas obtidos com os das tabelas das fichas ICDD⁴.

O tamanho do cristalito ou grão foi calculado segundo a fórmula de *Scherrer* (Sodré, 1996):

$$D_g = \frac{0,9 \lambda}{FWHM \cos \theta} \quad (4.2)$$

⁴ International Centre for Diffraction Data

que relaciona o tamanho médio de grão, D_g , com a largura a meia altura dos picos difractados, FWHM. λ e θ referem-se ao comprimento de onda da radiação e à posição da linha de difracção, respectivamente.

A largura de um dado pico de difracção é tanto maior quanto menor for o tamanho de grão, sendo este alargamento traduzido por uma curva do tipo *Lourentziana*. Contudo, a presença de defeitos num sólido interferem com as distâncias interplanares resultando numa dispersão de valores e conseqüentemente alargamento do pico de difracção. Este efeito é traduzido por uma curva do tipo *Gaussiana* (Louro, 2000). Tomando em consideração ambas as contribuições para o alargamento do pico, a influência do tamanho dos cristalitos e das microtensões, na determinação da posição e correspondente largura a meia altura do pico de difracção efectuou-se a desconvolução dos picos que apresentavam assimetrias evidentes, com recurso ao programa *Origin®* utilizando uma função tipo *Voigt*, que é a convolução das funções *Gaussiana* e *Lourentziana*.

Philips X'Pert

Os ensaios de análise estrutural foram efectuados com recurso ao difractómetro *Philips*, modelo *X'Pert* com goniómetro PW 3020/00, sob tensão de 40 kV e uma intensidade de corrente de 35 mW, equipado com um detector unidireccional em arco de círculo de 120° com uma resolução de 0,03°. A ampola de raios-X possui um anticátodo de cobalto ($K_{\alpha 1}=1,78896 \text{ \AA}$ e $K_{\alpha 2}=1,79285 \text{ \AA}$). Para análise dos difractogramas procedeu-se à eliminação do efeito da componente $K_{\alpha 2}$ através do programa auxiliar do equipamento.

Os ensaios foram realizados em modo rasante, com ângulo de incidência de 2°, passo 0,04° e tempo de aquisição de 1s por canal.

O difractómetro utilizado tem a possibilidade de operar a altas temperaturas (HTXRD), acoplando-se uma câmara de marca *Anto Paar*, modelo HTR16, que possui um filamento de platina, permitindo o aquecimento da amostra até à temperatura de 1500°C. Os ensaios a quente foram efectuados em atmosfera redutora (Ar/H₂) para pressões de 5Pa, modo rasante com intervalo de difracção $20^\circ < 2\theta < 80^\circ$ e ciclo térmico com começo à temperatura ambiente e término a 750°C com um aumento gradual de 100°C.

4.1.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

Na área da nanotecnologia, o tamanho minimalista das estruturas impede que o microscópio óptico seja um recurso válido. O microscópio electrónico de varrimento devido à sua elevada resolução, elevada profundidade de campo associado geralmente à técnica de espectroscopia de dispersão de raios-X, permite o estudo da morfologia, espessura e composição pontual semi-quantitativa dos revestimentos.

Princípio de Funcionamento

Um feixe de electrões é gerado a partir de uma pequena região da superfície de um cristal por efeito de campo. A aplicação de um campo eléctrico muito intenso na vizinhança do emissor origina a emissão de electrões que ultrapassam a função de trabalho da superfície por efeito de túnel. Pela aplicação de uma diferença de potencial, 1-30 kV, os electrões são acelerados para o ânodo. O potencial determina a energia cinética do feixe de electrões emitido que ao atravessar o sistema óptico constituído por uma lente condensadora e uma lente objectiva é finamente focado. Seguidamente, um conjunto de bobines de varrimento deflectem o feixe e realizam o varrimento numa sequência de linhas paralelas ao longo da zona observada no ecrã (Sá & Monteiro, 2011; Skoog, 2002). O feixe de electrões ao interagir com a amostra provoca a emissão de radiação (figura 4.1), corpuscular e electromagnética, que é colectada por detectores específicos. Frequentemente é associado ao SEM um ou mais espectrómetros de raios-X, possibilitando uma análise da composição química elementar num dado ponto. Em todo o processo existe uma correspondência entre o local de incidência do feixe na superfície e o pixel da imagem cujo brilho representa a intensidade da radiação emitida (1, 2011).

Formação da imagem

A interacção do feixe de electrões com a amostra provoca a emissão de radiação, nomeadamente electrões. No espectro de emissão de electrões produzidos por electrões primários distinguem-se essencialmente, figura 4.3, (Castanhola, 2010):

- um pico relativamente fino, correspondente aos electrões retrodifundidos;
- uma bossa causada por electrões secundários, com um máximo nas energias de 10 eV;
- picos saindo da bossa anterior, correspondendo a electrões Auger.

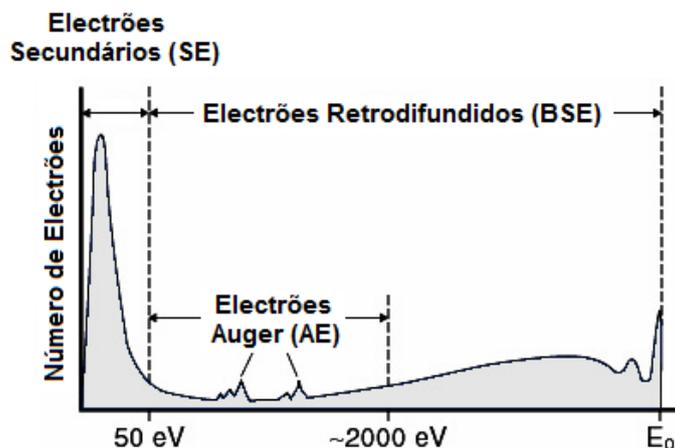


Figura 4.0.3: Espectro de emissão de electrões.

[Fonte adaptada - http://www4.nau.edu/microanalysis/Microprobe-SEM/Images/Electron_Spectrum.jpg].

Os electrões secundários têm origem em interacções inelásticas dos electrões primários com os electrões atómicos, sendo o sinal proveniente de uma profundidade de cerca de 10 nm. Caracterizam-se por possuir energias entre 1 e 10 eV, sendo a intensidade essencialmente função da topografia e portanto a imagem criada será o contraste do sinal topográfico (Cahn, 2005; 2, 2011). Estes electrões são colectados por um detector (3, 2011) constituído por um ecrã de material cintilador cuja emissão de luz é detectada e amplificada através de um fotomultiplicador que gerará um sinal eléctrico, produzindo uma imagem da topografia.

Os electrões retrodifundidos provêm de interacções elásticas entre os electrões primários e os átomos da amostra, sendo provenientes de regiões até 1 μm de profundidade. A intensidade deste sinal é função da orientação da amostra relativamente ao feixe e do número atómico desta, permitindo obter contraste de número atómico, ou seja, informação relativa à variação da composição química da amostra. Os detectores utilizados são geralmente semicondutores ou cintiladores (12, 2011).

FEI Quanta 400F

No estudo morfológico dos filmes utilizou-se um microscópio da marca FEI, modelo Quanta 400F que tem acoplado um sistema de microanálise com um espectrómetro por dispersão de energia. As condições de operação foram 15 kV de tensão de aceleração e pressão na câmara de aproximadamente 90 Pa.

A morfologia em secção transversal foi observada após fracturar a amostra por impacto no lado oposto ao substrato, tendo adquirido imagens com recurso a detectores de electrões secundários e electrões retrodifundidos.



Figura 4.0.4. Montagem do equipamento FEI Quanta 400F situado na Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

4.1.4. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÓMICA

A técnica de deposição e os materiais intervenientes promovem um dado tipo de morfologia, referenciado no capítulo 3, que modela as propriedades do material, nomeadamente a rugosidade. A rugosidade por influenciar o valor do ângulo de contacto, dureza e interações biológicas é um parâmetro relevante que pode ser determinado com recurso à microscopia de força atómica. Esta técnica permite obter um mapa da superfície a três dimensões com elevada resolução, extraíndo-se a rugosidade.

Forças interatómicas

No estado sólido e líquido à uma organização atómica estável promovida por forças atractivas, significando que o sistema possui menos energia comparadamente com os átomos constituintes livres (Dias, 2006). A energia necessária para separar os átomos de um composto é determinada pela subtracção à soma das energias dos átomos livres a energia do composto, denominando-se a energia resultante por energia coesiva (Tsymbal, 2011). A curva típica que descreve a energia de interacção de dois átomos em função da distância entre eles é presente na figura 4.5. Uma vez que a força interatómica é o gradiente da energia segundo a distância interatómica:

$$F(R) = -\frac{\partial U}{\partial R} \quad (4.3)$$

retira-se que para $R > R_0$ a energia aumenta gradualmente aproximando de 0 quando R tende para infinito e neste caso a força é atractiva. Quando $R < R_0$ a energia aumenta rapidamente, tendendo para o infinito quando R é 0, que corresponde a forças de interacção repulsivas. O ponto R_0 é denominado por distância interatómica de equilíbrio verificando-se a anulação das forças mencionadas anteriormente. As forças repulsivas fundamentam-se no princípio de exclusão de Pauli enquanto as forças atractivas, designadas genericamente por van der Waals são constituídas por três componentes: interacções de Keesom, interacções de Debye e interacções de London (Dias, 2006; Giessibl, 2003).

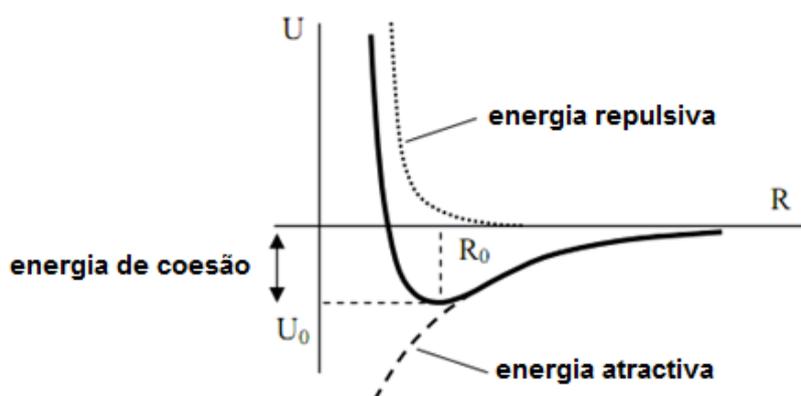


Figura 4.0.5. Energia de interacção entre dois átomos em função da distância entre eles. As forças repulsivas regem-se pela equação b/r^n , sendo b característico da substância, r a distância e n é variável mas em geral superior a 6. As forças atractivas são descritas pela razão $-a/r^6$. Dado que n é, geralmente, superior a 6, as forças de repulsão só se tornam relevantes para distâncias interatómicas muito pequenas.

[Fonte adaptada – Dias, 2006].

Princípio de Funcionamento

A microscopia de força atómica baseia-se na interacção de uma ponta aguçada, geralmente de Si ou Si_3N_4 com um raio de curvatura de 4-40 nm, montada na extremidade de uma haste (*cantilever*), com a superfície da amostra. Devido às forças interatómicas entre a ponta e a superfície, o *cantilever* deflecte proporcionalmente à força segundo a lei de Hooke:

$$F = -kx \quad (4.4)$$

sendo F as força interatómicas, k uma constante do material *cantilever* e x a deflexão.

A deflexão do *cantilever* é detectada pela reflexão de um feixe laser no mesmo e recolhida por um fotodíodo. A divisão do fotodíodo em quatro partes permite que o feixe colectado se posicione nos quadrantes e da partilha de intensidade e posição nos quadrantes é construída o mapa topográfico (Cahn, 2005).

As distâncias a que ocorrem estas interacções definem três modos de operação: contacto, não contacto e intermitente (*tapping*). O modo contacto ($<0,5$ nm), actua na região das

forças repulsivas, é considerado um modo estático devido à não oscilação do *cantilever* durante o varrimento. Os modos dinâmicos, não contacto (0,1-10 nm) e intermitente (0,5-2 nm), actuam predominantemente na região das forças atractivas e caracterizam-se pela oscilação mecânica da ponta próxima da sua frequência de ressonância. A interacção ponta-superfície provoca a alteração da frequência de ressonância reproduzindo-se na deflexão do *cantilever* (Manning *et al.*, 2003). Esta variação é proporcional à variação das forças interatómicas e consequentemente reflecte a distância da ponta à superfície. A equação 4.5 reflecte a quantificação das forças interatómicas na frequência de ressonância.

$$f_0 = \sqrt{\frac{k_{ef}}{m}} \quad (4.5)$$

sendo k_{ef} a constante efectiva da força que é igual à constante de força do *cantilever* menos as alterações de força verificadas e m a massa do *cantilever*. A oscilação mecânica é monitorizada pelo fotodíodo como explicado anteriormente. O movimento da ponta é conseguido através da realimentação do sinal do fotodíodo aos sensores piezoeléctricos da amostra

Quantificação da rugosidade

A partir dos dados recolhidos por AFM pode-se caracterizar a superfície em termos de parâmetros de rugosidade, a saber: rugosidade média, R_a , o valor máximo entre pico e vale, R_z , valor quadrático médio da altura da superfície em relação ao valor médio, R_q , entre outros. Além destes, os parâmetros *skewness* e *kurtosis*, parâmetros adimensionais, avaliam as diferenças entre vales e picos. O *skewness* mede a simetria da superfície em relação ao plano médio através da equação 4.8, e consoante o valor seja positivo ou negativo predominam picos ou vales, respectivamente. O *kurtosis*, equação 4.9 é um parâmetro que mede a “textura” da superfície sendo mais sensível a desvios do que o *skewness*. Valores do *kurtosis* superiores a 3 traduzem a presença de muitos vales e picos enquanto inferiores ao valor referido significa baixa assimetria de vales e picos.

Os parâmetros mais utilizados utilizados são R_a e R_q . A rugosidade média, R_a , é determinada a partir da média aritmética do desvio da altura da superfície em relação a uma linha média do perfil. A rugosidade quadrática média, R_q , é a raiz quadrada do desvio à linha média. A linha média é definida de modo a que as áreas do perfil traçadas acima e abaixo dela sejam idênticas.

Analiticamente, é dada por:

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |z| dx \quad \text{e} \quad R_q = \sqrt{\left[\frac{1}{L} \cdot \int_0^L (z(x))^2 \right]} \quad (4.6 \text{ e } 4.7)$$

$$R_{sk} = \frac{1}{L^2 \cdot R_q^3} \sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^L z_{ij}^3 \quad \text{e} \quad R_{ku} = \frac{1}{L^2 \cdot R_q^4} \sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^L z_{ij}^4 \quad (4.8 \text{ e } 4.9)$$

sendo z a altura da superfície acima da linha média, x a origem da linha média, L o comprimento total do perfil analisado.

Veeco di Innova

O equipamento utilizado neste ensaio é da marca Veeco (Bruker) e modelo di Innova. O material das pontas é Si_3N_4 referenciados Bruker RTESPA-CP, com frequência de ressonância, f_0 , de 291-326 kHz e constante de força, k , 20-80 Nm^{-1} .

Foram realizados varrimentos $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ e $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ com resolução de 512 linhas e frequência variável 0,6-0,8 Hz em modo intermitente.

Analiticamente, os dados foram analisados com recurso ao programa Gwiddion (16, 2011) para obter valores de rugosidade média. As imagens tridimensionais foram processadas no programa WSxM 4.0. (Horcas *et al.*, 2007).



Figura 4.0.6: Equipamento Veeco Di Innova pertencente ao Centro de Engenharia de Materiais da Universidade de Coimbra.

4.1.5. NANOINDENTAÇÃO

A dureza e o módulo de elasticidade derivam fundamentalmente de dois factores: as ligações interatómicas e o empacotamento dos átomos. As ligações primárias, covalente e

iónica, predominam no tipo de ligações que ocorrem em materiais cerâmicos, já a estrutura de empacotamento não segue um padrão, dependendo dos átomos intervenientes de modo a que a energia da estrutura seja mínima (Ashby & Jones, 2007).

Para medição das duas grandezas referidas e porque o material em estudo são filmes finos recorreu-se à nanoindentação devido a esta minimizar a influência do substrato aquando da aquisição de dados. É aconselhável que a profundidade de penetração não ultrapasse 10% da espessura do filme (Cahn, 2005).

Conceito da nanoindentação

A deformação em corpos sólidos relaciona-se com a tensão que a causou (Costa & Almeida, 2004). Detalhadamente, aquando da aplicação de uma dada tensão num material verifica-se primeiramente deformação elástica e seguidamente deformação plástica. A primeira é descrita por uma relação linear entre a tensão e a deformação, lei de *Hooke*, desaparecendo após a anulação das forças que a geraram. A deformação plástica caracteriza-se por uma deformação permanente, motivada pelo escorregamento dos planos atômicos.

O ensaio inicia-se com o movimento do indentador em direcção à superfície da amostra, com elevada precisão, através da passagem de corrente (dita a carga) por uma bobina que é atraída por um íman. A posição do indentador relativamente à amostra é monitorizada com recurso a um sensor diferencial capacitivo. Durante o protocolo (fase carga, fluência e descarga) são adquiridos dados da carga aplicada e da posição do indentador (profundidade de indentação), sendo gerada a figura 4.7 (Mann, 2005).

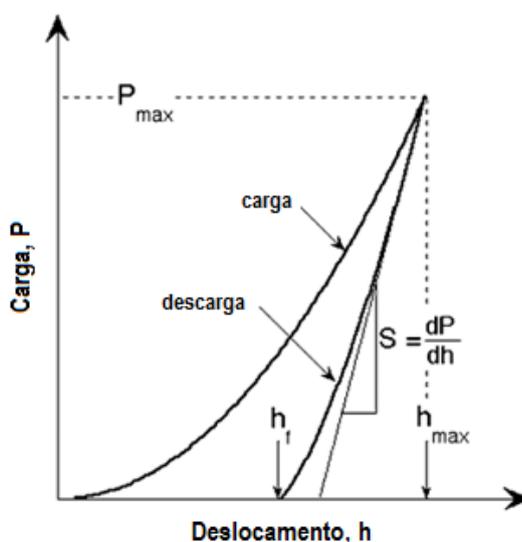


Figura 4.0.7: Curva de tensão - deslocamento evidenciando medidas importantes para os cálculos pretendidos. P_{max} refere-se à carga máxima, h_{max} é a profundidade máxima, S o declive da tangente à curva de descarga e h_f profundidade de contacto residual relacionada como a deformação plástica que permanece após o recuo do indentador. [Fonte adaptada – Oliver e Pharr, 2004]

O método Oliver e Pharr (Oliver e Pharr, 2004) permite o cálculo da dureza e módulo de elasticidade baseando-se especificamente na análise da curva de descarga. A dureza é determinada segundo a razão entre a carga máxima aplicada durante o ensaio, P_{max} , e a área de contacto entre o indentador e a amostra no início da fase de descarga projectada na superfície da amostra, A_c ⁵.

$$H = \frac{P_{max}}{A_c} \quad (4.10)$$

Dos dados obtidos temos a carga máxima aplicada, faltando apenas o cálculo da área projectada na superfície da amostra. A área é descrita por uma função polinomial de segundo grau, equação 4.11, com constantes A, B e C que tomaram valores 7960,318753, 1958,592748 e 20,22352894, respectivamente.

$$A_c = A + Bh_c + Ch_c^2 \quad (4.11)$$

sendo h_c a profundidade de deformação plástica. A determinação deste valor é conseguida recorrendo a um algoritmo que começa por realizar um ajuste aos dados da curva de descarga através da equação 4.12 seguido da derivada dos dados ajustados de modo a obter a profundidade h_f que esta relacionada com a elasticidade do material e consequentemente com a dureza.

$$P = \alpha (h - h_f)^m \quad (4.12)$$

onde P é a carga, h a profundidade de indentação e, m e α constantes que dependem da forma do indentador.

A profundidade de deformação plástica é obtida aplicando a equação 4.13., onde τ é uma constante que depende da forma do indentador, que para o Berkovich é de cerca de 0,75.

$$h_c = h_{max} - \tau(h_{max} - h_i) \quad (4.13)$$

⁵ Idealmente, para a forma do indentador Berkovich a $A_c = 24,5(h_c)^2$

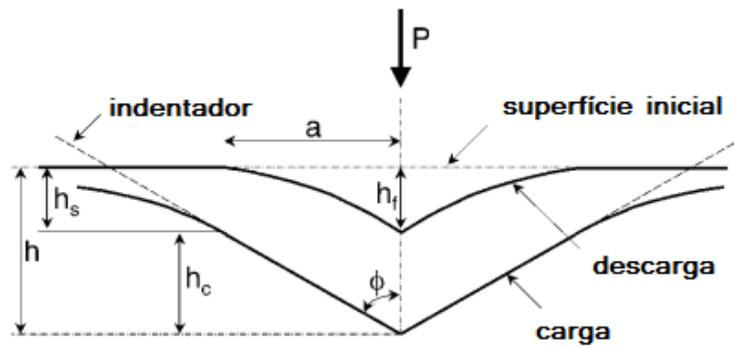


Figura 4.0.8: Parâmetros relacionados com a geometria de indentação, durante o processo de descarga.

[Fonte adaptada – Oliver e Pharr, 2004]

Além do cálculo da dureza é ainda possível determinar o módulo de elasticidade dos revestimentos, através do módulo de elasticidade reduzido, E_r .

$$\frac{1}{E_r} = \left(\frac{1-\nu_i^2}{E_i} \right) + \left(\frac{1-\nu_m^2}{E_m} \right) \quad (4.14)$$

em que

$$E_r = \frac{dP}{dh} \frac{\sqrt{\pi}}{2\sqrt{A_c}} \quad (4.15)$$

E representa o módulo de elasticidade e ν o coeficiente de Poisson, os índices i e m referem-se ao indutor e amostra respectivamente.

MicroMaterials NanoTest

O equipamento utilizado neste ensaio é da marca *MicroMaterials* e simplificada é constituído por um sistema de carga de base electromagnética aliado a um sistema capacitivo que permite identificar a posição do indutor. O porta amostras é movimentado segundo as direcções XYZ mediante três motores. Pela conjugação do hardware e software permite a aquisição, registo e tratamento de dados. Os dados são processados pelo programa *NanoTest Platform*.

Em cada ensaio foram realizadas dezasseis indentações com uma carga máxima de 5 mN.

4.1.6. ÂNGULO DE CONTACTO

O modo de interacção de uma superfície sólida com as moléculas de um determinado líquido é um factor a ter em conta aquando do desenvolvimento de um dado material, projectando-se este de acordo com a sua aplicabilidade. Diversos factores intervêm nesta interacção, contudo podem-se diferenciar os mesmos de acordo com a origem, composição

química, rugosidade, cristalinidade e energia livre de superfície inerente à superfície sólida; tensão superficial do líquido e a factores externos, como a temperatura e a atmosfera.

O modo de interacção referido traduz-se na molhabilidade de um sólido, propriedade inferida através da determinação do ângulo de contacto entre a superfície do material e o líquido.

Forças coesivas, adesivas e interfaciais

As moléculas de um determinado líquido mantêm-se unidas por intermédio de forças intermoleculares, designadas forças coesivas. A intensidade dessas forças determina a tensão superficial do líquido, que é definido como a energia por unidade área. Tal como os líquidos, uma superfície sólida também possui uma tensão superficial, definida como a energia média dispendida para criar uma superfície de área unitária (Bonn *et al.*, 2009; Kocevan, 2005).

O contacto entre uma gota de um líquido e uma superfície sólida releva a competição entre as forças coesivas do líquido e as forças adesivas líquido/sólido, na qual o balanço é ditado pela maior ou menor facilidade de o líquido aderir ao sólido, designado energia de adesão (Rocha, 2010). Esta é a energia necessária para separar uma área unitária da interface líquido/sólido, e criar duas interfaces: sólido/ar e líquido/ar. A necessidade referida advém do facto de o desequilíbrio de forças intermoleculares existente na interface líquido/ar e sólido/ar ser consideravelmente superior à interface entre fases condensadas, sendo portanto termodinamicamente mais favorável. A equação de Dupré (equação 4.16) expressa a energia de adesão como o resultado algébrico das tensões superficiais do sólido, γ_S , líquido, γ_L , e sólido/líquido, γ_{SL} (Prechtel, 2005; Zisman, 1964).

$$W_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL} \quad (4.16)$$

Método Young-Laplace

Considere-se uma gota de líquido de raio r numa superfície sólida, figura 4.9. O balanço das forças coesivas e adesivas tenderá para o equilíbrio, estado esse que está relacionado com o ângulo que o líquido forma com a superfície sólida, através da equação de *Young* (4.17) (Prechtel, 2005):

$$\gamma_S = \gamma_{SL} + \gamma_L \cos\theta \quad (4.17)$$

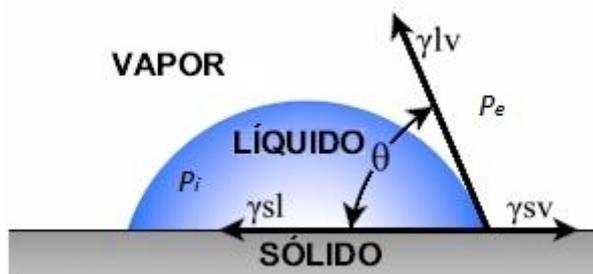


Figura 4.0.9. Ângulo de contacto e tensões superficiais.

[Fonte adaptada - <http://www.ramehart.com/images/ca1.jpg>]

Por outro lado, a tensão superficial actua de modo a minimizar a área de superfície e consequentemente o volume da gota, enquanto a diferença de pressão interna, P_i , e externa, P_e , actua no sentido contrário. Quando estas duas tendências se contrabalançarem é alcançado o equilíbrio. A força resultante do efeito da tensão superficial, γ , é igual a $2\pi r\gamma$, sendo $2\pi r$ o comprimento da circunferência. A força exercida pela diferença de pressão terá um valor de $(P_i - P_e)\pi r^2$. Em equilíbrio, as duas forças igualar-se-ão surgindo a expressão 4.18, equação de *Young-Laplace* (Pellicer *et al.*, 2011):

$$(P_i - P_e) = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (4.18)$$

sendo R_1 e R_2 os raios de curvatura principais da interface.

Contudo a equação de *Young* quando aplicada a sistemas reais não é reproduzível, pois o ângulo de contacto em equilíbrio pode não ser igual ao ângulo de contacto estático medido. Nesse sentido, a influência da rugosidade no valor do ângulo de contacto é descrita pelos modelos de Wenzel e Cassie-Baxter. O modelo de Wenzel assume que o líquido estabelece contacto com toda a superfície rugosa, preenchendo as suas depressões. A influência da rugosidade é descrita pelo factor rugosidade, r , calculado pela razão entre a área real e a área geométrica da superfície (Kamusewitz e Possart, 2003):

$$\cos\theta^w = r \cos\theta \quad (4.19)$$

Uma vez que o factor rugosidade é sempre superior a 1, o modelo prevê que quando se toma em conta a rugosidade:

- o ângulo de contacto decresce para $\theta < 90^\circ$, ou seja, $\theta^w < \theta$;
- o ângulo de contacto aumenta quando $\theta > 90^\circ$, o que implica $\theta^w > \theta$.

Inversamente, o modelo Cassie-Baxter (Bico, 1999), descrito pela equação 4.20., assume que o líquido não molha completamente a superfície rugosa, devido à permanência de ar entre as depressões da superfície.

$$\cos\theta^{CB} = -1 + \varphi(1 + \cos\theta) \quad (4.20)$$

onde φ é a fracção de sólido em contacto com líquido. Do modelo conclui-se que quanto menor for a área de sólido em contacto com líquido, maiores serão os ângulos de contacto. Sendo a fracção sempre inferior a 1, este modelo prevê um aumento do ângulo de contacto, θ^{CB} , independentemente do ângulo de contacto medido, θ .

Apesar destes dois modelos preverem ângulos de contacto diferentes para a mesma superfície rugosa, Patankar (2003) postula que a forma que uma gota adopta na superfície sólida nem sempre corresponde ao estado de energia mínimo do sistema, e que a diferença dos modelos pode residir num fosso metaestável que pode ser atingido por aplicação de um estímulo exterior (Bico, 1999; Koishi *et al.*, 2009).

DataPhysics OCA20

Os ângulos de contacto foram obtidos com recurso ao equipamento *DataPhysics*, modelo *OCA20*, auxiliados com o software *SCA20*. Os principais dispositivos do sistema são a câmara CCD, o sistema de vídeo, uma lâmpada de halogéneo e uma seringa micrométrica (4, 2011). O método usado para determinação do ângulo de contacto foi a gota séssil. 10 μL de água destilada foram adicionados à superfície sólida por uma seringa micrométrica com diâmetro de agulha de 0,52 mm. Aproximadamente um segundo após o contacto da gota com o material capturou-se a imagem respectiva através de câmara CCD (Sony H3). Os ensaios realizaram-se à temperatura ambiente. O procedimento descrito foi repetido dez vezes para cada material. O método de cálculo do ângulo de contacto começa por atribuir uma posição de linha de base e uma linha de contorno da gota. Estas linhas são determinadas pelo cálculo das diferenças de brilho num pixel e nos pixéis adjacentes para toda a imagem, correspondendo às posições de máximo contraste (Rocha, 2010). De referir que frequentemente há necessidade de ajustar a linha de base manualmente. Posteriormente, à linha de contorno é ajustada uma função corresponde à equação de *Young-Laplace*.

4.2. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

A adaptação da prótese ao coto é um processo moroso e em última instância nunca é perfeito, devido às constantes alterações da aerodinâmica corporal sustentada nas alterações do equilíbrio pela ausência do membro. O contacto entre a pele e o material testado revela-se importante no sentido de proporcionar ao paciente o conforto e segurança desejados. Neste sentido, fez-se uma primeira avaliação *in vitro* do impacto do material em estudo na viabilidade de diferentes tipos celulares.

4.2.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

A avaliação de um material como potencial para aplicações biomédicas rege-se por normas internacionais, nomeadamente ISO⁶ e ASTM⁷. A norma ISO/EN 10993 estipula que para dispositivos em contacto com a pele por tempo superior a trinta dias⁸, estes sujeitar-se-ão a ensaios de citotoxicidade, irritabilidade e sensibilidade (13, 2011).

A viabilidade celular pode ser avaliada com recurso a vários métodos que avaliam o indicador celular: integridade da membrana plasmática, síntese de ADN, actividade enzimática, presença de ATP, redução de determinados compostos, entre outros. No método escolhido a avaliação do comportamento citotóxico do material *in vitro*, é realizada pela capacidade de redução mitocondrial do composto resazurina.

Os resultados dos testes *in vitro* fornecem uma ferramenta de estudo importante que irá permitir uma primeira selecção da composição menos agressiva para a viabilidade celular. Contudo os resultados obtidos não devem ser directamente extrapolados para *in vivo*, já que nestes os parâmetros de ensaio não são controlados, há mecanismos de regulação e eliminação de substâncias tóxicas, a estrutura de crescimento celular é tridimensional, e o meio de crescimento possui diversos componentes sistémicos envolvidos na regulação homeostática, ao contrário do sistema *in vitro* (Freshney, 2000).

4.2.1.1. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Nos testes de citocompatibilidade, as amostras de material devem ser adaptadas ao tamanho das placas de cultivo. Cada poço de uma placa de 24 poços tem um diâmetro de aproximadamente 15,4 mm, o que traduzido nas dimensões do material a testar significa amostras de 1,0x1,0 cm². Deste modo maximizou-se a área do material de forma a que este ficasse encaixado no fundo do poço e totalmente emergido no meio de cultura.

A esterilização das amostras decorreu no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical marca *Telstar*[®], procedendo-se à passagem das amostras primeiramente por etanol 70% e consecutivamente por três recipientes com água ultrapura estéril, deixando-se secar à temperatura ambiente dentro da referida câmara.

Com a ajuda de uma pinça estéril, colocou-se o material no fundo de cada poço, com a face do revestimento orientada para cima.

⁶ International Standards Organization

⁷ American Society for Testing and Materials

⁸ Salvo manutenção do dispositivo ou inadaptação do paciente



Figura 4.0.10: Amostra dos materiais a testar. TiO₂, Ag₁, Ag₂, Ag₃ e Ag₄ em substrato vidro (esquerda para a direita em cima), em baixo o mesmo material após tratamento térmico.

4.2.1.2. CULTURA DE CÉLULAS

Fibroblastos embrionários de ratinho inactivados com mitomicina C (P2⁹), originários de embrião de ratinho com 14 dias de gestação, foram mantidos em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM D5671 - *Sigma*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inactivado (FBS) (20min. a 37°C), 1% (v/v) de streptomomicina e 1,5%(v/v) de bicarbonato de sódio. As células foram mantidas numa incubadora em atmosfera húmida, regulada para a temperatura de 37°C com 5% de dióxido de carbono. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Após atingir-se confluência celular, as células foram destacadas do plástico com tripsina e a concentração celular ajustada.

A linha celular BJ5ta (*ATCC CRL4001*), fibroblastos de pele humana imortalizados com sobreexpressão telomerase, foi mantida de acordo com as recomendações da ATCC¹⁰: 4 partes DMEM contendo 4mM L-glutamina, 4,5g/L glucose, 1,5g/L bicarbonato de sódio e 1 parte de meio 199 suplementado com 10%(v/v) de soro fetal bovino e 1%(v/v) streptomomicina. As células foram mantidas em atmosfera húmida, a 37°C e 5% de dióxido de carbono. O meio foi renovado a cada dois dias.

4.2.1.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR: ALAMAR BLUE

O reagente Alamar Blue[®] (*Invitrogen*) (14, 2011) incorpora um indicador da actividade metabólica da célula, a resazurina. A resazurina é um composto de cor azul, não tóxico e permeável à membrana celular que em presença de redutases mitocondriais é reduzido a resorufina, composto de cor avermelhada. Quanto menor for a viabilidade celular, menor será a quantidade de resazurina reduzida e menor o sinal espectrofotométrico.

⁹ Passagem 2 significa que foram congeladas após retiradas do rato, descongeladas e congeladas novamente.

¹⁰ American Type Culture Collection

O protocolo passa por adicionar 10% (v/v) de alamar a cada poço de uma placa de 24 poços, e medir a absorvância a 570nm tendo como referência 600 nm após 1-5h. 570 nm e 600 nm são os comprimentos de onda para os quais se verifica uma maior absorvância de resorufina e resazurina, respectivamente.

O espectrofotómetro utilizado é da marca *Molecular Devices*, modelo Spectramax 340PC, auxiliado pelo software Softmax®.

4.2.1.4. ENSAIO CONTACTO INDIRECTO

No método de contacto indirecto incuba-se o material durante alguns dias em meio de cultura, o tempo suficiente para que haja eventual libertação de substâncias do material para o meio. Posteriormente, este meio condicionado é adicionado às células, já aderidas à placa, e a viabilidade celular é depois avaliada através de um indicador celular.

Todos os procedimentos envolvendo células animais foram realizados respeitando as regras de trabalho em assepsia.

Para condicionamento do meio, para tal adicionou-se 600 µL de meio *DMEM* a cada poço contendo as amostras do material. A placa de 24 poços foi selada com parafilme para evitar contaminações e evaporação, e colocou-se na estufa a 37°C durante o período de tempo respectivo (24 e 126h).

Para descongelar as células, a aliquota de MEF's congelados foi rapidamente aquecida em banho de água a 37°C para 10mL de meio de cultura, centrifugando-se depois durante 7 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 1 mL de meio. Para avaliar a viabilidade celular, adicionou-se 1 parte (20 µL de azul triptano (0,4%) a 20 µL da suspensão de células num microtubo e contou-se as células viáveis com auxílio de uma câmara de *Neubauer*.

Para uma concentração de 100000 células/mL, adicionou-se o volume de meio necessário e aplicou-se 10000 células por poço (100 µL) numa placa de 96 poços. Após 24h de incubação, verificou-se a morfologia e confluência das células ao microscópio óptico. Aspirou-se o meio de cada poço (placa 96 poços) e aplicou-se 100 µL do meio condicionado.

Como controlo negativo utilizou-se apenas células cultivadas com meio *DMEM* e como controlo positivo (tóxico) as células foram expostas a 30% de dimetilsulfóxido (DMSO – *Sigma D2438*).

As células foram mantidas em atmosfera húmida a 37°C e 5% de CO₂ durante 24, 48 e 72h de incubação. No final de cada um destes períodos adicionou-se o reagente de viabilidade celular Alamar Blue.

Em cada tempo após 5h de reacção procedeu-se à medição da viabilidade celular.

O protocolo foi repetido para o tempo de condicionamento de 126h (5 dias), com uma ligeira diferença porque se adicionou-se 10 µL de L-glutamina ao meio com células, devido ao tempo de cultura mais prolongado.

Este procedimento foi efectuado em triplicado. A disposição do material condicionado é semelhante à ilustração da figura 4.12, com a placa dividida verticalmente 1 e 5 dias e sem controlo positivo.

4.2.1.5. ENSAIO CONTACTO DIRECTO

Neste método, as células são expostas directamente ao material durante alguns dias, ao fim do qual é medida a viabilidade celular.

As células BJ5ta mantidas em cultura num frasco de 75 cm², foram lavadas com PBS¹¹ (1%) e adicionou-se 2 mL de tripsina (0,25%) para as destacar do plástico. Após 2 minutos de incubação a 37°C, observaram-se as células ao microscópio para garantir que o processo decorria com sucesso. 8 mL de meio de crescimento foram adicionados ao frasco e posteriormente transferiu-se a solução para um fálcon.

Para determinar a concentração de células, misturou-se 1 parte de azul triptano (0,4%) a 1 parte de suspensão de células num microtubo e contou-se o número de células viáveis recorrendo a uma câmara *Neubauer*. Ajustou-se a concentração da suspensão de células para 160000 células/mL. Aplicou-se 500 µL da suspensão a cada poço da placa de 24 poços. Após incubação de 24h, adicionou-se 50 µL de Alamar Blue a cada poço e continuou-se a incubação durante 5h a 37°C. Para medir a absorvância, removeu-se 100 µL de cada poço da placa de 24 e aplicou-se num poço da placa de 96, em duplicado. O meio restante foi aspirado e removeu-se o meio de cultura (500 µL) para posterior repetição do procedimento às 72h. O protocolo foi realizado em triplicado.

4.2.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO

A pele saudável sem lesões é uma barreira impenetrável a microorganismos (Claus, 1989), no entanto em pacientes amputados o órgão está debilitado e por isso o risco de infecções cutâneas e sistémicas revela-se um problema. Neste sentido, interessa-nos avaliar se os materiais produzidos impedem a proliferação destes microorganismos.

O estudo antimicrobiano é composto por dois tipos de testes, qualitativos e quantitativos, nos quais se recorre a microorganismos que pertencem à flora da pele: *Escherichia coli* K12 HB 101, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Candida albicans* ATCC 18804.

¹¹ Phosphate-Buffered physiological Saline

4.2.2.1. MICROORGANISMOS

A bactéria *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*, possui forma em bastonete, de diâmetro aproximadamente 0,5 µm e comprimento 1,5 µm. É uma bactéria Gram negativa, cuja célula é revestida pela membrana citoplasmática, uma parede celular fina de mureína. Em alguns casos observa-se a presença de cápsula, camada de polissacarídeos, que a protege do ambiente e facilita a adesão a superfícies. É uma bactéria anaeróbia facultativa, sendo mesófila, pode crescer a temperaturas entre 8°C e 48°C, tendo 39°C como temperatura ótima de crescimento. Cresce em ambientes com pH neutro (6-8) podendo crescer mais lentamente em ambientes com pH próximo do referido.

Staphylococcus aureus é uma bactéria que faz parte da classe *Bacilli* e família *Staphylococcaceae*. Morfologicamente, apresenta-se com configuração esférica de diâmetro entre 0,5 - 1,5 µm, parede celular Gram positiva constituída essencialmente por peptidoglicanos e ácidos teicóicos associados (Pelczar *et al.*, 1981). São organismos quimioorganotróficos com metabolismo respiratório fermentativo. São anaeróbios facultativos que crescem rapidamente sob condições aeróbias. A temperatura ótima de crescimento situa-se gama 35°-40°C. Relativamente ao pH crescem numa vasta gama, desde 4,8 a 9,4, resistindo a condições extremas, nomeadamente a temperaturas elevadas, 60°C por 30 minutos (Crossley *et al.*, 2009). Encontram-se normalmente associados à pele, glândulas cutâneas e mucosas de animais de sangue quente.

Candida albicans é um microorganismo eucariota, pertencente ao reino *Fungi* e à família *Saccharomycetales*. É uma levedura que habita comensalmente em diversos tecidos epiteliais causando infecções locais e sistémicas. Morfologicamente, dependendo do ambiente onde se insere alterna entre a forma de levedura e a forma filamentosa. A referida variação é um factor que promove a patogenicidade, permitindo à levedura a adaptação a diferentes ambientes. O dimorfismo relaciona-se com modificações na síntese da parede celular que por sua vez está ligado aos nutrientes e gases do meio, nomeadamente à concentração de glucose e dióxido de carbono (Cardoso, 2004; Reijnt, 2010). A temperatura ideal de crescimento é 30°C para a forma em levedura e 37°C para a forma filamentosa. Além do dimorfismo, a capacidade de formação de biofilmes torna a levedura multiresistente à resposta imunológica e a antifúngicos, devido à alteração fenotípica (Reijnt, 2010).

4.2.2.2. MEIOS DE CULTURA

Em qualquer ser vivo, o crescimento é um processo dinâmico que requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e manutenção da célula (Sousa & Ferreira, 1998). Nas bactérias o crescimento e reprodução estão ligados, dividindo-se por fissão binária

(Singleton, 1997). Quanto à levedura, *C. albicans*, esta reproduz-se por gemulação ou tubos germinativos, dependendo do ambiente onde se insere, dividindo-se por mitose.

Tabela 4.0.2. Condições habituais de cultura em meio líquido ou sólido, para os microorganismos estudados.

Microorganismo	Tempo de geração ¹²	Temperatura	Meio	Meio Líquido	
				Agitação	V _{meio} : V _{ar}
<i>C. albicans</i>	1h14min (Cowen et al., 2001)	30°C	YEPD ¹³	200 rpm	1:5
<i>E. coli</i>	19min (Irwin et al., 2010)	37°C	NA ¹⁴	200 rpm	1:5
<i>Aureus</i>	27min (Langevin et al., 1999)	37°C	NA	200 rpm	1:5

Bactérias e leveduras requerem diferentes nutrientes para o seu crescimento, o que leva a que os meios de crescimento defiram quanto à composição. O meio de crescimento utilizado para a levedura é composto por 1% de extracto de levedura, 2% de peptona, 2% de glucose. Já o meio de crescimento para bactérias é composto por 0,3% de extracto de carne, 1% de peptona e 0,5% de cloreto de sódio. A preparação dos meios sólidos implica a adição de 2% de agar. Todos os constituintes são dissolvidos em água destilada, sendo posteriormente levados ao autoclave durante 20 min a 120°C.

As condições de cultura dos microorganismos estão exemplificadas na tabela 4.2.

4.2.2.3. DETERMINAÇÃO DO HALO DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO

O ensaio para determinar o halo de inibição do crescimento dos microorganismos anteriormente citados é baseado no método *Kirby-Bauer*, recomendado pela NCCLS¹⁵, organização aprovada pela FDA¹⁶ e WHO¹⁷.

A necessidade de adaptação do protocolo advém do uso de agentes antimicrobianos sólidos ao invés do uso de agentes líquidos. As alterações efectuadas tiverem o fundamento referido tendo em consideração a difusão de substâncias em líquidos e sólidos. Por outro lado, qualquer adaptação requer uma optimização dos parâmetros intervenientes, sendo impossível

¹² Intervalo de tempo necessário para que uma célula se divida

¹³ Yeast Extract Peptone Dextrose – composição descrita no texto

¹⁴ Nutrient Agar – *idem*

¹⁵ National Committee for Clinical Laboratory Standarts

¹⁶ Food and Drug Administration

¹⁷ World Health Organization

a comparação de resultados por inexistência dos mesmos, o ensaio é fundamentalmente qualitativo. O procedimento utilizado consistiu nas seguintes etapas:

- 1- Preparação do pré-inóculo no meio e condições mais adequadas ao crescimento de cada microorganismo durante 16-24h;
- 2- Preparação do inóculo via diluição do pré-inóculo a uma densidade óptica de 0,1 no respectivo meio de cultura contendo 0,5% de agar pré-aquecido;
- 3- Imediatamente, o inóculo é vertido sobre placas (11x11 cm²) contendo o meio sólido tradicional, de modo a cobrir toda a superfície (aproximadamente 15-20 mL);
- 4- Colocação dos materiais em posições previamente estudadas, com auxílio de uma pinça estéril; os materiais foram dispostos considerando o efeito antimicrobiano esperado de modo a que os supostos halos não se sobrepusessem;
- 5- Incubação das placas à temperatura óptima de crescimento de cada microorganismo durante 24h;
- 6- Obtenção de fotografias de cada placa com recurso ao equipamento *ChemiDoc XRS*.

4.2.3.4. DETERMINAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICA RELATIVA

Num sistema fechado, a curva de crescimento de bactérias pode ser analisada na totalidade. A curva compreende quatro fases, como exemplificado na figura 4.11: fase inicial, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte. A fase exponencial caracteriza-se pela duplicação de células num intervalo de tempo designado tempo de geração (tabela 4.2). Em organismos unicelulares, o crescimento da população resulta do aumento do número de células que pode ser seguido através da turbidez do meio (Madigan et al., 1997).

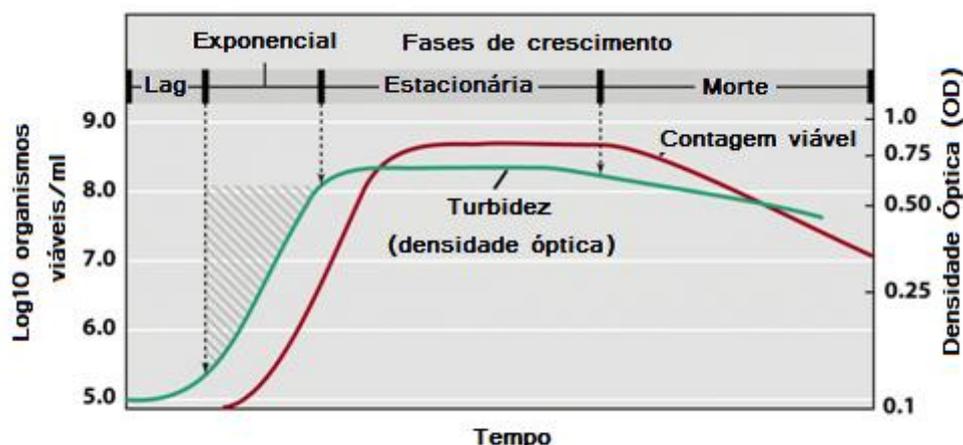


Figura 4.11: Curva típica de crescimento das bactérias.

[Fonte adaptada: http://people.rit.edu/~gtfsbi/IntroMicro/20071images/O6_F08.jpg]

O método quantitativo baseia-se na lei de *Beer-Lambert* (15, 2011) que relaciona a absorvância (densidade óptica), A , com a concentração de uma dada substância num meio, c , a distância percorrida pela luz no meio, d , e com um factor descritivo da substância, s .

$$A = sdc \quad (4.21)$$

Sendo assim, o sinal eléctrico é directamente proporcional à densidade óptica do meio, que por sua vez é directamente proporcional à concentração da substância. No entanto há que fazer uma salvaguarda, a densidade óptica depende da luz absorvida, reflectida ou refractada, não havendo distinção entre células vivas e células mortas. Por esse motivo, esta técnica é essencialmente usada até se atingir a fase estacionária. A taxa de crescimento específica é determinada pelo declive da recta na fase exponencial.

O protocolo de determinação da taxa de crescimento consistiu nas seguintes etapas:

- 1- Condicionamento dos meios de cultura NB e YEPD: o material (1,5x1,5 cm²) foi incubado com 2mL de meio estéril durante 5 dias, numa incubadora a 37°C;
- 2- Preparação do pré-inóculo no meio e condições mais adequadas ao crescimento de cada microorganismo durante 16 a 24h;
- 3- Preparação do inóculo via diluição do pré-inóculo a uma densidade óptica de 0,1 no respectivo meio de cultura;
- 4- Inoculação do meio condicionado: em gelo, adicionou-se a 450 µL de cada meio condicionado, 50 µL do inóculo (ponto 3);
- 5- Pipetagem em triplicado de 100 µL de cada meio condicionado para placas de 96 poços, como identificado na figura 12;
- 6- Incubação das placas à temperatura óptima de crescimento de cada microorganismo durante 6h, medindo a DO a determinadas intervalos de tempo, 0,5 e 1h.



Figura 4.12: Disposição das soluções condicionadas na placa de 96 poços, para os microorganismos *E.coli* e *Aureus*. Da linha A a D refere-se a um microorganismo e E a H ao outro. A *Candida albicans* foi incubada numa placa diferente de modo a respeitar a temperatura óptima de crescimento.

5. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEOR DE PRATA NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS FILMES

5.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química elementar dos revestimentos foi avaliada pela técnica EPMA, cuja profundidade de análise varia consoante as condições de operação, entre 50 e 2000 nm.

A composição elementar dos vários filmes, expressa na tabela 5.1, é o resultado da média de pelo menos quatro aquisições pontuais na superfície das amostras. Constatou-se que os revestimentos com composição de prata significativa tinham uma composição heterogénea, visualizada a olho nu pelas diferentes colorações.

Verifica-se que de uma forma geral, o aumento da espessura acompanha o aumento de prata, e a figura 5.2 mostra que uma pequena fracção de área de prata proporciona uma elevada composição do elemento no revestimento. Olson *et al.* (1979) reporta que quando um material composto é bombardeado por partículas energéticas, o elemento de menor massa atómica é preferencialmente pulverizado. Uma vez que a prata possui uma maior massa atómica relativamente ao titânio, 107,9 u.m.a. para 47,9 u.m.a. era esperado um empobrecimento de prata no revestimento, o que não aconteceu. No modo reactivo, pela elevada reactividade do titânio com o oxigénio há a possibilidade da formação de compostos de estequiometria variável à superfície do alvo, processo denominado por “envenenamento”. Kandasamy & Surplice (1980) experienciaram a dissolução do oxigénio na rede do titânio em alguns segundos. Neste caso, o processo de pulverização é passível de ser invertido tendo

em conta a massa atómica dos compostos e as ligações interatómicas. Ocorreria então uma elevada pulverização da prata e através da imposição de pressões reduzidas, 0,25 Pa, tornando o percurso livre médio das partículas da mesma ordem de grandeza da distância interelectrodos, 7 cm, o fluxo de elementos à saída do alvo mantinha-se à chegada ao substrato. Este facto explica por um lado o grande teor de prata incorporado no filme e por outro a dificuldade em controlar o mesmo teor, mesmo recorrendo a áreas reduzidas de pastilhas de prata.

Tabela 5.1. Composição elemental dos revestimentos, e respectiva espessura e taxa de deposição.

Filme	Composição Química (% at.)			Espessura (nm)	Taxa de deposição (nm/min)
	O	Ti	Ag		
TiO ₂	70,9	29,1	0	190	3,18
Ag1	72,0	27,9	0,1	320	5,37
Ag2	62,2	24,9	12,8	750	12,57
Ag3	54,3	22,4	23,3	2000	33,33
Ag4	49,7	22,6	27,7	1360	22,67

A polarização negativa do substrato e o uso de pressões reduzidas, tem como objectivo a formação de microestruturas compactas. O bombardeamento do revestimento em crescimento por neutros reflectidos não termalizados e iões de árgon com energias elevadas provoca a ejeção preferencial do elemento mais leve, Ti ou O, ocorrendo teoricamente um empobrecimento destes elementos no revestimento final (Cavaleiro, 1990).

Zhang *et al.* (2002) menciona a importância do fluxo e a pressão parcial de oxigénio na estequiometria do TiO₂. A relação entre a percentagem atómica de O e Ti bem como de O e Ti+Ag está representada na figura 5.1. Pode-se inferir que a razão de O/Ti mantém-se elevada permanecendo praticamente constante. Significa isto que o decréscimo de O acompanha o de Ti, o que expressa desde logo a elevada reactividade entre os dois elementos e o papel Ti na incorporação de O no filme em crescimento.

Como seria de esperar, o aumento do teor em prata provoca uma diminuição gradual e estequiométrica dos teores de oxigénio e titânio. Esta “ocupação” de lugar por parte da prata foi demonstrada por Zakrzewska *et al.* (2003) que referem que a taxa de deposição dos metais nobres é muito superior à do alvo de titânio oxidado, o que se traduz num aumento do teor em prata durante o crescimento do filme.

Por outro lado, a deposição em atmosfera reactiva conduz ao aumento da pressão na câmara, o que conduz a uma diminuição de intensidade de neutros e iões, ocorrendo em menor intensidade a repulverização do Ti e O. Este facto, conduz ao aparecimento de

revestimentos com morfologia colunar aberta e com uma elevada densidade de defeitos. O uso da prata potencia o aparecimento destas estruturas, devido ao aumento do efeito sombra pela organização das partículas de prata em ilha. Acresce que a posição das pastilhas de prata no alvo é de enorme importância, e neste caso particular pequenos desajustes podem contribuir para o aumento do efeito sombra. Todos estes factores podem ter contribuído para a heterogeneidade dos revestimentos.

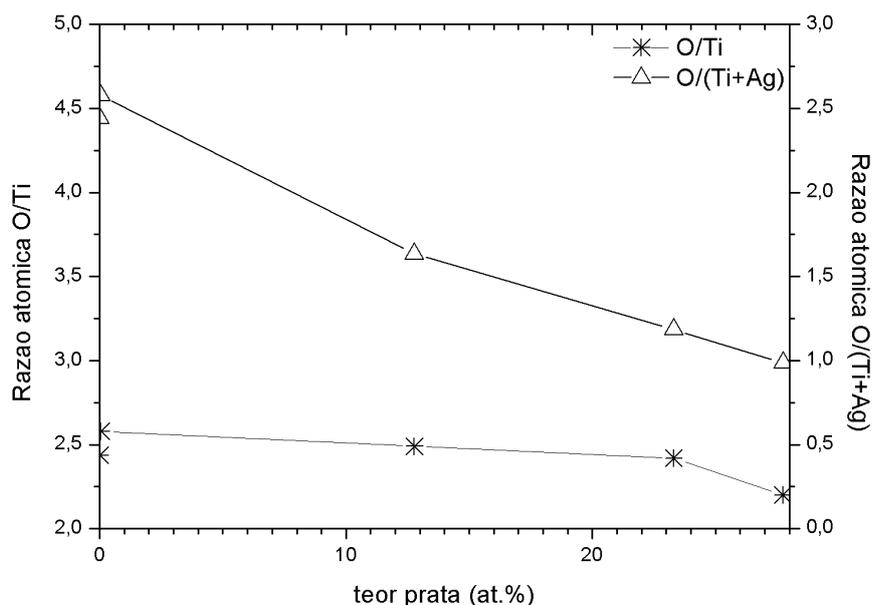


Figura 5.1: Razão atômica O/Ti e O/Ti+Ag em função do teor de Ag.

No que respeita à composição elementar, para além dos elementos expectáveis, Ti-O-Ag, foram ainda detectadas quantidades residuais de carbono ($\sim 1-2$ % at.). A presença destas impurezas nos filmes pode ser atribuída ao teor residual no interior da câmara de deposição e à contaminação proveniente da manipulação das amostras. Atribui-se à última razão o motivo principal e por isso calculou-se a percentagem dos restantes elementos para a soma atômica de 100%.

Tal como referido no capítulo 3, o procedimento utilizado para variar o teor em Ag consistiu em fixar pastilhas, com área variável, daquele elemento na zona de maior erosão do alvo de Ti. Partindo da razão entre a área de pastilhas de Ag fixadas e a área do alvo de Ti, estabeleceu-se uma relação entre o teor em prata nos filmes e a razão entre as áreas descritas, ilustrado na figura 5.2. Verifica-se que para razões de áreas de $0 - 0,002$, o teor deste elemento na superfície dos filmes é residual. O motivo pode ser a distribuição de Ag na matriz de TiO_2 . Para valores de razão de áreas acima de $0,0025$ constata-se uma relação directa entre a percentagem de prata e razão de áreas, segundo a equação:

$$\text{Teor Ag} = 1592,61 x + 9,14 \quad (5.1)$$

sendo x a razão de áreas e o teor de prata em percentagem atômica. Esta regressão linear tem um coeficiente $R^2=0,986$.

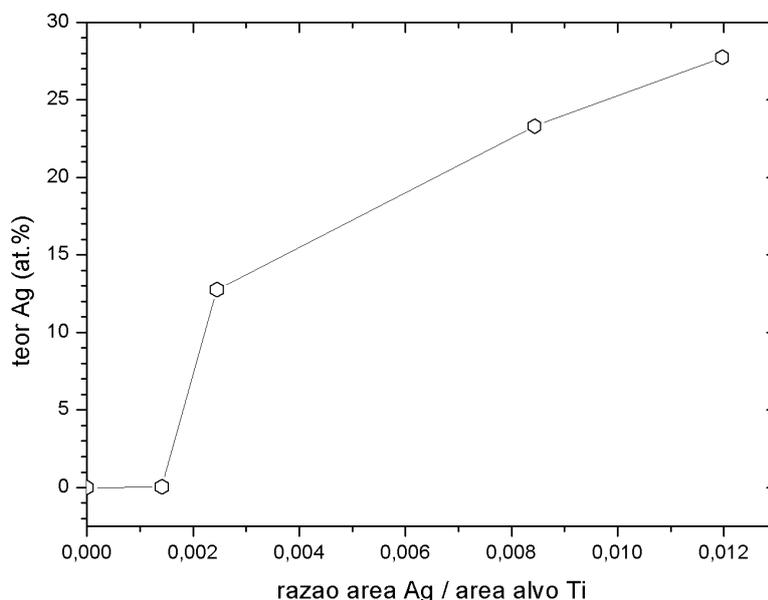


Figura 5.2: Variação do teor de prata em função da razão das áreas de prata e titânio. O ajuste linear aos três últimos pontos da recta forneceu um coeficiente de correlação $R=0,986$.

Deste modo é possível estimar e produzir filmes TiO_2 dopado com prata recorrendo à técnica e parâmetros utilizados. Vaz *et al.* (2011) e Torrell *et al.* (2011) recorrendo às mesmas condições experimentais obtiveram filmes de TiO_2 com teor em prata comprovado pela equação 5.1.. A fraca reactividade da prata com o oxigénio e a não incorporação da prata na rede estrutural do TiO_2 promove a difusão e agregação da mesma em complexos mais estáveis (Hansen *et al.*, 2010) o que pode induzir que a partir de um determinado teor esses processos predominam no filme, assistindo-se a um aumento considerável de Ag.

No que concerne à taxa de deposição, esta é determinada pela razão entre a espessura e o tempo de deposição. Observa-se da tabela 5.1, que o aumento da prata contribui para o aumento da espessura. A ausência de prata nos revestimentos TiO_2 e Ag1 deve aumentar a probabilidade de ligação Ti-O, tornando o alvo facilmente oxidado que se revela numa baixa taxa de deposição. O aumento da pressão da câmara pelas partículas de prata tem como consequência a diminuição do caminho livre médio pelo aumento da colisão entre partículas, chegando ao substrato partículas com baixa energia. Esta situação não promove a difusão à superfície o que desencadeia a formação de estruturas irregulares que o efeito de sombra

potencia. Este factor adicionado à maior pulverização da Ag no alvo, contribui para a relação directa entre o aumento da espessura e o teor em Ag. Decorre do referido que o aumento da espessura apesar de relacionar-se com a taxa de deposição, não se refere à energia das partículas depositadas.

5.2. ESTRUTURA E TAMANHO DE GRÃO

A estrutura dos revestimentos foi analisada através da difracção de raios-X, cujos difratogramas obtidos estão representados na figura 5.3 acompanhados da indexação dos planos cristalinos.

Genericamente, as estruturas anatase e rutilo amorfizam com o aumento de prata no filme, bem como há um aumento da ordem estrutural da prata a longa distância para composições de prata superiores a 23 % at..

Pormenorizadamente, no filme TiO_2 verifica-se a presença das estruturas cristalinas anatase (ICDD – card. N 84-1286) e rutilo (ICDD – card. N 88-1175), com os planos cristalográficos de maior intensidade identificados. Ambas as estruturas são tetragonais. A ordem estrutural foi alcançada pela polarização do substrato e baixas pressões de deposição, que fez com que as partículas de Ti e O tivessem energia e mobilidade suficientes para se organizarem a longas distâncias (Martin *et al.*, 1997).

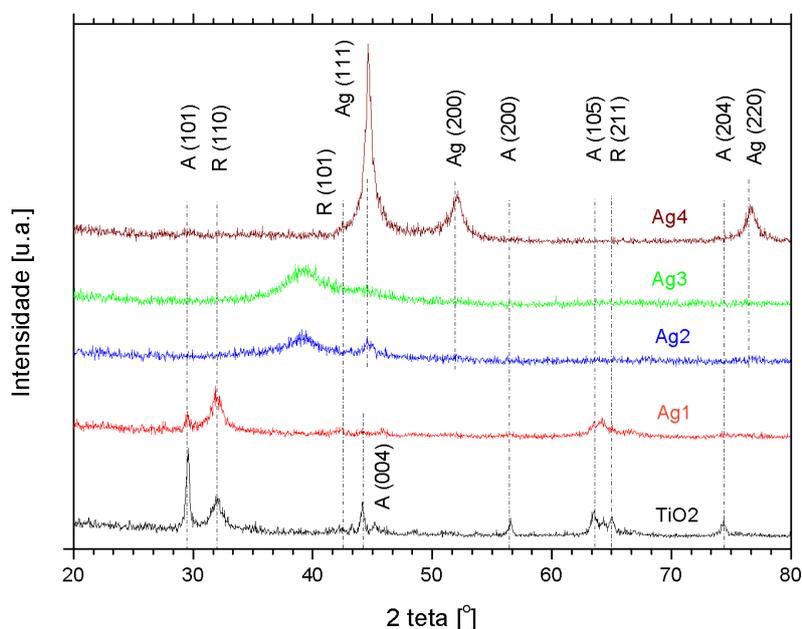


Figura 5.3:: Difratograma de raios-X dos diferentes revestimentos como depositados, obtidos em modo rasante.

Löbl, figura 2.4, atesta a possibilidade de formação de anatase e rutilo recorrendo à técnica pulverização catódica modo magnetron, utilizando temperaturas de substrato baixas. Zhang *et al.* (2004) refere a possibilidade de formação da anatase para temperaturas de deposição a partir de 80°C, o que é plausível acontecer durante a deposição devido ao aquecimento do substrato por troca de quantidade de movimento com as partículas bombardeantes. A transformação anatase-rutilo é alvo de pesquisa incessante com base na aplicação e potenciação das propriedades fotocatalíticas desses cristais. Zhang & Banfield (2000) estudaram essa transformação e chegaram à conclusão que a mesma é termodinamicamente dependente do tamanho de grão. A anatase é mais estável para tamanho de partículas inferiores a 11 nm, enquanto que para tamanhos superiores a 35 nm o rutilo é a fase mais estável (Amin *et al.*, 2010). Segundo Amin, a deposição de partículas de baixa energia favorece o crescimento da anatase devido ao seu crescimento de grão ocorrer mais rapidamente do que o do rutilo. O facto da densidade da fase amorfa ser semelhante à da anatase é uma constatação dessa afirmação. Desse ponto de vista, a presença de rutilo indica a elevada energia com que se procedeu a deposição, permitindo o rearranjo e crescimento de grão. Para relacionar a percentagem de anatase e rutilo nos revestimentos procedeu-se ao cálculo da fracção de rutilo nos dois filmes segundo a fórmula (Gribb & Banfield, 1997):

$$W_R = \frac{A_R}{0,884A_A + A_R} \times 100 \quad (5.2)$$

W_R é a percentagem relativa de rutilo face à anatase, A_R é a intensidade integral do pico (110) do rutilo e A_A a intensidade integral do pico (101) da anatase. Esta fórmula não é rigorosa pois compreende determinadas condições experimentais, que não foram mimetizadas na presente trabalho. Obtiveram-se percentagens de rutilo para os revestimentos TiO₂ e Ag1 de 27% e 24%, respectivamente. Esta percentagem é significativa, mostrando que o valor do tamanho de grão da anatase está relacionado com a transformação de fases tal como reportou Mwabora *et al.* (2004). A pequena diferença de percentagem pode-se dever ao efeito inibidor do engrossamento de grão pela Ag. Vaz *et al.* (2011) obteve resultados semelhantes, inferindo que a prata pode estar dispersa na matriz de TiO₂, fundamentando o retardamento no aumento da barreira de activação de cristalização de Ti-O. Este efeito, é claramente observado nos difratogramas Ag2 e Ag3 (10-20 % at.), onde uma maior incorporação de prata induziu amorfização das fases TiO₂. Paralelamente, a prata exhibe baixa ordem estrutural. O pico de prata relativo ao plano (111) conflui com uma estrutura amorfizada. Uma vez que as bossas largas são difíceis de indexar, pois ocupam uma gama de ângulos de difracção onde se sobrepõe diversas fases, procedeu-se à desconvolução ajustando uma função tipo Voigt. A desconvolução do Ag3 é representada na figura 5.4.

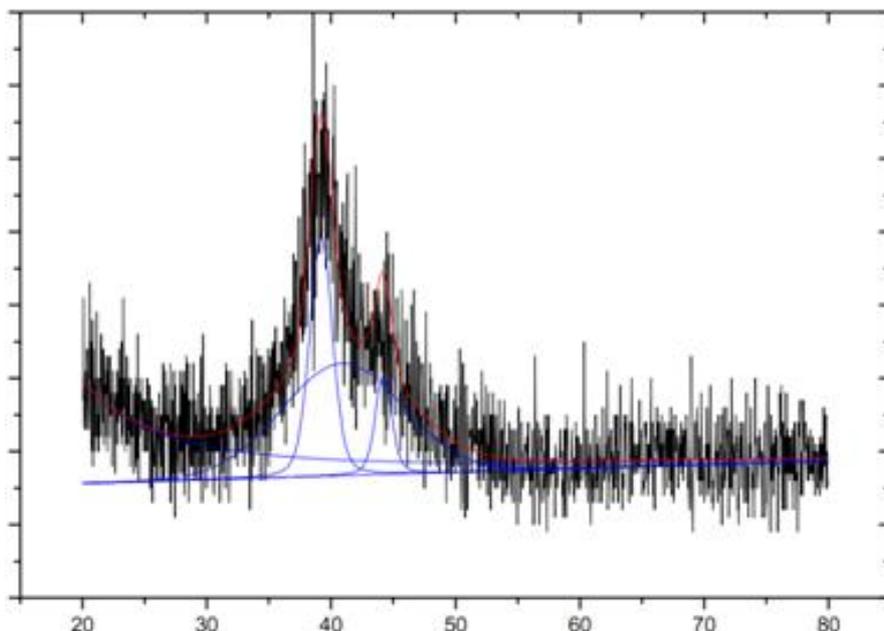


Figura 5.4: Desconvolução da bossa amorfizada no revestimento Ag3.

Verifica-se uma bossa de elevada área e com pouca intensidade posicionada em $2\theta = 40,89^\circ$. Foi possível ainda introduzir dois picos $2\theta = 39,19^\circ$ e $2\theta = 44,21^\circ$. O pico na posição $44,21^\circ$ é indexado ao plano (111) da prata. O outro pico e a bossa podem corresponder a fases metaestáveis de TiO_2 ou a uma mistura de fases. A heterogeneidade na composição química aliada ao facto da estequiometria $\text{O}/(\text{Ti}+\text{Ag})$ variar de 1,2 a 1,6 para estes filmes levanta a possibilidade de formação de compostos ternários, nomeadamente $\text{Ag}_2\text{Ti}_4\text{O}_9$ (ICDD card. N 32-1028) e $\text{Ag}_2(\text{TiO}_3)^n$ (ICDD card. N 88-0670). Estas estruturas monoclinicas podem ser indexadas nesta gama de ângulos 2θ , no entanto seria necessário proceder a outros ensaios estruturais para confirmar a sua presença. Por outro lado, devido ao raio atómico e iónico da prata serem elevados, estes átomos não são incorporados intersticialmente na rede de TiO_2 , actuando como elementos substitucionais de Ti^{4+} (Liu *et al.*, 2003). Segundo Chao & Liu (2010) e Seery *et al.* (2005) a existência de Ag à superfície do TiO_2 actua como local de nucleação, e que ao favorecer a transformação anatase-rutilo há retorno de energia capaz de oxidar a Ag. A oxidação da Ag em superfícies TiO_2 , pode explicar o comportamento dos filmes Ag2 e Ag3. O óxido mais estável da Ag, Ag_2O ($\Delta_f G^\circ = -5 \text{ KJ/mol O}_2$ a 273°C) (ICDD card. N 41-1104), indexado na gama considerada levando a crer que de facto se trata desta estrutura. Horakova *et al.* (2009) obteve Ag_xO_y recorrendo à mesma técnica de produção de filmes usada neste trabalho. De qualquer forma é inconclusiva a estrutura apresentada.

No filme Ag4 observa-se ordem estrutural a longa distância, cristalizando a prata na estrutura cúbica de faces centradas, ocorrendo picos de difracção nas posições $2\theta = 44,62^\circ$,

$2\theta = 52,18^\circ$ e $2\theta = 76,62^\circ$. O ligeiro desvio da posição dos picos para valores inferiores aos previstos na ficha pode ser devido a tensões residuais de compressão.

O tamanho de grão foi determinado pela fórmula de *Scherrer* pelo método da largura do integral do pico de difracção, que corresponde à largura de um rectângulo de área e altura igual à do pico de difracção, depois de lhe ser subtraído o ruído de fundo. Para os filmes TiO_2 e Ag1 o tamanho de grão da anatase e rutilo são semelhantes, com valores aproximadamente de 33 e 10 nm respectivamente. O aumento da incorporação de prata provocou como já foi referido o aumento da cristalinidade desta e por conseguinte o tamanho de grão. O Ag2 regista um tamanho de grão de 11,8 nm, Ag3 de 18,3 nm e o Ag4 18,7 nm. Este aumento é explicado pela minimização da energia superficial e intersticial da textura (111) para metais com estrutura cúbica de faces centradas (Thompson, 2000). A facilidade de difusão da prata na matriz amorfa proporciona o fenómeno de coalescência de grãos mais pequenos com maiores (Meldrum *et al.*, 2001). A partir de 20%at. de Ag o tamanho de grão mantém-se constante, o que poderá dever-se à presença de impurezas ou à preferência de crescimento por outros planos cristalográficos identificados.

A determinação dos parâmetros de rede não foi realizada por insuficiência de número de planos cristalográficos respeitantes às fases anatase e rutilo.

5.3. MORFOLOGIA E TIPO DE CRESCIMENTO

A análise da morfologia por microscopia electrónica de varrimento permitiu a avaliar a espessura dos revestimentos e aferir através das imagens obtidas, em modo electrões secundários e electrões retrodifundidos, o tipo de crescimento do filme. Os revestimentos apresentaram espessuras heterogéneas, procedendo-se ao cálculo da média como representado na tabela 5.1.

A morfologia de filmes finos obtidos por pulverização catódica é classificada recorrentemente através do modelo Thornton, figura 3.3, que relaciona aquela com os parâmetros de deposição. No presente estudo recorrer-se-á ao modelo referido.

A figura 5.5 mostra duas micrografias referentes aos filmes TiO_2 e Ag1 em secção transversal.

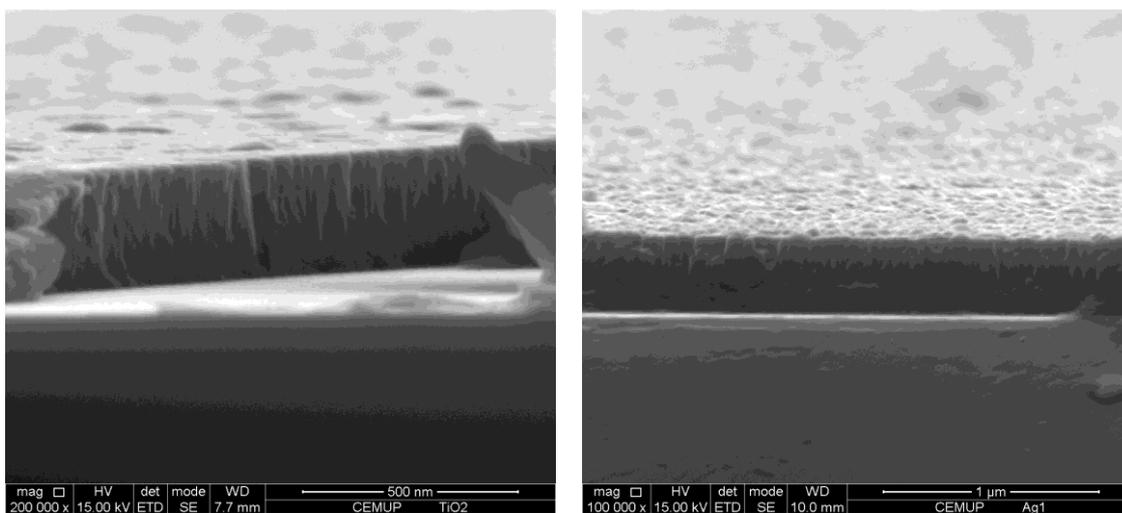


Figura 5.5: Micrografias da secção transversal dos filmes, TiO₂ e Ag₁, posição esquerda e direita respectivamente.

Os filmes apresentam uma morfologia do tipo I segundo o modelo de Thornton. Esta microestrutura revela a formação de colunas muito estreitas, indicativas da proximidade com a morfologia de transição T. A formação destas microestruturas é concordante com o material depositado, neste caso praticamente TiO₂, bem como com os parâmetros de deposição seleccionados. A polarização negativa do substrato e a reduzida pressão na câmara favorecem a formação de morfologias mais compactas segundo diferentes fenómenos (Louro, 2000):

- aumento da mobilidade dos adátomos de modo a permitir uma maior difusão superficial das espécies adsorvidas no substrato, antes de serem colocadas em posições de baixa energia;
- aumento do número de pontos de nucleação, contribuindo para uma diminuição do efeito sombra;
- eliminação da morfologia colunar e nivelamento da superfície, devido ao efeito erosivo provocado pelo bombardeamento das espécies energéticas.

O efeito da pressão reduzida da câmara para obtenção de filmes de TiO₂ com elevada compacticidade, tipo I a pender para o tipo T, foi avaliada pelos investigadores Viseu & Ferreira (1999) com a mesma técnica de produção de filmes, tendo alcançado resultados similares aos obtidos neste trabalho.

A adição de metais nobres, como o ouro e prata, ao revestimento TiO₂ promove o crescimento de microestruturas menos compactas devido à capacidade de difusão, coalescência e baixa reactividade dos metais com o oxigénio e titânio.

Na figura 5.6 encontram-se duas micrografias referentes aos revestimentos Ag₂ e Ag₃, respectivamente.

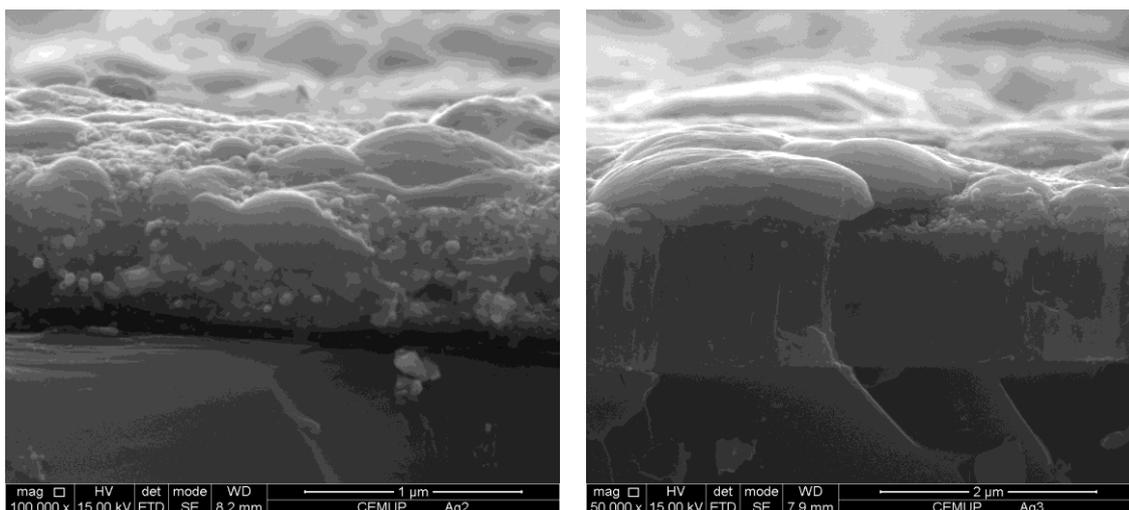


Figura 5.6: Micrografias dos revestimentos Ag2 e Ag3, em secção transversal.

O fenómeno de coalescência da prata é reportado por vários autores (Arcos *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2011; Vaz *et al.*, 2011). Este efeito decorre da maior estabilidade dos aglomerados de prata e que juntamente com a elevada solubilidade da prata na matriz de TiO_2 promovem a formação de aglomerados de dimensões consideráveis. Na figura 5.6, a micrografia referente ao filme Ag2 mostra isso mesmo, uma estrutura desorganizada em que aglomerados de Ag de grandes dimensões cobrem a superfície do revestimento. A formação desta morfologia parece ter decorrido do fenómeno efeito sombra, em que há o crescimento preferencial de locais com espessura maior. Numa análise mais atenta verifica-se a presença de pequenos aglomerados de Ag em redor de aglomerados maiores, o que pode ser um sinal evidente da difusão da Ag na matriz em direcção à superfície. Este fenómeno é facilitado pela fase amorfa da matriz.

Constata-se na micrografia do revestimento Ag3 a presença de colunas largas, morfologia tipo I, o que pressupõe pouca compactação do filme e no limite superior do revestimento ocorrem agregados com dimensões superiores aos do revestimento anteriores com a particularidade de possuírem uma forma característica de aglomerados de Ag de grandes dimensões. Vaz *et al.* (2011) através do mesmo processo de deposição constatou a variação da forma dos agregados segundo as dimensões dos mesmos, referindo que partículas e agregados de baixas dimensões tinham configuração esférica enquanto que os maiores aglomerados tinham forma ovóide.

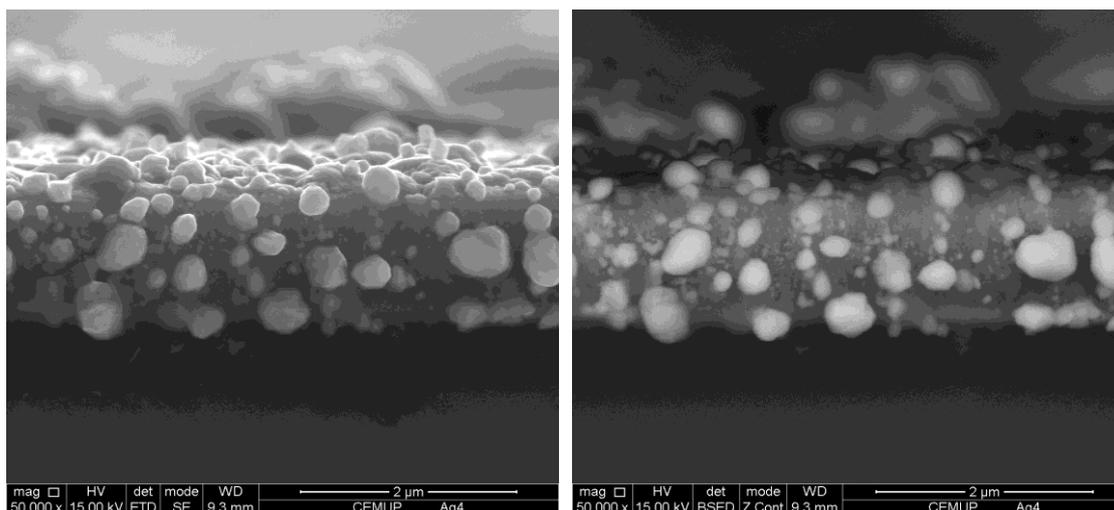


Figura 5.7: Micrografias do revestimento Ag4, obtidas pelo modo electrões secundários e electrões retrodifundidos.

As micrografias da figura 5.7, revelam uma morfologia completamente diferente dos restantes revestimentos. Neste filme, Ag4, os pequenos agregados de Ag parecem distribuídos homogeneamente pela matriz de TiO₂. A organização aparente do filme é revelada pela cristalinidade da Ag, inferindo-se que o facto de não ocorrer formação de grandes aglomerados é devido à maior compacticidade da matriz que dificultou a difusão da prata. Um dos objectivos deste trabalho passava pela produção de revestimentos com nanopartículas de prata embebidas na matriz de TiO₂, tendo sido alcançado parcialmente. A micrografia obtida pela modo electrões retrodifundidos mostra claramente os aglomerados de prata distribuídos pelo filme.

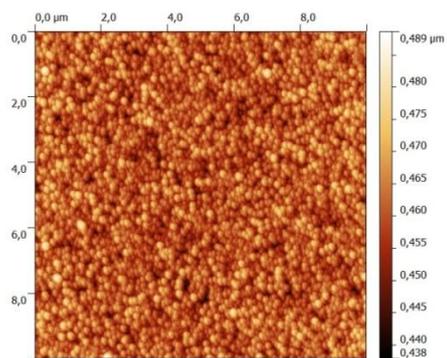
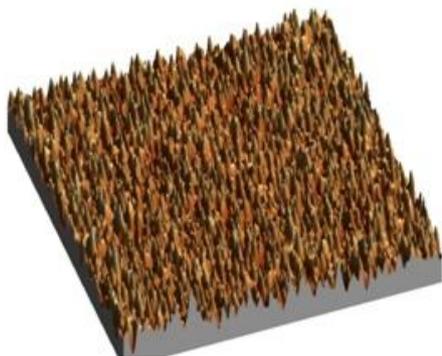
As diferenças morfológicas não permitiram traçar um quadro evolutivo da microestrutura em função do teor em Ag, o que de certo modo vai de encontro à ideia estabelecida de que os parâmetros de deposição controlam pormenorizadamente o tipo de morfologia (Musil, 2006).

5.4. RUGOSIDADE

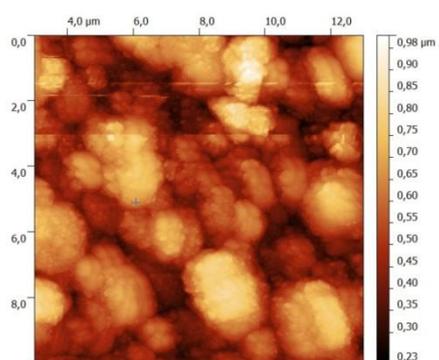
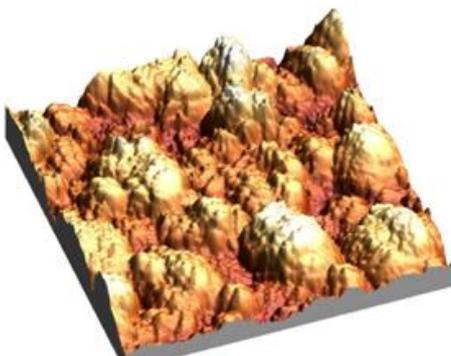
A microscopia de força atómica permitiu obter imagens bidimensionais e tridimensionais da superfície dos revestimentos, bem como os valores de rugosidade média, R_a , rugosidade quadrática média, R_q , área real e distribuição do tamanho das partículas na superfície. Devido a limitações técnicas, disponibilidade do equipamento, todos os revestimentos foram analisados à excepção do Ag1.

Aos dados obtidos impôs-se um filtro *plane* e as imagens 10x10 µm² estão representadas na figura 5.8..

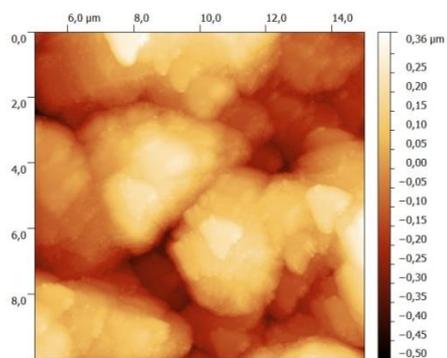
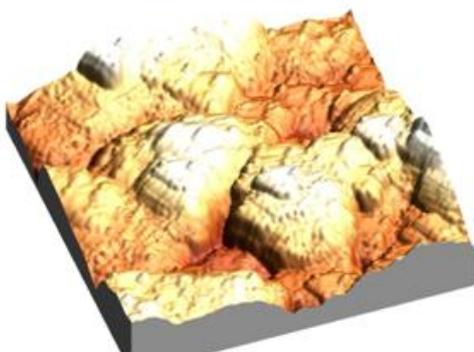
TiO₂



Ag2



Ag3



Ag4

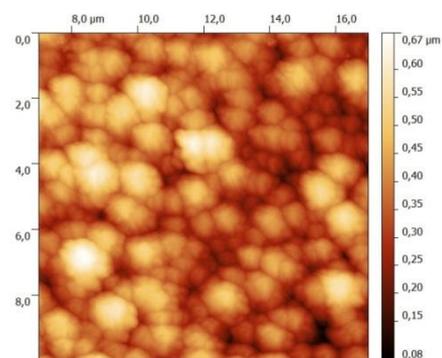
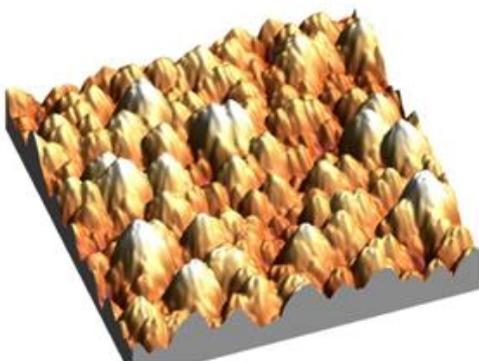


Figura 5.8: Imagens a 3D e 2D da superfície dos revestimentos como depositados, obtidas por AFM.

A topografia é condizente com a morfologia, com a presença de partículas de forma esférica de baixo tamanho, comprovado pela distribuição gaussiana da altura com média de 23 nm.

Os filmes Ag2 e Ag3 evidenciam agregados de prata com forma ovóide e com elevados diâmetros de partícula. O aumento do tamanho dos agregados no filme Ag3 parece dever-se sobretudo à maior quantidade de prata disponível na superfície.

Relativamente ao filme Ag4, este não experimentou uma evolução de acordo com a tendência dos anteriores, reflectindo a cristalinidade observada nos difractogramas. Os agregados são de tamanho inferior aos registados para Ag2 e Ag3 e a forma esférica dos agregados por oposição à ovóide nos filmes Ag2 e Ag3 estão de acordo com o tamanho dos mesmos (Wenzel, 1999).

Esta primeira análise relativa ao aspecto topográfico das superfícies leva-nos a uma análise mais profunda para fundamentar tais evidências.

A topografia verificada no TiO_2 está de acordo com Amin *et al.* (2010) que releva a importância da composição de fases na topografia. A rugosidade média de 4,65 nm e a área real de $101,1 \mu\text{m}^2$ comprovam a regularidade e o reduzido tamanho das partículas.

A prata induziu desorganização nos filmes Ag2 e Ag3, reflectindo a amorfização da estrutura, que se releva na rugosidade média e área real. O aumento da espessura por amplificar os defeitos, é um factor agravante da rugosidade, como mostra a figura 5.9..

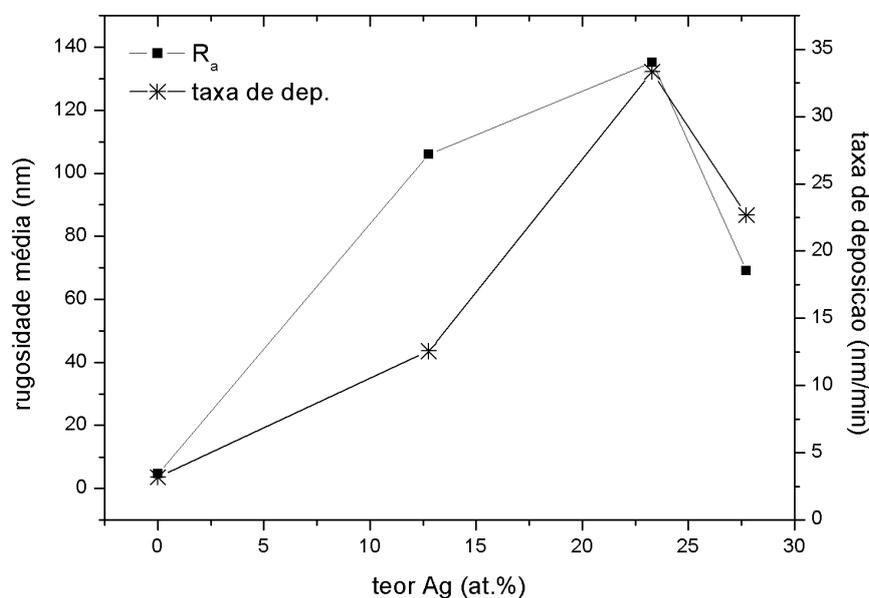


Figura 5.9: Relação entre a rugosidade média e taxa de deposição com o teor de prata nos revestimentos.

Os valores referentes à área real e rugosidade encontram-se sumariados na tabela 5.2. O mecanismo de formação dos enormes agregados parece evidente à luz de alguns autores, como sendo devido à coalescência superficial dos adátomos e agregados de prata (Lando *et*

al., 2007; Marques, 2007; Wenzel, 1999). Segundo Galdikas *et al.* (2006), este fenómeno depende da mobilidade dos adátomos, o qual é influenciado pela energia dos mesmos, como de resto referido no capítulo 3. Segundo Marques (2007) se a energia das partículas a depositar é baixa, a probabilidade dos adátomos de prata serem capturados por um agregado já existente é maior do que esses constituírem novos sítios de nucleação. Como resultado haverá formação de agregados com tamanho elevado. Por outro lado, uma elevada energia das partículas depositadas provoca um aumento da mobilidade de adátomos á superfície, aumentando o número de sítios de nucleação e por conseguinte a formação de agregados mais pequenos e em maior número, que é o que parece ter acontecido na deposição de Ag4. A primeira destas situações releva o que possa ter acontecido durante a deposição dos filmes Ag2 e Ag3. Obviamente este efeito é agravado pelo não aquecimento do substrato.

Tabela 5.2. Valores de rugosidade média e área real obtidos com o programa Gwyddion, para análises 10 μm^2 .

Filme	R_a (nm)	R_q (nm)	<i>Skewness</i>	<i>Kurtosis</i>	Área real (μm^2)
TiO ₂	4,7	5,9	0,2	0,2	101,1
Ag2	106,1	127,9	0,3	0,7	120,2
Ag3	135,3	164,6	- 0,2	0,7	108,1
Ag4	69,1	86,6	0,3	0,1	108,9

Os valores de *skewness* e *kurtosis* condizem com as imagens SEM e AFM que mostram que apesar de os revestimentos Ag2 e Ag3 apresentarem elevada rugosidade, possuem o mesmo tipo de perfil na área inspeccionada, ou seja, os aglomerados estendem-se ao longo do filme revelando simetria em relação a posição média e baixo coeficiente de picos isolados.

De uma forma geral, os resultados obtidos indicam que o aumento do tamanho das partículas e a espessura relacionam-se com o aumento da rugosidade

5.5. DUREZA

A dureza de um material é uma propriedade que depende principalmente da ligação química, estrutura, morfologia, microestrutura, densidade de defeitos e tensões internas do material (Castanho, 2003).

O estudo desta propriedade foi realizado sob as condições referidas no capítulo 4 e os valores da dureza, módulo de elasticidade reduzido e profundidade máxima de indentação para os diferentes filmes estão representados na tabela 5.3.

Tabela 5.3. Propriedades mecânicas dos diferentes revestimentos como depositados.

Filme	Nanodureza (GPa)	M. elasticidade reduzido (GPa)	Profundidade máxima de indentação (nm)	% da profundidade em relação à espessura do filme
TiO ₂	12,5 ± 0,55	196,1 ± 5,77	126,1	66
Ag1	13,9 ± 0,66	189,3 ± 4,54	121,5	37
Ag2	3,9 ± 0,41	138,3 ± 9,31	231,1	31
Ag3	2,3 ± 0,96	134,4 ± 19,94	316,1	15
Ag4	3,8 ± 0,72	163,6 ± 26,43	232,7	17

Os ensaios relativos às propriedades mecânicas foram realizados numa fase precoce do projecto, e devido a não possuir-se informação relativa à morfologia, especificamente à espessura, tomou-se como valor aceitável de carga máxima 5 mN. No entanto as profundidades máximas de indentação, 15 a 66% da espessura, revelaram que deveria ter-se usado um valor de carga máxima menor de modo a excluir a contribuição do substrato nas propriedades mecânicas dos revestimentos.

Os valores da dureza permitem-nos distinguir claramente os revestimento com e sem Ag. A modulação da dureza pela incorporação de Ag nos filmes era um dos objectivos deste projecto. A prata é um metal com estrutura cristalina CFC que exhibe elevada ductilidade devido ao arranjo estrutural e estrutura electrónica, o que nos permitiu explicar as diferenças nos resultados obtidos.

Pela literatura a nanodureza dos filmes de TiO₂ é aproximadamente 13 GPa (Vaz *et al.*, 2011) e a Ag nanocristalina/policristalina 0,46 – 1,40 GPa (Qin *et al.*, 1995), o que levaria à modulação do valor da nanodureza do TiO₂ para valores crescentes em Ag, consoantes o teor desta. A figura 5.10 representa a variação da nanodureza e da espessura em função do teor da Ag.

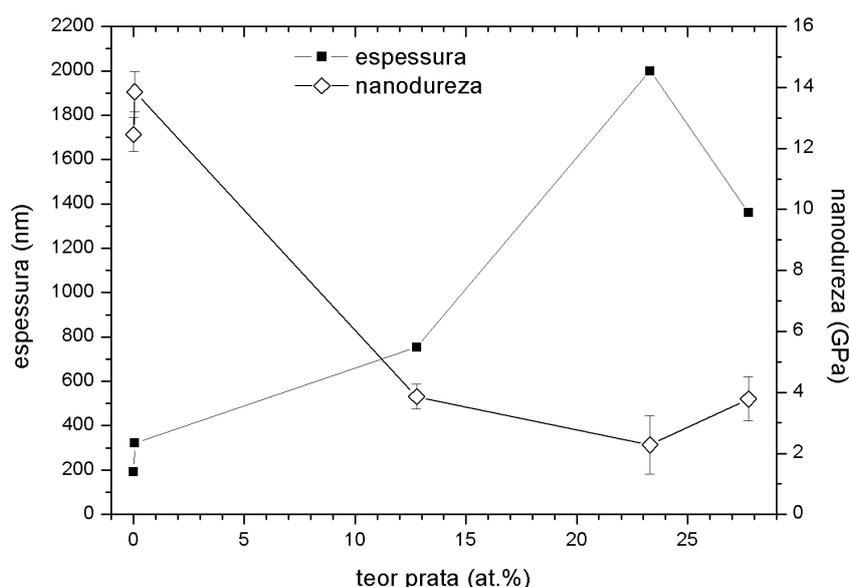


Figura 5.10.: Evolução da nanodureza e espessura para os diferentes filmes.

Constata-se efectivamente que o aumento do teor da Ag é acompanhado pelo decréscimo da nanodureza, aproximadamente por uma função polinomial de segundo grau. A nanodureza para teores de Ag superiores a 12% estabiliza, o que pode denotar uma aproximação ao valor teórico da nanodureza da Ag. Considerando a espessura e a profundidade máxima de indentação, leva a crer o valor referido é influenciado pelo substrato de silício que devido a possuir valores entre 7 e 14 GPa (Gogotsi *et al.*, 2008) contribui para contrabalançar o valor da Ag. A morfologia e a espessura do filme Ag₃ indicam que a análise das propriedades mecânicas cingiu-se praticamente aos aglomerados de Ag. Repare-se na correlação existente entre o aumento da espessura e a diminuição da dureza, e na inflexão que ocorre para o teor mais elevado de Ag. Este comportamento deve-se concerteza ao aumento e distribuição da Ag na matriz TiO₂.

A estrutura cristalina e o tamanho de grão influenciam o valor da dureza. Hall e Petch (Hall, 1951; Petch, 1953) estabeleceram empiricamente que a resistência à deformação de um material policristalino relaciona-se com o tamanho de grão pela seguinte equação:

$$\sigma_c = \sigma_0 + k \cdot D_g^{-0,5} \quad (5.3)$$

correspondendo, respectivamente, σ_c e σ_0 à tensão limite e tensão teórica de limite ao cisalhamento, k é uma constante de medida da extensão de empilhamento de deslocações junto à fronteira de grão e D_g refere-se ao tamanho de grão. Este modelo baseia-se no princípio que as deslocações não conseguem deslizar através das fronteiras de grão o que

provoca o “encruamento” e consequente aumento da dureza. A figura 5.11 ilustra a variação da dureza com o aumento do tamanho de grão para os filmes com Ag.

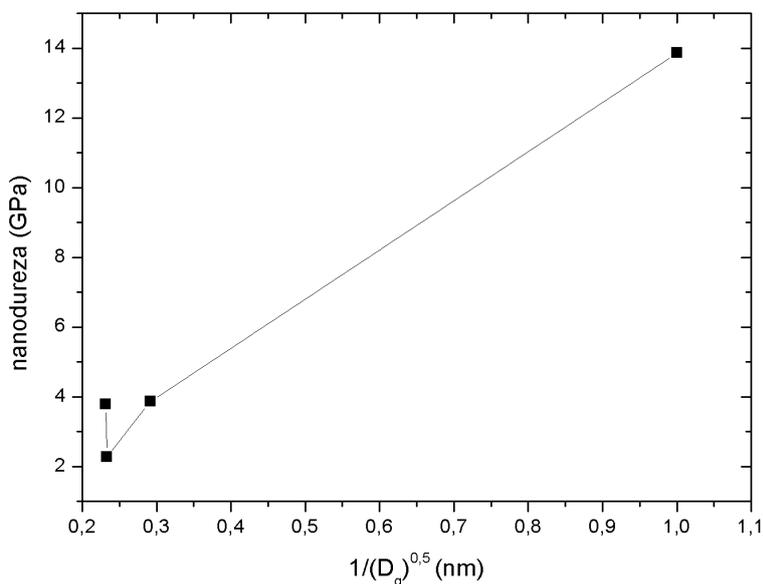


Figura 5.11: Efeito do tamanho de grão no valor da dureza.

A relação de Hall e Petch é satisfeita praticamente para todos os valores de tamanho de grão. A inflexão existente no gráfico pode ser causada pela maior cristalinidade do revestimento como veremos a seguir.

É sabido que, de uma forma geral, materiais cristalinos exibem maior dureza do que materiais amorfos. O estudo da cristalinidade pode ser avaliado segundo a relação das intensidades dos picos cristalográficos, estruturas CFC é comumente realizar com base na razão $I_{(111)}/(I_{(111)} + I_{(200)})$. Neste caso os materiais Ag2 e Ag3 não revelam organização a longo alcance o que não permite realizar este estudo, contudo por esse motivo a inflexão pode ser explicada pela maior organização estrutural do Ag4 relativamente aos filmes Ag2 e Ag3.

Relacionado com a ordem cristalina, um dos factores que contribuem para o aumento da dureza, são as tensões no filme. As tensões residuais de compressão podem ser avaliadas qualitativamente pelo desfasamento do centro do pico em relação ao centro do pico da ficha ICDD. No caso do filme Ag4, a ficha ICDD card. N 04-0783 revela a posição de $2\theta=44,566^\circ$ para o pico mais intenso correspondente ao plano (111) e o resultado obtido foi $2\theta=44,666^\circ$. Apesar de manifestar um desfasamento mínimo, sabe-se que a técnica pulverização catódica induz tensões no filme em crescimento pelo bombardeamento de neutros reflectidos e iões do gás de trabalho.

Por último, o modo de crescimento do filme consagrando uma determinada morfologia também tem o seu impacto no valor da dureza. À medida que o filme se torna menos compacto, passagem de colunas estreitas para colunar largas, o valor da dureza diminui devido ao menor empacotamento de átomos.

Apesar da análise de vários factores influenciadores da dureza dos revestimentos, o teor em prata e o tamanho de grão associado à cristalinidade parecem ser os mais determinantes neste estudo.

5.6. MOLHABILIDADE

A molhabilidade é uma medida da capacidade de um líquido “espalhar-se” numa superfície sólida. Qualitativamente designa-se por superfície hidrofóbica uma superfície que repela o líquido e hidrofílica a que espalha o líquido. O ângulo de contacto mensura essa interacção. Como referido no capítulo 4, esta medida depende de vários factores, nomeadamente da composição química e morfologia da superfície. Neste ponto há que mencionar que a composição química prende-se com o tipo de ligação química, a estrutura cristalina e obviamente pelos elementos constituintes da superfície. A morfologia não é rigorosamente uma característica mensurável, interessando o tipo de morfologia, como de resto Wenzel revelou (Wenzel, 1949).

De acordo com os resultados obtidos para a composição elementar, estrutura e topografia, podemos definir à partida três grupos baseado nas suas semelhanças: o grupo 1 constituído pelo TiO_2 e Ag1, o grupo 2 pelo Ag2 e Ag3 e o grupo 3 apenas pela Ag4. Nesta distribuição considerou-se que os revestimentos do grupo 2 apesar de exibirem diferenças ao nível da composição elementar, traduzem comportamentos semelhantes tanto na estrutura como na morfologia.

Os valores do ângulo de contacto estático para os diversos filmes traduziram de certa forma o que era expectável. Os revestimentos TiO_2 e Ag1 exibiram valores de $97,9^\circ$ e $99,3^\circ$, respectivamente. O grupo 2 teve valores de $117,0^\circ$ e $139,3^\circ$ por ordem crescente de Ag. Por último o Ag4 revelou um ângulo de contacto de $95,1^\circ$. Os desvios a estes valores compreendem-se entre $1,2^\circ$ e $6,1^\circ$, o último referente ao filme Ag2.

No grupo 1 verifica-se que os valores dos ângulos de contacto são concordantes com os resultados químicos, estruturais e morfológicos. Observa-se que o ângulo de contacto aumenta com o aumento do teor em prata, excluindo o Ag4. Este desvio de comportamento é explicável pelas diferenças topográficas, espelhadas na rugosidade média. A relação entre a rugosidade média e o ângulo de contacto para os filmes com Ag é expresso na figura 5.12.

Constata-se que o ângulo de contacto segue uma tendência linear com a rugosidade para os revestimentos com Ag. Paradoxalmente, a rugosidade dos filmes TiO₂ e Ag4 não expressa a semelhança dos valores de ângulo de contacto. Neste caso o efeito diferenciador pode ser a composição química.

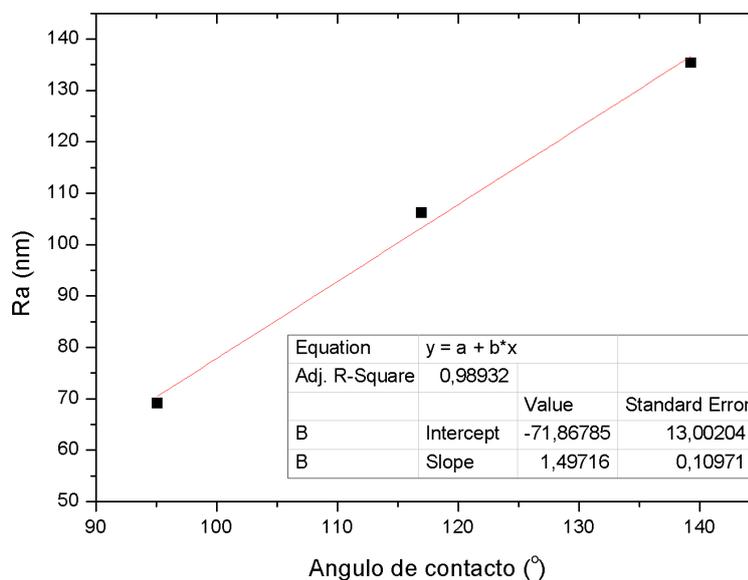


Figura 5.12: Relação da rugosidade média com o ângulo de contacto para os filmes com prata.

Segundo a teoria de Wenzel, o ângulo de contacto medido em superfícies rugosas é afectado pelo factor rugosidade, calculado pela razão entre a área real e a área geométrica. Este estudo foi realizado, não se obtendo relação com a rugosidade nem com o ângulo de contacto, o que pode denunciar que o líquido não molhou os vales topográficos, pelo contrário pode ter-se formado uma película de ar entre a superfície sólida e a gota de água, explicado pela teoria Cassie-Baxter (McHale, 2007).

Parcialmente podemos concluir que hipoteticamente constatou-se a influência da topografia e da composição química no ângulo de contacto, o que está de acordo com as premissas.

Após esta análise duas considerações devem ser feitas:

- O valor da área real foi determinado por um programa cujo algoritmo pode não ser o mais exacto, e que Wenzel previu só ser correctamente determinado por técnicas de adsorção de gás (Wenzel, 1949);
- A rugosidade até determinado ponto é uma medida que não reflecte o tipo de superfície;

Independentemente destes factores constata-se que os filmes amorfizados exibiram um ângulo de contacto superior aos filmes cristalinos, mas todos têm comportamento hidrofóbico. Piedade *et al.* (2006) obtiveram superfícies hidrofóbicas de Ag e evidenciaram o papel dos planos preferenciais de crescimento e suas energias na reactividade da superfície. Esses resultados podem explicar o decaimento do valor do ângulo de contacto no Ag4 relativamente ao Ag2 e Ag3 devido à orientação preferencial de crescimento (111) e sendo a mais estável é a menos reactiva, o que segundo os mesmos autores pode ser contrariado pelo crescimento do plano (200) mais reactivo.

5.7. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os filmes obtidos, mantendo os parâmetros de deposição constantes e variando a área de pastilhas de Ag, possuem uma composição de Ag no intervalo 0-30% atómica. O aumento do teor de Ag induz uma maior organização estrutural da CFC Ag com crescimento preferencial (111), ocorrendo paralelamente uma amorfização das fases tetragonais do TiO₂. Este aumento da cristalinidade da Ag, pelo fenómeno de coalescência, promove a passagem de uma estrutura colunar compacta para uma estrutura colunar aberta, evidenciando o crescimento dos filmes sob os tipos Volmer-Weber e Stranski-Krastanov. Estas características relacionam-se com o aumento da rugosidade média e área superficial, diminuição da nanodureza, demonstrando o efeito directo da Ag. Já a molhabilidade não se relaciona directamente com o teor em Ag, mas sim com os efeitos induzidos por este, designadamente a rugosidade.

6. ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO NAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS FILMES

O tratamento térmico é um processo que pretende otimizar algumas propriedades dos revestimentos, nomeadamente recuperação da rede cristalina, crescimento de grão e alívio de tensões. A temperatura de recozimento foi seleccionada com esse objectivo e portanto foi tomado em conta a temperatura de cristalização do TiO_2 e de TiO_2 dopado com Ag. O estudo incidirá no mesmo tipo de caracterização efectuada para os revestimentos como depositados, com o intuito de traçar uma evolução estrutural, morfológica e mecânica dos revestimentos com a temperatura.

6.1. A TEMPERATURA DE RECOZIMENTO

A temperatura de recozimento deve ser seleccionada de acordo com os objectivos do tratamento. No presente estudo pretende-se avaliar de que modo a cristalização da estrutura afecta as propriedades físicas, mecânicas e biológicas. Neste sentido, realizou-se um estudo prévio para determinar a que temperaturas ocorriam a cristalização do TiO_2 e TiO_2/Ag .

Com auxílio da técnica de difracção de raios-X acoplado a um sistema que permite aquecer a amostra, foi possível traçar a evolução da estrutura *in-situ* com o aumento gradual da temperatura. Os difratogramas obtidos estão representados nas figuras 6.1 e 6.2, TiO_2 e TiO_2/Ag , respectivamente.

Antes do começo da análise da estrutura, torna-se fundamental a compreensão dos fenómenos promovidos pelo tratamento térmico. O aumento da temperatura geralmente provoca a recuperação da estrutura cristalina com o eventual aumento do tamanho de grão e alívio tensões no filme (Louro, 2000). Como referido no capítulo 3, o processo envolve diversas etapas, sendo a última o arrefecimento. A etapa de arrefecimento deve ser programada para evitar a criação de tensões de compressão no revestimento. Estas tensões desenvolvem-se devido às diferenças nos valores dos coeficientes de expansão térmica do filme e substrato, que a inferir pelos valores destes, $\alpha_{Si} = 2,6 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ (Roberts, 1981) e $\alpha_{TiO_2} = 8-12 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ (Vaz *et al.*, 2011), será de esperar uma contracção do substrato relativamente ao filme. Como a espessura do substrato é semelhante ou superior à do filme, a acção das tensões criadas não serão suficientes para o deformar, e como consequência serão criadas no filme fortes tensões de compressão. Apesar da avaliação de tensões no filme não ser do âmbito do estudo, será útil estimar de que forma varia a magnitude das tensões com a temperatura. Cammarata *et al.* (MRS, 1999) propôs a seguinte fórmula:

$$\sigma_f = \frac{E \cdot \Delta\alpha \cdot (T_2 - T_1)}{1 - \nu} \quad (6.1)$$

onde σ_f é a tensão de origem térmica no filme, E o módulo de elasticidade do filme, $\Delta\alpha$ diferença entre os coeficiente de expansão do filme e substrato, T_2 e T_1 são as temperaturas de recozimento e de final de arrefecimento respectivamente, por último ν é o coeficiente de Poisson do filme. O facto de não se possuir todas as informações para o cálculo da tensão, leva a uma análise qualitativa. Pela expressão 6.1. prevê-se uma variação linear das tensões criadas com as diferenças de temperatura e coeficiente de expansão térmica.

A figura 6.1. mostra que o aumento da temperatura provocou variações na estrutura visualizadas pela deslocação, estreitamento e redução de assimetria dos picos de difracção. A diminuição da largura a meia altura e da assimetria dos picos deverão relacionar-se com o aumento do tamanho de grão e anulação de defeitos estruturais resultantes do processo de deposição. O deslocamento dos picos de difracção para valores de ângulos superiores pode significar uma purificação da estrutura anatase, ou seja, a estrutura poderia conter impurezas que pelo efeito da temperatura abandonaram a rede cristalina.

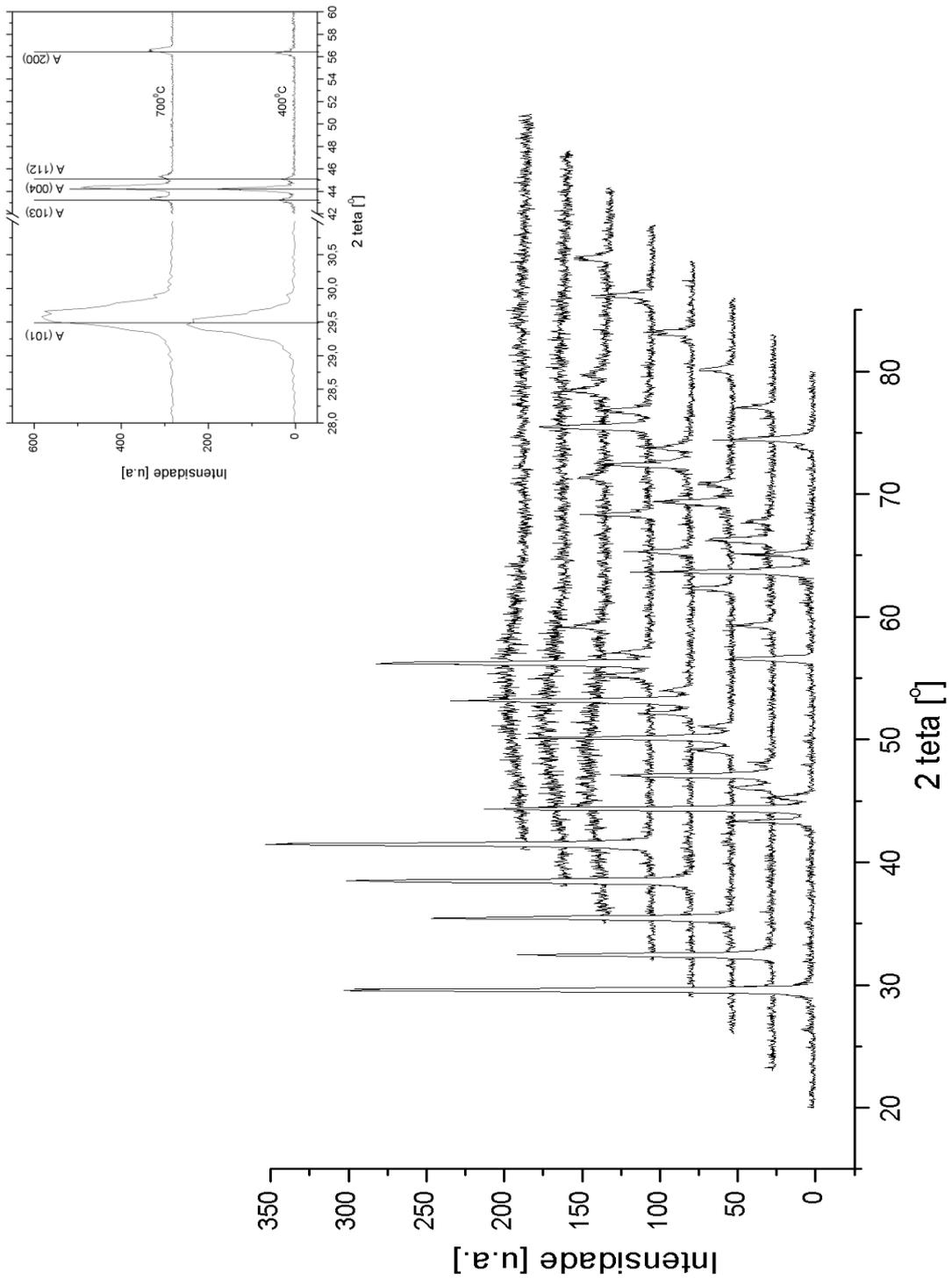


Figura 6.1: Difratoograma, HTXRD, de um filme de TiO₂, com aumento gradual de 100°C, com início à temperatura ambiente e término a 700°C (difratograma mais próximo). A imagem inferior refere-se aos difratogramas a 400 e 700°C.

À temperatura de 200°C verifica-se a passagem da fase amorfa para baixa ordem estrutural, com a presença de picos de baixa intensidade referentes aos planos cristalográficos (004), (200), (105), (211) e (213) de acordo com a ficha ICDD card. N 84-1286, demonstrando crescimento aleatório sem planos preferenciais. Contudo, ainda está presente uma estrutura amorfa para baixos ângulos. A cristalização da anatase ocorre à temperatura de 300°C, na qual além de se verificar um estreitamento e aumento da intensidade dos picos referidos, desaparece a fase amorfa e surge para $2\theta \cong 29^\circ$ o plano (101). O aumento da temperatura induz a recristalização e conseqüente aumento do tamanho de grão.

A fase rutilo não é formada durante o intervalo de temperatura seleccionado. Kholmanov *et al.* (2003) após depositar TiO₂ pela técnica deposição por feixe supersónico sujeitou o filme a tratamento térmico tendo experienciado a cristalização da anatase a 400°C e a transformação anatase-rutilo a 800°C. Filmes de TiO₂ produzidos por hidrólise experienciam essa transformação a 600°C (Zhang & Banfield, 2000), enquanto pela técnica sol-gel a anatase mantém-se até 800°C (Rahman *et al.*, 2000). Jung *et al.* (2003) reportam essa transformação a 650°C para filmes produzidos por MOCVD mas obtêm resultados diferentes consoante o substrato, experienciam que a deposição em substrato Si (100) conduz à formação de anatase a 600°C, mas nas mesmas condições filmes depositados sobre Si (111) ocorre a formação de anatase e rutilo, sugerindo que a direcção de crescimento do filme é largamente influenciada pela orientação e tipo de substrato e conseqüentemente a transformação de fases também o será. Conclui-se que a transformação referida é dependente da técnica e condições de deposição, contudo os resultados obtidos neste trabalho encaixam no intervalo de temperatura de diversas técnicas.

Por outro lado, a transformação da fase amorfa para anatase na gama de temperaturas 300-400°C é reportada abundantemente na literatura para diversos métodos de produção de filmes finos, nomeadamente Wang *et al.* (2006) por pulverização catódica rádio-frequência modo magnetrão, Torrell *et al.* (2011) por pulverização catódica corrente contínua modo magnetrão e Esfahani & Habibi (2008) pela técnica sol-gel.

Da análise realizada retira-se que a cristalização da matriz de TiO₂ ocorre para valores de temperatura de 400°C. Uma vez que o estudo engloba filmes de TiO₂ com Ag fazer-se-á de seguida a mesma análise para tais filmes.

Observa-se da evolução dos difratogramas da figura 6.2, que o filme apresenta uma estrutura amorfizada que à temperatura de 100°C transforma-se no plano (111) da estrutura cúbica de faces centradas da prata. O crescente aumento da temperatura provoca o aparecimento de outros planos cristalográficos, nomeadamente (200) e (220). Tal como no filme TiO₂, o aumento da temperatura acompanha o estreitamento e aumento de intensidade

dos picos de difração. A observação dos difratogramas na escala presente não permite identificar fases cristalinas de TiO_2 . No entanto o aumento da escala permitiu a identificação de uma estrutura com indícios de cristalinidade na posição $2\theta \cong 29^\circ$ a temperaturas inferiores a 500°C , referente à fase cristalina anatase.

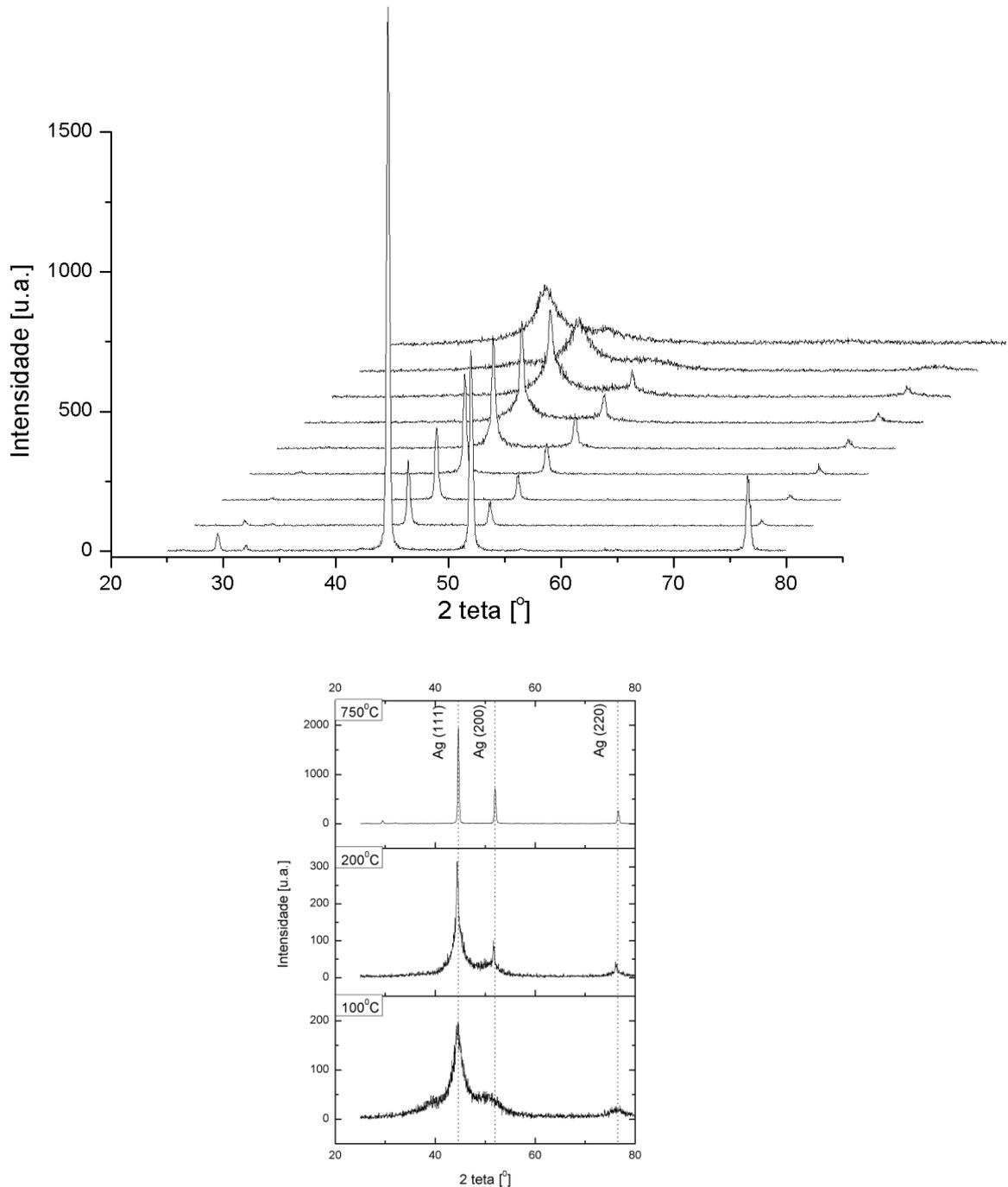


Figura 6.2: Difratogramas obtidos por HTXRD para a amostra de TiO_2 dopado com Ag, com temperatura inicial a 27°C e aumento gradual de 100°C até atingir os 700°C . O último passo é de 50°C . A imagem do lado direito mostra a evolução estrutural com a temperatura.

Em condições semelhantes Vaz *et al.* (2011) reporta a cristalização da anatase a 400°C. Esta fase cristalina (101) torna-se pronunciada a 600°C. O comportamento verificado, ou seja, o retardamento da cristalização do TiO₂ com a presença da prata já era esperado devido ao aumento da barreira de activação da cristalização (Vaz *et al.*, 2011).

Através da análise do comportamento dos filmes anteriormente estudados seleccionou-se a temperatura de 500°C que permite, segundo estes dados, a cristalização das fases anatase e Ag.

6.2. ESTRUTURA E TAMANHO DE GRÃO

O recozimento dos revestimentos a 500°C tinha o intuito de aumentar a cristalinidade dos filmes com o conseqüente aumento do tamanho de grão. Mais, segundo a análise da temperatura de recozimento, a temperatura seleccionada iria provocar a cristalização de pelo menos a fase anatase relativa à estrutura do TiO₂. Além destes aspectos, será analisada de forma breve as microtensões induzidas pelo processo de arrefecimento.

Os revestimentos após TT revelaram a mesma composição elementar do que os filmes como depositados.

A figura 6.3 mostra os difratogramas obtidos após tratamento térmico. Como esperado, verifica-se estreitamento e aumento generalizado da intensidade dos picos de difracção referentes às fases identificadas nos filmes como depositados.

Como se constata da figura 6.4, os difractogramas dos revestimentos TiO₂ e Ag₂ após TT, a temperatura promoveu a cristalização das fases tetragonais anatase e rutilo. Observam-se os picos de maior intensidade de difracção referentes aos padrões de indexação anatase (ICDD – card. N 84-1286) e rutilo (ICDD – card. N 88-1175). Esta análise estende-se aos revestimentos Ag₁ e Ag₃. Se o aumento de ordem estrutural era esperado na fase anatase, suportado pelo estudo prévio por HTXRD, já o rutilo não manifestou essa tendência. O facto da fase rutilo aparecer deve-se em primeiro lugar à manifestação de baixa ordem estrutural deste nos revestimentos como depositados e em segundo lugar ao mecanismo de formação deste.

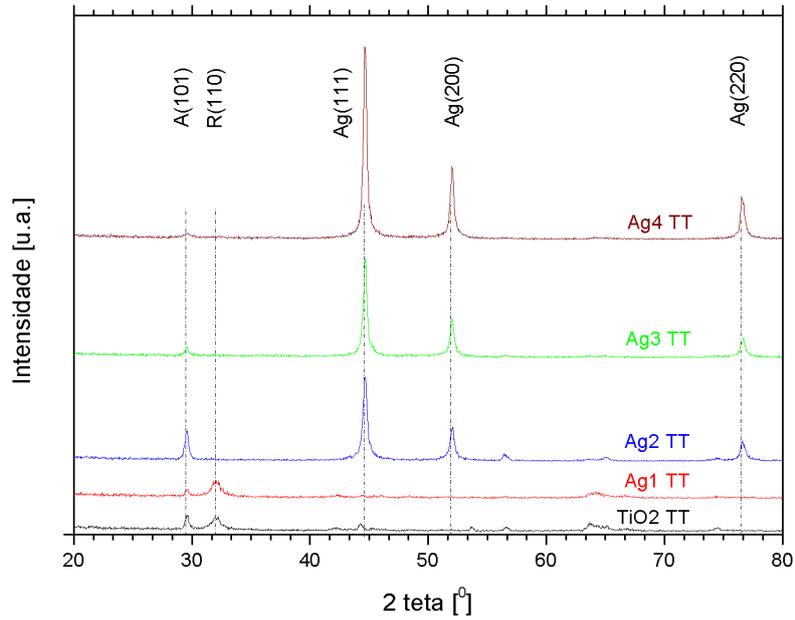


Figura 6.3: Difractograma dos revestimentos após tratamento térmico a 500 °C.

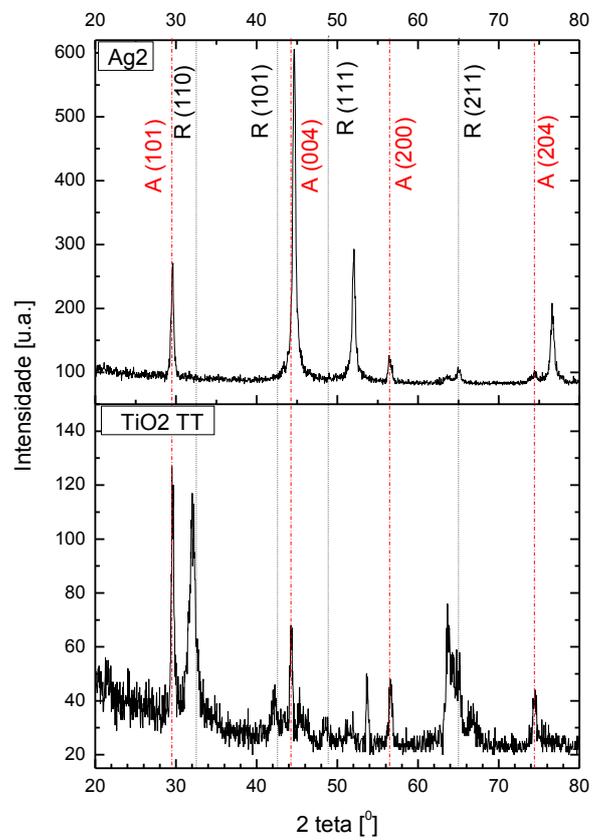


Figura 6.4: Padrão de indexação da anatase e rutilo nos filmes TiO2 e Ag2 após TT.

Efectivamente, segundo o modelo de tamanho crítico médio, durante o recozimento os nanocristais de anatase fundem-se até alcançarem um tamanho crítico que torna favorável a transformação para rutilo. Esta transformação é explicada pelo valor da energia de Gibbs da anatase (101) ser superior à do rutilo (110), respectivamente 0,44 e 0,31 J.m⁻² (Diebold, 2003) o que significa uma transformação exotérmica, contudo essa transformação só ocorre para um tamanho crítico de grão devido à competição entre a energia de superfície (2,2±0,2 e 0,4±0,1 J.m⁻² respectivamente, rutilo e anatase) com a energia do polimorfo (Zhang & Lindan, 2003). Esta relação estabiliza a fase anatase para tamanhos de grão reduzidos (Zhang & Lindan, 2003). Por outro lado, devido às considerações estruturais dos polimorfos (capítulo 2) a transformação ocorre simultaneamente pelo rearranjo do octaedro através da quebra de ligações Ti-O que promovem a redução do volume da estrutura. Os difractogramas evidenciam a orientação preferencial de crescimento do plano (101) para a anatase e (110) para o rutilo o que está de acordo com a estabilidade termodinâmica das superfícies, reportado por diversos autores (Diebold, 2003; Hengerer *et al.*, 2000).

A transformação ocorrida nos revestimentos contrasta com a ausência da fase rutilo e anatase no revestimento Ag4. Uma possível explicação reside na distribuição homogénea de pequenos aglomerados de Ag na matriz atrasando a cristalização do TiO₂, como mostra a micrografia da figura 5.3. Este efeito da Ag já tinha sido reportado por Vaz *et al.* (2011).

Relativamente a estrutura cúbica de faces centradas da Ag, verifica-se um aumento da cristalinidade nos revestimentos Ag2, Ag3 e Ag4 com o aparecimento de picos de difracção (111) (200) e (220), segundo o padrão de indexação da ficha ICDD card. N 04-0783. O revestimento Ag1 continua a não manifestar a presença de prata cristalina. O facto da quantidade depositada ser bastante baixa e sabendo que a prata forma estruturas estáveis por aglomeração, leva a assumir-se a não existência de prata suficiente para ser detectável.

O estreitamento e aumento da intensidade dos picos de difracção deve-se à agregação atómica da Ag com a formação de aglomerados de grandes dimensões, promovida por processos de difusão.

Paralelamente, houve um aumento do tamanho de grão das fases presentes. A figura 6.5 ilustra a evolução do tamanho de grão da anatase com o TT para os diversos filmes. Constata-se que nos filmes Ag2 e Ag3 o tamanho ronda os 39 nm, enquanto que para os filmes com baixo ou nulo teor de Ag houve uma redução. Esta redução pode ser explicada pelo aumento do tamanho de grão da fase rutilo de aproximadamente 2 nm.

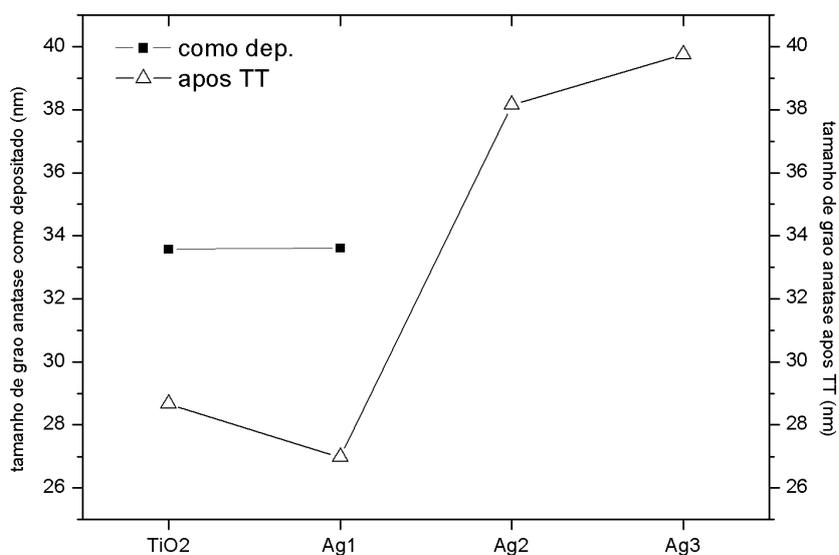


Figura 6.5: Evolução do tamanho de grão da anatase em função do tratamento térmico para os diferentes filmes.

A figura 6.6 relaciona a evolução do tamanho de grão da Ag antes e após recozimento com o teor de Ag. Assiste-se a um aumento proporcional com o tamanho de grão antes de recozimento que por sua vez é ditado pelo teor em Ag no revestimento. Grosseiramente, o tamanho de grão praticamente duplica com o tratamento térmico a 500°C.

Integrando a informação referente ao tamanho de grão das diferentes fases, conclui-se que a Ag não influencia o tamanho de grão das fases TiO₂.

A intensidade relativa do pico (111) leva a assumir o crescimento preferencial da Ag por este plano, contudo a sobreposição deste pico com o pico referente ao plano (004) da anatase torna a conclusão dúbia.

No que concerne ao parâmetro de malha da Ag, o valor calculado tem um desvio máximo de 0,32% relativamente ao valor teórico 0,409 nm (Schields *et al.*, 2008). Este valor era expectável já que a estrutura CFC e os átomos de Ag tornam a inclusão de elementos difícil. O estudo dos parâmetros de rede do TiO₂ não foi realizado por motivo de insuficiência de informação nos difractogramas como depositados, não permitindo traçar a evolução dos mesmos.

A análise das tensões residuais, realizada através da deslocação dos picos de difracção não revelou desvios significativos. Contudo, e pela análise ser grosseira não se pode inferir a presença de microtensões nos filmes decorrentes do processo de arrefecimento. Da mesma forma também não se pode concluir acerca da relaxação da rede.

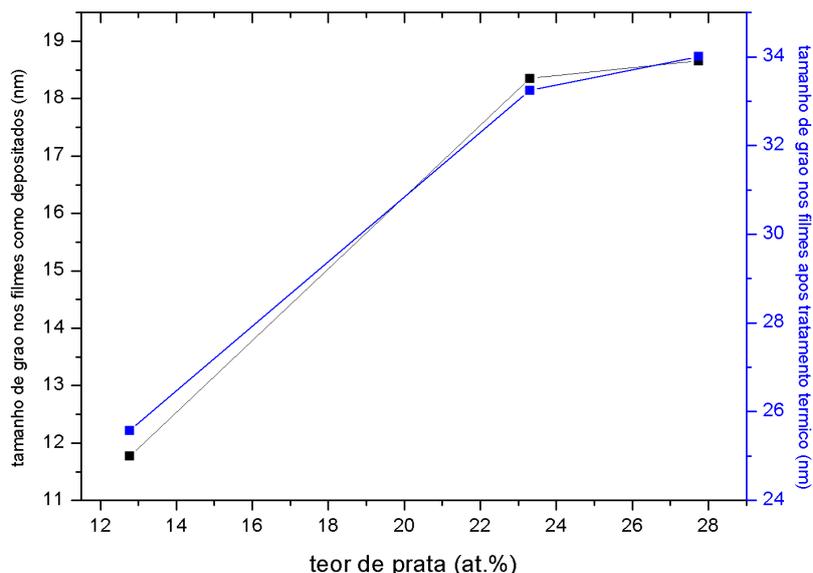


Figura 6.6: Evolução do tamanho de grão da Ag em função do tratamento térmico. O cálculo foi realizado pela fórmula de Scherrer, através do pico de maior intensidade (111).

6.3. MORFOLOGIA

O efeito da temperatura nos processos de difusão, para muitos sistemas, pode ser descrito pela equação de Arrhenius que relaciona o coeficiente de difusão, D com a energia de activação, Q , e temperatura T segundo a equação 6.2:

$$D = D_0 e^{-Q/RT} \quad (6.2)$$

Da equação anterior retira-se que o aumento da temperatura tem um efeito positivo no coeficiente de difusão, ou seja, acelera a difusão de átomos e partículas. Sendo assim, é expectável que o TT tenha acelerado a difusão da prata da matriz para a superfície, alterando desse modo a morfologia.

Na figura 6.7 encontram-se as micrografias respeitantes aos revestimentos TiO_2 e Ag1 após TT. As imagens sugerem uma morfologia do tipo granular correspondente à zona 3 do modelo de Thornton. A alteração verificada, colunar – granular, é sustentado pela análise de difracção de raios-X que evidencia ordem estrutural de longo alcance com um aumento do tamanho de grão. Superficialmente, não parece haver uma alteração significativa da rugosidade, remetendo-se essa análise para a técnica AFM.

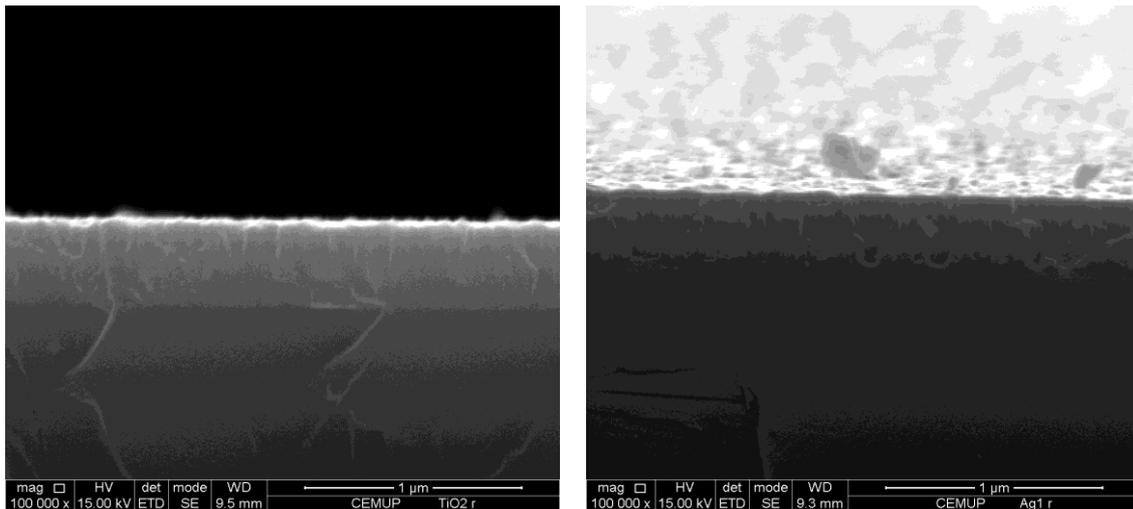


Figura 6.7: Micrografias de seção transversal dos revestimentos TiO₂ e Ag1 após TT.

A micrografia do revestimento Ag2 TT, figura 6.8, evidencia aglomerados maiores à superfície e uma diminuição de partículas pequenas dispersas relativamente ao Ag2. Provavelmente, ocorreu difusão de Ag para a superfície sob o aumento da temperatura promovendo a coalescência de partículas de menor com de maiores dimensões. O tipo de morfologia da matriz continua ambíguo, mas assumindo a difusão de Ag para a superfície e correlacionando o aumento de cristalinidade do TiO₂ pode-se concluir que o TT provocou uma maior compactação do filme.

O revestimento Ag3 revela uma maior compactação do filme, passando de morfologia colunar aberta, zona I, para morfologia compacta, previsivelmente granular. Esta modificação dever-se-á à saída da Ag da matriz para a superfície, o que desencadeou o engrossamento de grão do TiO₂. Observa-se à superfície aglomerados de Ag de grandes dimensões o que desencadeará qualitativamente um aumento da rugosidade.

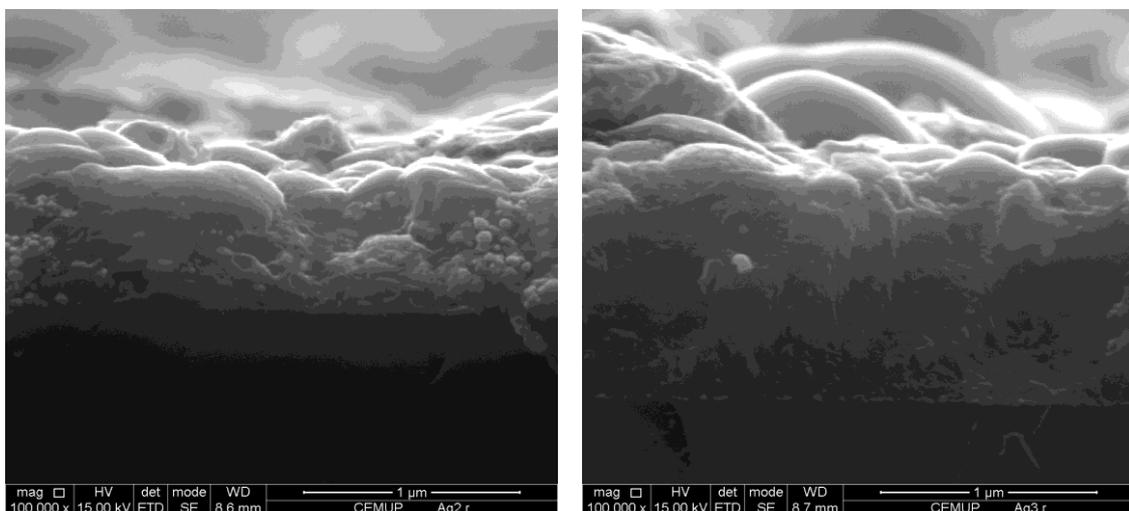


Figura 6.8: Micrografias dos revestimentos Ag2 e Ag3 após TT.

O revestimento Ag4 apresentava uma distribuição homogénea de partículas de Ag na matriz e na superfície. O TT parece ter induzido a dissolução e coalescência das pequenas partículas, produzindo um efeito peculiar como é ilustrado na figura 6.9. Apesar da incorporação de prata na matriz, como é visível pela micrografia obtida no modo electrões retrodifundidos, a morfologia parece compacta com a presença de uma grande quantidade de defeitos. Os grandes aglomerados à superfície substituíram os pequenos aglomerados que tendiam a diminuir a interface com o TiO_2 , aumentando a rugosidade relativamente ao filme como depositado.

Resumindo, o efeito da temperatura provocou a difusão e coalescência da Ag, formando-se aglomerados de maiores dimensões à superfície e desse modo permitiu a cristalização da matriz TiO_2 , visível pela alteração da morfologia para granular ou mais compacta.

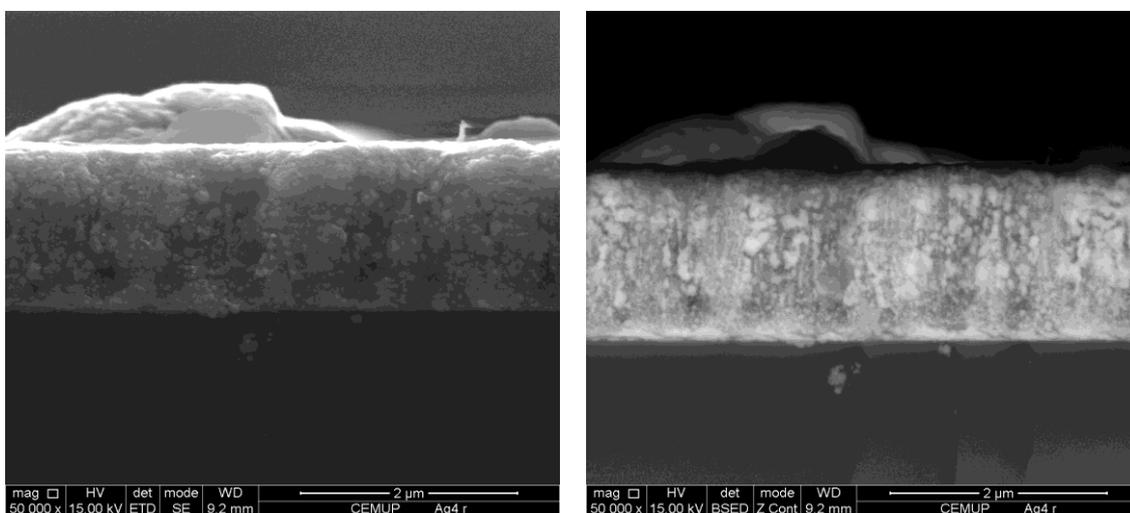


Figura 6.9: Micrografias do revestimento Ag4 em secção transversal, em modo electrões secundários e electrões retrodifundidos respectivamente.

6.4. RUGOSIDADE

A avaliação da evolução da rugosidade com o tratamento térmico cingiu-se a duas amostras como ilustrativas do comportamento dos diferentes revestimentos. Seleccionaram-se os revestimentos TiO_2 e o Ag2. Obviamente que a extrapolação, em rigor, não deveria ser tomada mas devido às limitações laboratoriais não houve alternativa.

A rugosidade dos revestimentos foi determinada através do programa *Gwyddion* numa área de $10 \times 10 \mu\text{m}^2$.

Na figura 6.10 verifica-se qualitativamente que o recozimento não provocou alterações significativas da rugosidade no filme TiO_2 , mantendo-se uma textura de baixo perfil

organizada. Inversamente, o filme Ag2 TT evidencia alterações morfológicas, com o aumento do diferencial zonas de baixa altura e zonas de elevada altura.

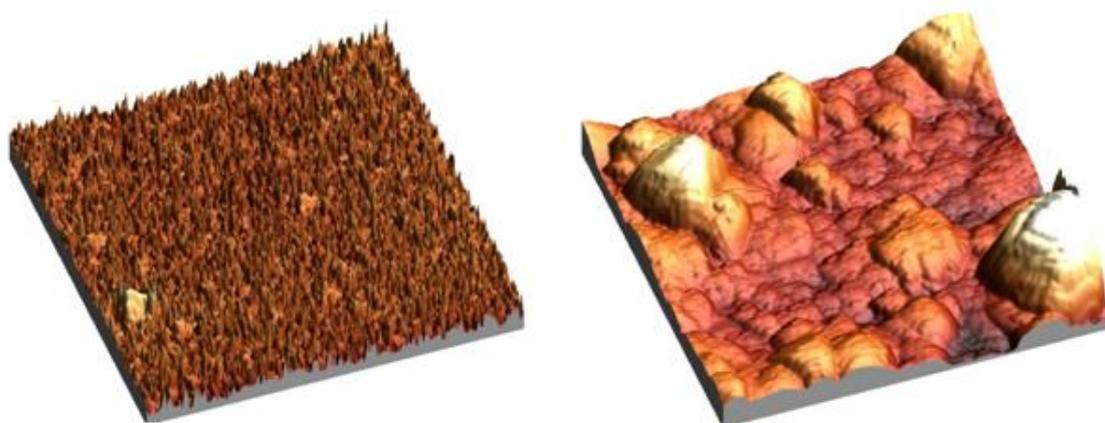


Figura 6.10: Imagens topográficas 3D dos revestimentos TiO₂ e Ag₂ após TT, respectivamente.

Na tabela 6.2 encontram-se os parâmetros extraídos da manipulação dos mapas topográficos.

O tratamento térmico no revestimento TiO₂ não causou alterações significativas nos parâmetros R_a e R_q. Efectivamente o aumento da organização estrutural e por conseguinte o tamanho de grão não influenciaram a rugosidade. Miyagi *et al.* (2003) reportou um ligeiro aumento da rugosidade com o aumento da cristalinidade do TiO₂ com a temperatura, tendo obtido aumentos significativos para temperaturas de 700°C. No entanto observa-se um aumento da assimetria relativa ao plano médio que pode ser explicado pela presença de impurezas como se constata da figura 6.10 (esquerda). Apesar do aumento *kurtosis* não se pode inferir a presença de picos isolados, que de resto é confirmada pela imagem. Estes resultados estão concordantes com as imagens obtidas por SEM.

Tabela 6.1: Valores de parâmetros avaliadores da rugosidade das superfícies TiO₂ e Ag₂, como depositados e após TT.

Filme	R _a (nm)	R _q (nm)	<i>Skewness</i>	<i>Kurtosis</i>	Área real (µm ²)
TiO ₂	4,7	5,9	0,2	0,2	101,1
TiO ₂	4,2	5,4	0,7	1,2	102,7
Ag ₂	106,1	127,9	0,3	0,7	120,2
Ag ₂ TT	239,7	329,2	1,9	3,7	121,4

Relativamente ao revestimento Ag₂ TT, verifica-se um aumento generalizado dos parâmetros avaliadores da rugosidade comparadamente com o mesmo filme como depositado. Este aumento, é explicado pelo aumento da difusão da Ag para a superfície com a

temperatura, e por coalescência de partículas promoveu por um lado a assimetria, R_{sk} , e por outro lado o aparecimento de ilhas de grandes dimensões mais isoladas, reflectindo o valor 3,7 de R_{ku} . Os parâmetros R_a e R_q espelham a diminuição de pequenos/médios agregados a favor do aumento de grandes agregados.

A concordância dos resultados obtidos por SEM e AFM, podem levar a uma análise qualitativa sem perda de exactidão relativamente aos restantes filmes. O filme Ag1 mostra uma morfologia e superfície praticamente inalteradas com o recozimento, levando a crer uma manutenção ou fraca alteração da rugosidade. Já os filmes com um teor de Ag considerável relevam um aumento do tamanho dos agregados à superfície por motivos já extensivamente referenciados, inferindo-se um aumento da rugosidade após TT.

6.5. DUREZA

Os difractogramas exprimem um aumento da cristalinidade e tamanho de grão tanto nas fases TiO_2 como na prata. O facto de o rutilo exibir uma estrutura mais compacta, expresso pela maior densidade volúmica, relativamente à anatase teria como consequência teórica um aumento da dureza. Por outro lado, pela relação Hall e Petch é esperado uma diminuição da dureza com o aumento do tamanho de grão. A etapa de arrefecimento após o recozimento poderá induzir o aparecimento/agravamento de tensões residuais que aumentam a dureza, por mecanismos já referidos anteriormente. Assim, será a combinação destes factores que ditará a variação da nanodureza dos revestimentos antes e após TT.

A tabela 6.3 indica os valores de nanodureza para os diferentes filmes, juntamente com o módulo de elasticidade reduzido e profundidade máxima de indentação.

Tabela 6.2: Propriedades mecânicas dos revestimentos após TT.

Filme	Nanodureza (GPa)	M. elasticidade reduzido (GPa)	Profundidade máxima de indentação (nm)
TiO_2 TT	$10,4 \pm 0,50$	$199,5 \pm 6,45$	136,4
Ag1 TT	$11,3 \pm 0,52$	$185,6 \pm 4,86$	133,1
Ag2 TT	$3,2 \pm 0,21$	$126,1 \pm 7,43$	253,9
Ag3 TT	$1,6 \pm 0,21$	$159,6 \pm 41,15$	368,5
Ag4 TT	$7,3 \pm 0,64$	$162,7 \pm 3,60$	166,4

Constata-se que apenas o revestimento Ag4 apresenta um valor de nanodureza com tendência oposta ao aumento do teor de Ag. Para observar diferenças de comportamento

relacionou-se os valores de nanodureza antes e após TT com o teor em Ag, expresso na figura 6.11. O decréscimo registado para os revestimento Ag2 e Ag3 dever-se-á sobretudo ao aumento de Ag à superfície e aumento do tamanho de grão. Nestes filmes o processo de cristalização da anatase e rutilo não se fizeram sentir. Os revestimentos TiO₂ e Ag1 experimentaram o maior decréscimo de nanodureza, que poderá estar relacionada com a relação Hall e Petch.

O comportamento discordante do filme Ag4 pode dever-se ao aumento da compacticidade do filme, visualizado na figura 6.9.

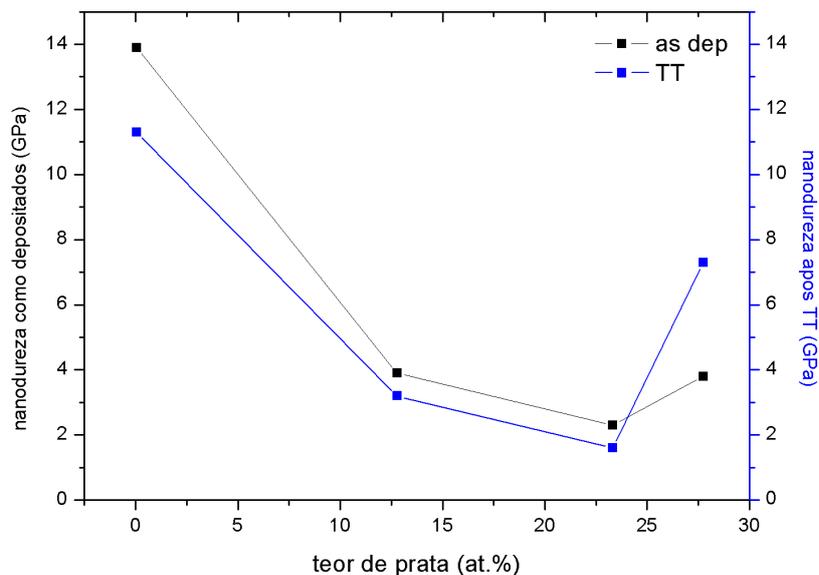


Figura 6.11: Relação entre o teor em prata e a nanodureza para os filmes com e sem TT.

6.6. MOLHABILIDADE

Os revestimentos estudados têm como possível aplicação servirem como interface pele-material. A interface referida, devido às condições impostas pelo ambiente circundante, é alvo de elevada humidade agravada por transpiração anormal. Neste sentido, o comportamento entre a superfície e o meio aquoso revela-se importante de modo a projectar um sistema capaz de inibir a proliferação de microorganismos.

Segundo Berg *et al.* (1994) a reactividade de um líquido com um material é avaliada pela tensão de adesão da superfície, determinada pelo valor do ângulo de contacto. O cálculo da tensão de superfície é efectuado segundo a equação 6.3 que relaciona o ângulo de contacto com a tensão superficial da água, $\gamma^0 = 72,8 \text{ mJ.m}^{-1}$ (Chaudhury *et al.*, 1996).

$$\tau_0 = \gamma^0 \cos \theta \quad (6.3)$$

De acordo com esta equação, superfícies que exibam tensões de adesão superiores ao limite BCEB¹⁸ (30 mJ.m⁻¹) são consideradas hidrofílicas e inferiores a este valor são hidrofóbicas. Note-se que a catalogação de uma superfície como hidrofílica ou hidrofóbica é redutora, pois o comportamento com outros líquidos é específico da interacção sólido - líquido. Pressupondo este factor, procurou-se aproximar as condições de ensaio à aplicação e daí a utilização de água como líquido teste.

A figura 6.12 ilustra as tensões de adesão dos diversos revestimentos estudados ao longo deste trabalho.

Valores negativos de tensão de adesão referem-se a valores de ângulo de contacto superior a 90°. A análise do gráfico permite constatar que no geral os filmes possuem pouca reactividade com a água. O revestimento Ag1 TT revela a maior reactividade com a água. Fazendo considerações puramente energéticas, quanto maior for a tensão superficial maior será a reactividade, tendo em consideração que a anatase possui 91 mN.m⁻¹ (Arkles *et al.*, 2009), o rutilo 143 mN.m⁻¹ e a prata 890 mN.m⁻¹ (7, 2011), seria de esperar um menor ângulo de contacto e maior reactividade nos filmes com Ag. O revestimento TiO₂ e Ag1 sendo estruturalmente constituídos pelas fases anatase e rutilo confirmam a maior reactividade com a água fundamentada na baixa rugosidade. Os filmes Ag2 e Ag3 sofreram alterações estruturais significativas, o que de resto está patente no aumento da reactividade com o aumento da organização estrutural da anatase, rutilo e Ag. Por fim o revestimento Ag4 foi aquele que experimentou menores alterações estruturais, não apresentando as fases cristalinas do TiO₂, mantendo grosseiramente a mesma reactividade.

Estes resultados fornecem uma base para compreender o tipo de interacção destas superfícies não só com fluidos, nomeadamente o suor, mas também com células procarióticas e eucarióticas. Loosdrecht *et al.* (1990) e Hsieh e Timm (1988) reportaram uma maior adesão das bactérias *E.coli* e *Aureus* a superfícies hidrofóbicas, respectivamente. Contudo, pela diversidade e características dos imensos microorganismos existentes não há um comportamento geral. Inversamente, as células animais manifestam maior adesão a superfícies hidrofílicas. Este estudo será apresentado no capítulo 7 com mais detalhe.

¹⁸ Acrónimo nomes dos autores : Berg, Claesson, Eriksson e Borve

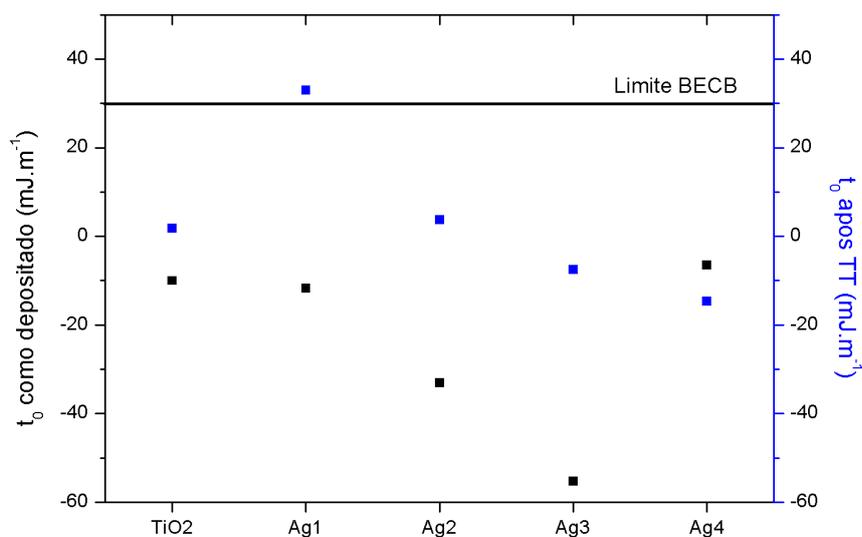


Figura 6.12.: Tensão de adesão dos revestimentos antes a após TT.

Como se verificou no capítulo anterior, a rugosidade relacionou-se directamente com o ângulo de contacto. Devido à escassez de dados no que concerne à rugosidade das superfícies após TT, essa análise não será realizada. Reporta-se, no entanto, uma diminuição do ângulo de contacto do revestimento Ag2 após TT. Este aumento parece contraditório com o aumento da rugosidade média de 225%. Tendo em conta que apesar da importância microscópica do relevo da superfície no ângulo de contacto, a medida é essencialmente macroscópica, e neste sentido apesar do valor da rugosidade média sofrer uma elevada inflação, este não é condizente com o perfil fornecido pela AFM. O parâmetro *kurtosis* sofre um aumento traduzido pelo aumento das discrepâncias de relevo, nomeadamente a presença de picos isolados. Ora macroscopicamente, a superfície apresenta-se mais lisa, o que pode explicar a menor hidrofobicidade.

6.7. CONCLUSÕES PARCIAIS

O tratamento térmico a 500°C provoca a cristalização das fases tetragonais do TiO₂ e CFC da Ag, promovida pela difusão e coalescência da Ag à superfície que facilita a organização estrutural da matriz TiO₂. O aumento geral do tamanho de grão induz a formação de morfologias mais compactas, do tipo granular, e constata-se um aumento da rugosidade nos filmes com composição de Ag significativa. Estes factos resultam na diminuição da nanodureza e hidrofobicidade.

7. ESTUDO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS FILMES

O facto da interface encaixe-coto ter um relevo especial no que concerne ao conforto e a apetência por desenvolvimento de biofilmes de microorganismos potencialmente patogénicos, torna o estudo do comportamento biológico dos revestimentos preponderante. O objectivo final será a produção de revestimentos tóxicos para microorganismos e não tóxicos para as células humanas.

A inclusão da Ag nos revestimentos, deve-se por um lado à ductilidade e por outro ao referenciado efeito antimicrobiano não específico sob mais de 650 organismos causadores de doenças, nomeadamente bactérias e fungos (Schrand *et al.*, 2010; Cao e Liu, 2010). As nanopartículas (NP's) de Ag, por possuírem um tamanho nanométrico, 1-100 nm, exibem propriedades distintas do tamanho macroscópico, no que concerne à reactividade da superfície, área superficial, solubilidade, forma, entre outros (Schrand *et al.*, 2010). No presente estudo objectivava-se obter NP's de Ag embebidas na matriz TiO₂. Neste campo, apenas o filme Ag4 pode ser considerado como tal, e desse modo a análise biológica não irá incidir sobre NP's. Contudo, a bibliografia realça a semelhança de acção e efeitos das NP's e iões Ag⁺.

De acordo com os dados obtidos mais relevantes para o desempenho biológico, construiu-se a tabela 7.1.

Tabela 7.1. Propriedades passíveis de influenciar o comportamento biológico dos revestimentos. O tamanho dos aglomerados foi inferido por AFM e SEM; “ * ” significa mesma composição dos revestimentos como depositados; “ - ” falta de dados ou informação não válida.

Filme	% at. Ag	Fases estruturais	Aglomerados Ag (μm)	Rugosidade		Ângulo de contacto com H ₂ O ($^{\circ}$)
				R _a (nm)	Área _{real} (μm^2)	
TiO ₂	0	Anatase/Rutilo	-	4,7	101,1	97,9
Ag1	0,1	Anatase/Rutilo	-	-	-	99,3
Ag2	12,8	Amorfa/Ag CFC	0,5 - 2	106,1	120,2	117
Ag3	23,3	Amorfa/Ag CFC	2 - 3	135,3	108,1	139,3
Ag4	27,8	Ag CFC	0,1 - 0,3	69,1	108,9	95,1
TiO ₂ TT	*	Anatase/Rutilo	-	4,2	101,1	88,6
Ag1 TT	*	Anatase/Rutilo	-	-	-	63,1
Ag2 TT	*	Anatase/Ag CFC	1 - 2	239,7	121,4	87,3
Ag3 TT	*	Anatase/Ag CFC	1,5 - 2	-	-	95,9
Ag4 TT	*	Ag CFC	2 - 3	-	-	101,6

7.1. CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

7.1.1. CITOTOXICIDADE POR CONTACTO INDIRECTO

A análise citotóxica presente neste estudo baseia-se na norma ISO 10993-5 que estipula que qualquer agente que promova uma redução de 30% da viabilidade celular é citotóxico.

O ensaio de citotoxicidade por contacto indirecto baseia-se no pressuposto de libertação de agentes dos revestimentos que sejam ou não passíveis de afectar a viabilidade celular.

Como foi referido no capítulo 4, após o condicionamento do meio com o revestimento, o meio foi recolhido e incubado com células MEF's. Mediu-se a absorvância do meio durante 3 dias após incubação com Alamar Blue e calculou-se a percentagem de viabilidade celular relativamente ao controlo negativo. Os resultados de viabilidade celular para os tempos de condicionamento de 1 e 5 dias encontram-se nas figuras 7.1 e 7.2, respectivamente.

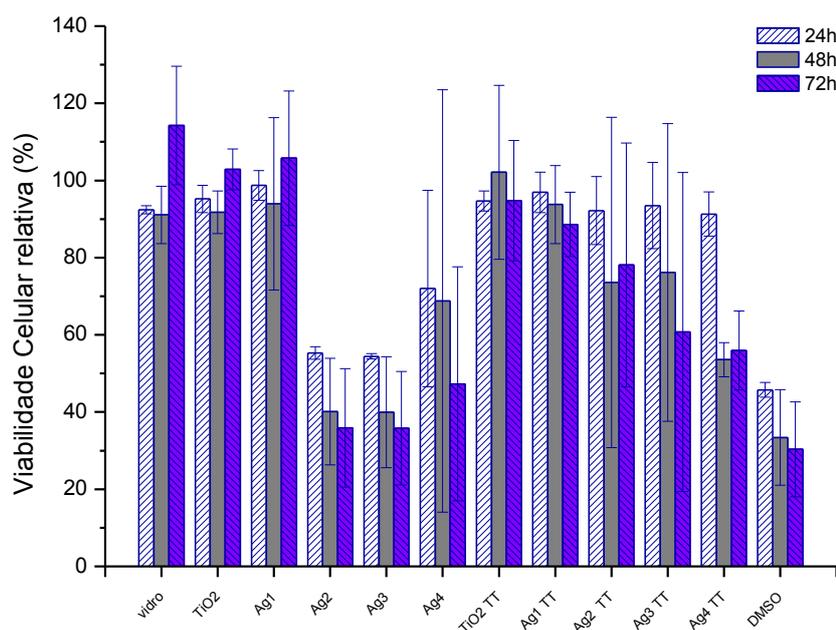


Figura 7.1: Viabilidade celular relativa das células MEF's após contacto com meio condicionado durante 1 dia com os revestimentos. Dados do teste ANOVA (GraphPad Prism) com 95% de confiança revelam diferenças significativas entre: o TiO₂ e Ag2, Ag3 e DMSO; o TiO₂ TT e Ag2, Ag3, DMSO; o Ag1 e Ag2, Ag3. Para alguns tempos existem algumas diferenças.

A primeira constatação dos gráficos é o elevado desvio padrão na viabilidade celular das células expostas a alguns dos revestimentos. Este factor dificulta a precisão da análise e pode ser atenuado pela realização de mais ensaios. Tendo em consideração o desvio padrão e o comportamento exibido pelos revestimentos, podem agrupar-se os resultados em três grupos: o primeiro constituído pelos revestimentos, Ag2 e Ag3, que exibem claramente toxicidade, o segundo pelos revestimentos que não revelam toxicidade (TiO₂; Ag1; TiO₂ TT, Ag1 TT) e um terceiro grupo instável (Ag4; Ag2 TT, Ag3 TT e Ag4 TT). O teste Alamar Blue tem o risco associado da redução mitocondrial da resazurina, que é afectada pela condição celular, ou seja, o metabolismo celular pode não permitir a redução da substância apesar da célula estar viva. Nesse caso, a não redução podia representar um estado intermédio após o qual poderia haver recuperação. Constata-se pelas imagens da figura 7.2., obtidas antes da adição de Alamar Blue, que as células condicionadas com os meios referentes aos revestimentos Ag2 TT, Ag3 TT e Ag4 TT possuem uma distribuição e morfologia anormais, com baixa confluência o que denota a presença no meio de algo tóxico, designadamente a Ag. Esta condição significa uma diminuição de prata no meio relativamente aos mesmos revestimentos como depositados, e conseqüentemente uma menor citotoxicidade. Na imagem

Ag4 verifica-se uma morfologia celular indicativa de morte, semelhante ao controlo de morte DMSO.

Estes resultados indicam que, após 1 dia de condicionamento com os revestimentos, houve libertação de agentes tóxicos dos revestimentos Ag2, Ag3, Ag4 e em menor grau nos revestimentos sujeitos a tratamento térmico.

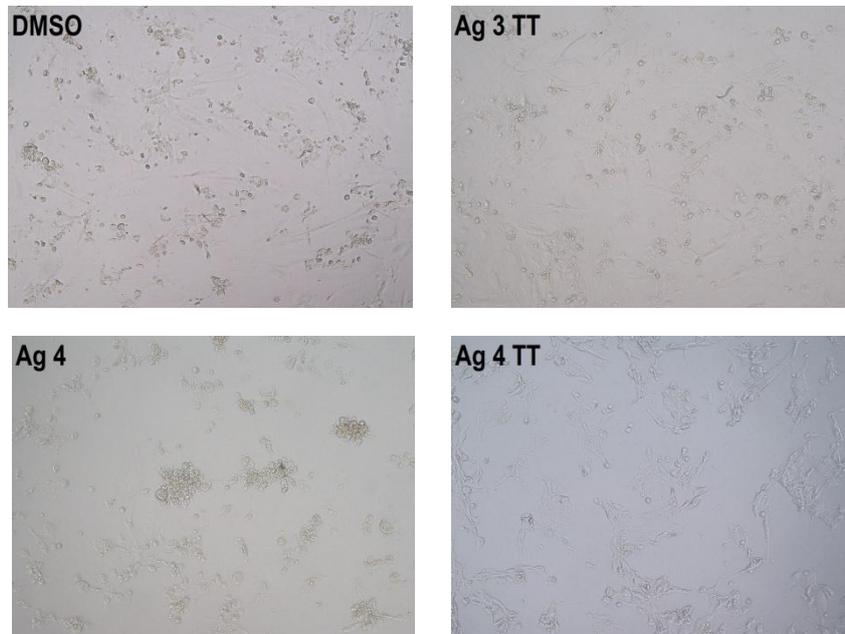


Figura 7.2: Imagens obtidas por microscopia óptica, para uma ampliação 100 x.

A libertação de agentes tóxicos dos revestimentos, nomeadamente iões ou nanopartículas de prata, pode ocorrer ao longo do tempo. O factor tempo é sem dúvida um parâmetro a ter em conta neste estudo, já que a potencial presença destes revestimentos numa prótese pode implicar o uso contínuo ou não durante alguns dias ou meses. Por outro lado, caso a libertação de agentes tóxicos não seja suficiente para induzir uma resposta celular, a capacidade de recuperação das células é testado, o que não nos permite averiguar se no intervalo de tempo ocorreram “picos” de libertação.

Os resultados da figura 7.2, referente ao condicionamento de 5 dias, mostram uma distribuição semelhante à figura 7.1 assumindo as considerações relacionadas.

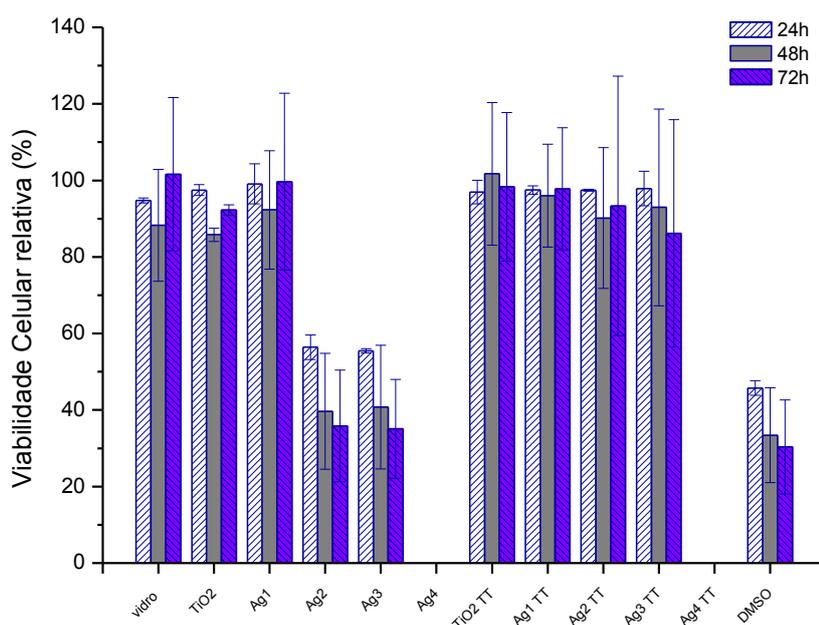


Figura 7.3: Viabilidade celular relativa das células MEF's após contacto com o meio condicionado durante 5 dias com os revestimentos. Os revestimentos Ag4 e Ag4 TT não foram testados por limitações técnicas. Os resultados estatísticos revelam diferenças significativas entre: o TiO₂ e Ag2, Ag3, DMSO; o TiO₂ TT e Ag2, Ag3, DMSO; o Ag1 e Ag2, Ag3, DMSO; o Ag2 e Ag2 TT; o Ag3 e Ag3 TT; o Ag2 TT e DMSO.

Estes resultados exprimem que não há diferenças significativas com o tempo de condicionamento, exprimindo que aparentemente a libertação de prata para o meio ocorre a uma taxa contínua ou que tem um “pico” inicial e que diminui com o tempo. De facto, destes resultados pode-se extrapolar que não houve deterioração da superfície do revestimento, pois a haver haveria libertação desigual de Ag.

Outro dos pontos que importa mencionar é o comportamento análogo das células entre cada tempo de medição, 24h, 48h e 72h, o que revela que a acontecer o efeito tóxico é constante não ocorrendo recuperação celular.

O mecanismo de toxicidade da Ag gera algumas controvérsias no meio académico e este estudo é insuficiente para esclarece-lo. No entanto, AshaRani *et al.* (2008) sugere que as NP's de Ag oxidam quando em contacto com meio de cultura ou proteínas citoplasmáticas, nomeadamente com moléculas de água. Kim *et al.* (2007) utilizando enzimas antioxidantes experienciou que a citotoxicidade das NP's de Ag é fundamentalmente resultado de stress oxidativo, e que este é independente da toxicidade dos iões Ag⁺. Independentemente da controvérsia existente sobre este assunto, parece que, pelo método de produção e propriedades dos revestimentos analisados, dificilmente ocorrerá a libertação de NP's, o que

pelo conhecimento actual a toxicidade neste caso se deve exclusivamente aos iões Ag^+ . Jamuna-Thevi *et al.* (2011) produziram revestimentos de TiO_2 com prata por pulverização catódica por rádio frequência modo magnetrão e reportam que ocorreu libertação de iões Ag^+ do revestimento quando em contacto com PBS. Mais ainda, que essa libertação foi considerada dependente do teor em prata no revestimento, ocorrendo um pico generalizado após 24h de imersão com posterior decréscimo. Ewald *et al.* (2006) ao trabalharem com revestimentos de titânio dopado com prata produzidos por PVD chegou às mesmas conclusões, o que pode explicar o sucedido no presente estudo no que concerne à semelhante distribuição nos tempos de condicionamento 1 e 5 dias.

A respeito da diferença de comportamento celular quando em contacto com meio de revestimentos como depositados e após tratamento térmico, esta não era expectável devido à manutenção da percentagem de Ag, especulando-se sobre um factor geral inibidor de libertação que se baseia no fenómeno de tratamento térmico e nas suas consequências físico-químicas. Yu *et al.* (2011) constatou que durante o tratamento térmico de revestimentos de TiO_2 dopados com prata pelo método sol-gel, os iões Ag^+ migraram para a superfície dando origem a ligações Ag-O-Ti. Ora, este tipo de ligações dificulta a oxidação e libertação da Ag, o que pode explicar o aumento de viabilidade celular dos MEF's.

A caracterização físico-química dos revestimentos não permite esclarecer os mecanismos subjacentes a tal comportamento. Contudo, o aumento do tamanho de grão associado ao aumento do tamanho dos aglomerados de Ag é um factor decisivo referenciado por diversos autores (Ajayan, 1988; Cao, 2010). Auffan *et al.* (2009) sugerem um aumento da toxicidade das NP's de Ag com a diminuição do seu tamanho, referindo que isso se deve por um lado ao aumento do número de átomos localizados na superfície e por outro lado ao facto de NP's exibirem elevada reactividade fruto da sua instabilidade. Apesar do referido autor propor esta avaliação para NP's até 30 nm, fisicamente a relação área superficial – tamanho partículas é válida e estende-se a NP's maiores, o que torna um possível fundamento para as diferenças observadas.

A nível estrutural, o tratamento térmico promoveu alterações significativas na ordem estrutural, com a passagem de baixa ordem para elevada ordem a longa distância. Estas alterações materializaram-se em todos os revestimentos consolidando assim a estrutura, tornando-a mais compacta e diminuindo os defeitos. Apesar da bibliografia consultada não mencionar uma relação entre a cristalinidade da Ag e os efeitos citotóxicos, estudos conduzidos por Yokoyama *et al.* (1985) e Liu *et al.* (2005) demonstraram diferenças energéticas significativas entre o Fe^0 amorfo e cristalino, baseadas na energia superficial e quantidade de defeitos das estruturas, concluindo uma maior reactividade da fase amorfa em relação à cristalina. A caracterização físico-química realizada não permite de todo chegar a

essa conclusão, mas a evolução estrutural e os resultados citotóxicos mostram essa tendência, sendo portanto um ponto a considerar em futuras investigações. Quanto ao teor em Ag, verificou-se citotoxicidade para valores superiores a 12,8% at., sendo este um parâmetro de análise redutor como já exposto.

7.1.2. CITOTOXICIDADE POR CONTACTO DIRECTO

O ensaio de citotoxicidade por contacto directo avalia não apenas a libertação de agentes tóxicos para as células mas também a apetência destas aderirem ao revestimento. Efectivamente, a interface encaixe-coto é propícia à humidade e presença de suor, daí a relevância do estudo anterior. No entanto, o contacto entre o revestimento e a pele releva outro tipo de análise, que está subjacente a este ensaio.

Neste ensaio, células BJ5TA foram incubadas com os revestimentos que ocuparam a maioria da área dos poços da placa de 24. A viabilidade celular foi avaliada segundo a medição das absorvâncias dos meios com ALAMAR, após 24, 48 e 72h da incubação. Os resultados calculados para 100% de viabilidade celular do controlo de vida encontram-se expressos na figura 7.4.

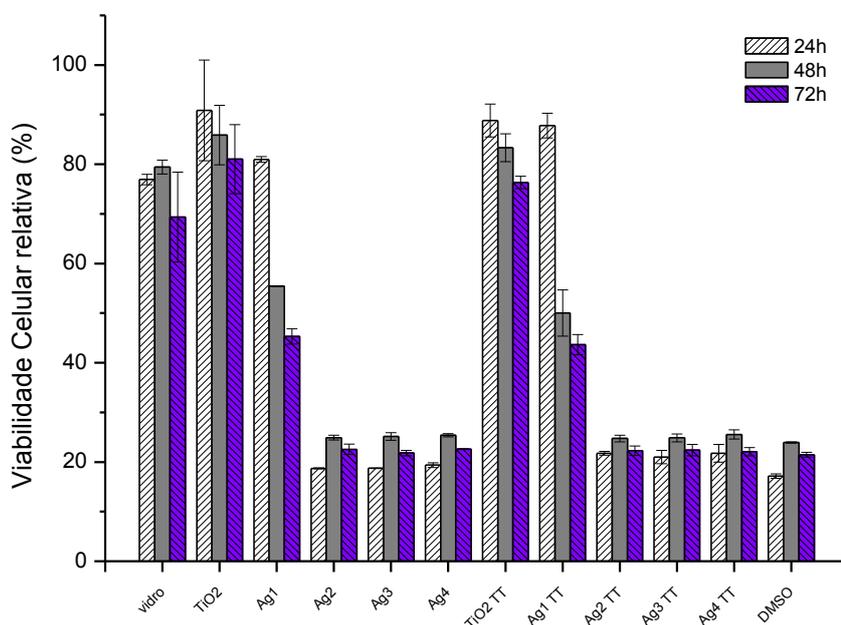


Figura 7.4: Viabilidade celular relativa das células BJ5TA após o contacto com os diferentes revestimentos. Existem diferenças significativas entre: o TiO₂ e Ag1, Ag2, Ag3, Ag4, Ag1 TT, Ag2 TT, Ag3 TT, Ag4 TT, DMSO; o Ag1 e Ag2, Ag3, Ag4, Ag2 TT, Ag3 TT, Ag4 TT, DMSO; o Ag1 TT e Ag2 TT, Ag3 TT, Ag4 TT, DMSO.

Constata-se que as células em contacto com os revestimentos TiO_2 e TiO_2 TT apresentam uma percentagem de viabilidade celular elevada, semelhante ao controlo negativo. Manifestamente, as células incubadas com os revestimentos Ag2, Ag3, Ag4 e os respectivos com tratamento térmico revelam uma percentagem de viabilidade no mesmo intervalo que o controlo positivo (DMSO), sendo portanto citotóxicos. Os revestimentos Ag1 e Ag1 TT exibem uma diminuição gradual de viabilidade com o tempo, comportando-se inicialmente como não citotóxicos e invertendo essa tendência. A figura 7.4 mostra a morfologia das células BJ5TA em meio de cultura DMEM quando aderentes ao plástico da placa de 24 poços. Observa-se que possuem forma alongada e elevada confluência contrariamente às células sobre os revestimentos tóxicos, que apresentam forma esférica característica de processo de morte celular, como observado no DMSO. Constata-se que há medida que aumenta o teor em prata nos revestimentos, verifica-se uma diminuição gradual da confluência e morfologia alongada das células, culminando na morte nos revestimentos com prata superior a 12,8% at.

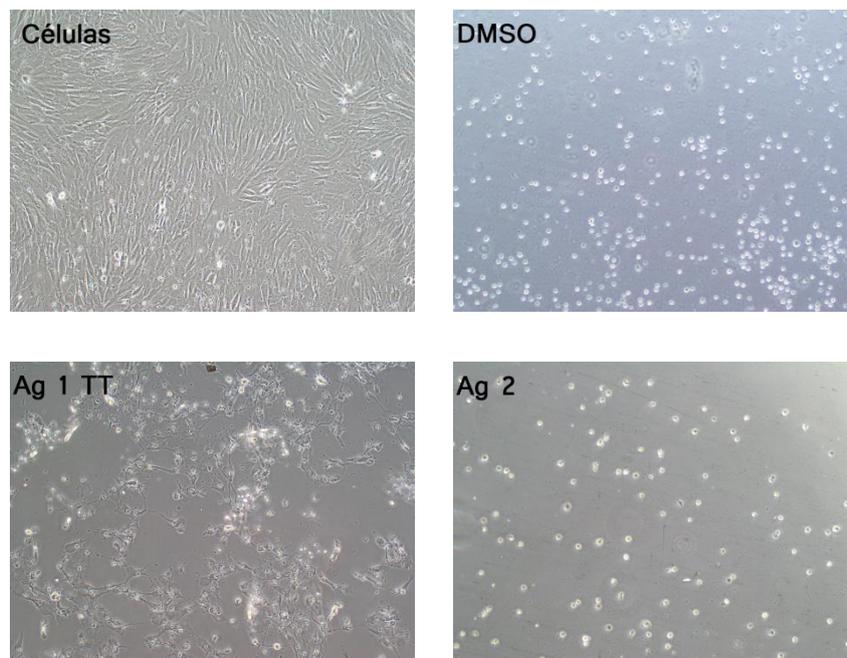


Figura 7.5: Imagens obtidas por microscopia óptica, para uma ampliação 100 x, para contacto directo 48 h.

Estas alterações morfológicas são um ponto de partida para a análise de citotoxicidade. Ekwall *et al.* (1990) refere que o primeiro sinal do efeito tóxico numa célula, é a alteração da sua morfologia. Tal, pode decorrer da sensibilidade das células para auscultarem o meio envolvente, como evidenciado pela diminuição da proliferação de fibroblastos em matrizes de colagénio quando comparada com o vidro (Wolgemuth, 2011). Desta última observação está inerente o conceito de adesão celular. Fundamentalmente, a maioria das células crescem quando aderidas a um substrato, sendo raras as que o fazem em suspensão. O modo como

as células sentem e respondem ao seu redor bem como o mecanismo de adesão ainda são processos desconhecidos (Janmey *et al.*, 2009). Pelham & Wang (1997) experienciaram que fibroblastos proliferam mais lentamente em substratos mais duros, sendo a dureza uma das propriedades que interfere com a adesão. No presente estudo é evidente a influência do substrato. No entanto e devido aos revestimentos apresentarem numerosas propriedades diferenciadoras, o estudo de qual ou quais propriedades afectaram a viabilidade é difícil.

O comportamento das células BJ5TA aos revestimentos Ag1 e Ag1 TT dever-se-á à prata. Se não vejamos, as fases estruturais e rugosidade média destes revestimentos são as mesmas do TiO₂. O intervalo de valores de nanodureza TiO₂ e TiO₂ TT compreende os valores exibidos por Ag1 TT, o que supõe a não interferência desta propriedade na resposta celular. Paralelamente, os revestimentos Ag1 e Ag1 TT manifestam comportamentos desfasados quanto à reactividade com a água. Ora, o elemento diferenciador no que concerne à citotoxicidade deverá advir do teor em prata. Apesar da análise de composição química não revelar uma composição significativa deste elemento, as evidências clarificam que tal teor deve ser o suficiente para desencadear toxicidade. Obviamente, que esta análise é redutora, pois o comportamento das células é com certeza despoletado pela sinergia de diversas propriedades.

Quanto aos revestimentos que apresentam citotoxicidade, as propriedades físico-químicas e mecânicas, propõem o que já foi referido anteriormente, que a Ag é o elemento de ligação na resposta celular exibida. Assim, este estudo permite aferir que teor atômicos de Ag superiores a 12,8% são citotóxicos para as células BJ5TA. Mais, que o contacto entre as células e os revestimentos potencia a citotoxicidade, como se constata nos revestimentos Ag2 TT, Ag3 TT e Ag4 TT. Este facto, poderá ser atribuído aos efeitos delatores do contacto na membrana celular somado ao efeito da geração de ROS devido à libertação de Ag⁺.

Estes resultados confirmam a prevalência da composição química no comportamento das células nos testes *in vitro* como aclamado por Giavaresi *et al.* (2006) em substratos de poli (2-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato). Este autor refere que a nanotopografia exerce uma maior influência no comportamento *in vivo*.

O presente estudo, contacto indirecto e directo, baseia-se na função mitocondrial. Assumindo-se que o efeito tóxico observado advém de iões Ag⁺, segundo Moutin *et al.* (1989) a perda da função mitocondrial e morte celular deve-se à “ocupação” dos canais de Ca²⁺ pelos iões Ag⁺, provocando um aumento intracelular do Ca²⁺. Esta disrupção da homeostase do cálcio induz um aumento do fluxo na membrana mitocondrial, resultando no dano da mesma, levando ao aumento de produção de ROS e inibição da síntese de ATP (Orrenius, 1992). O aumento de cálcio na mitocôndria também pode resultar na libertação de agentes apoptóticos como o citocromo c e endonuclease G que induzem apoptose (Belizário, 2007).

7.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO

7.2.1. TAXA DE CRESCIMENTO ESPECÍFICA

O estudo do efeito antibacteriano dos revestimentos foi realizado primeiramente através da taxa de crescimento específica e numa segunda fase pelo halo de inibição.

Na avaliação pelo método quantitativo, tomou-se em consideração o possível desgaste do material e desse modo determinou-se a taxa de crescimento específica dos microorganismos após cada lavagem do revestimento com etanol. Os resultados da taxa de crescimento específica calculados em relação à taxa de crescimento de cada microorganismo em meio de cultura estão expressos nas figuras 7.6, 7.7 e 7.8.

Este método de análise, pelo facto de se condicionar o revestimento com um meio, pode ser comparado ao método do contacto indirecto na avaliação citotóxica. No entanto, os meios condicionados são diferentes, o que afecta a libertação de iões Ag^+ . Por outro lado, a sensibilidade das células eucariotas é geralmente inferior às procariontas, não se esperando resultados semelhantes.

Na figura 7.6 observa-se que os revestimentos TiO_2 , TiO_2 , Ag1 TT e Ag2 TT não manifestam toxicidade nas 2 lavagens para a *E.coli*. Contrariamente, os revestimentos Ag2, Ag3, Ag4 e Ag4 TT exibem um efeito antibacteriano. Os restantes revestimentos, apresentam situações peculiares. No caso Ag1, este apresenta toxicidade na 1ª lavagem e na 2ª não apresenta, e o efeito é invertido no revestimento Ag3.

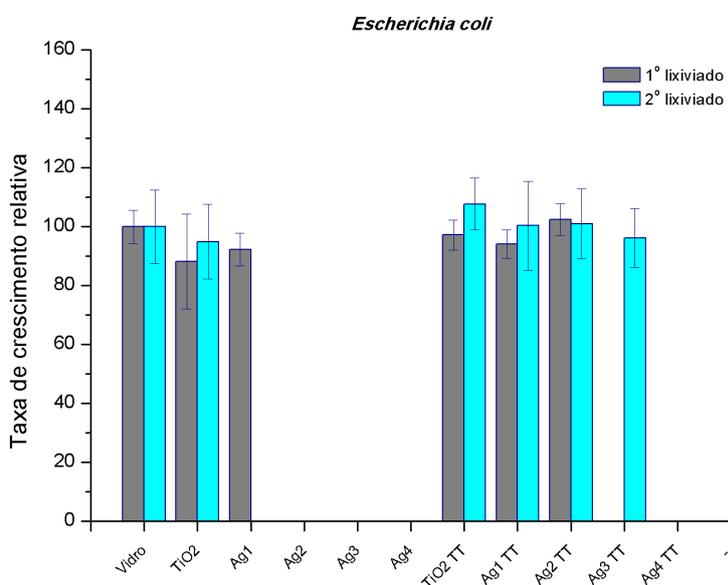


Figura 7.6: Taxa de crescimento específica da *E.coli* quando em contacto com meio condicionado de diferentes revestimentos.

O comportamento observado na bactéria *E.coli* é semelhante ao do *Aureus*, à excepção do 2º lixiviado do Ag1 e Ag1 TT, em que a bactéria Gram positiva exibe uma taxa de crescimento relativa semelhante ao controlo de vida e uma taxa reduzida, respectivamente.

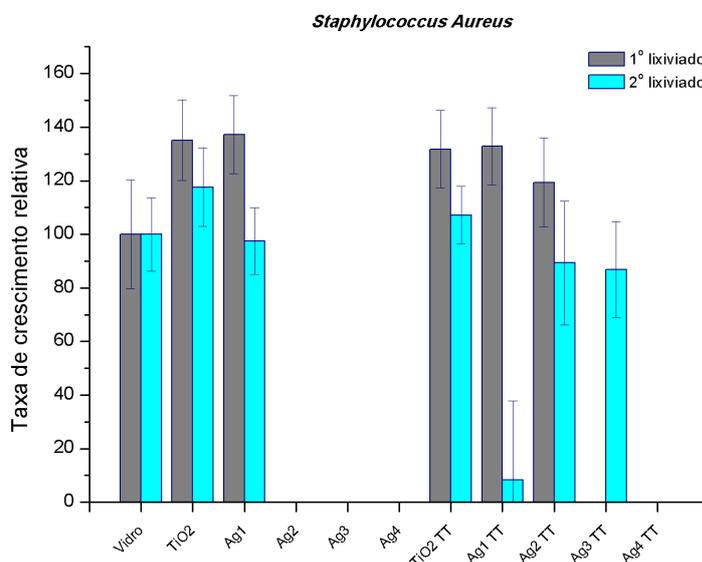


Figura 7.7: Taxa de crescimento específica relativa do Aureus quando em contacto com meio condicionado de diferentes revestimentos.

Relativamente à levedura, o comportamento é semelhante aos anteriores com a excepção da 1ª lavagem Ag2. Seria de esperar, fruto da sua maior resistência, uma diminuição do efeito antibacteriano, o que não se verifica, talvez devido à elevada concentração de iões Ag⁺ no meio de cultura.

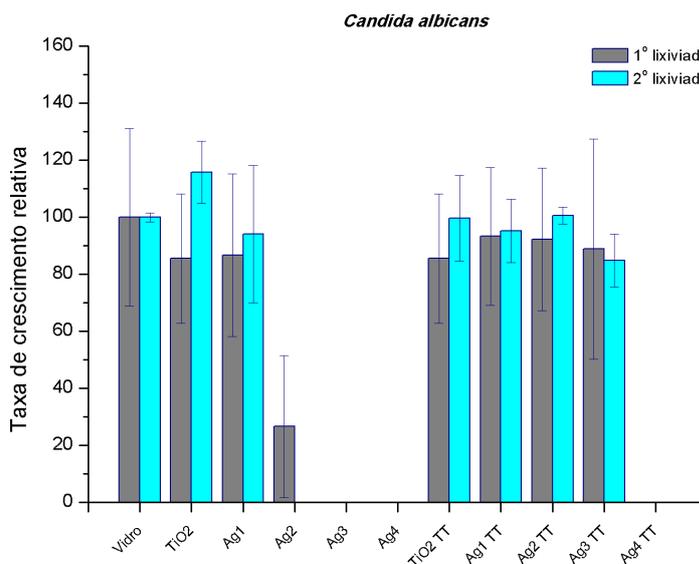


Figura 7.8: Taxa de crescimento específica da *C. albicans* quando em contacto com meio condicionado de diferentes revestimentos.

Constata-se genericamente que os revestimentos com teor de prata igual ou superior a 12,8 %at. apresentam efeito antimicrobiano nos microrganismos testados. Os mesmos revestimentos após tratamento térmico não revelam esse efeito, com excepção do Ag4 TT.

Estes resultados são consistentes com os resultados obtidos nos ensaios citotóxicos contacto indirecto. Segundo Joyce-Wöhrmann *et al.* (1999) a concentração mínima de iões Ag^+ para manifestar efeito antimicrobiano na *E.coli* e *Aureus* é 0,1 ppb, valor muito inferior à concentração mínima para provocar toxicidade em células humanas, 10 ppb, postulado por Schierholz (1998). Apesar do meio de condicionamento dos revestimentos nos ensaios citotóxicos e microbianos ser diferente, o que podia ter inviesado os resultados pela possível diferença de “reactividades” com os iões Ag^+ , verifica-se que os revestimentos que apresentaram citotoxicidade com a adição do Ag4 TT manifestaram efeito antimicrobiano. A relação destes resultados deve ser fundamentada na libertação de iões Ag^+ para o meio, e nesse sentido a análise realizada anteriormente é referenciada para o presente ensaio.

No que concerne aos revestimentos e ao comportamento verificado, estes são apoiados por diversos autores. Kelly *et al.* (2009) reportaram uma redução considerável na viabilidade do *Aureus* em superfícies TiN/Ag com composição atómica de prata de 16.7%. Chen *et al.* (2006) verificaram o comportamento antibacteriano de revestimentos de hidroxiapatite dopado com prata produzidos por pulverização catódica rádio-frequência modo magnetirão. Os revestimentos com composição de prata 2,05 % wt., rugosidade média 0,276 μm e ângulo de contacto 34,9°, exibiam uma redução da adesão do *Aureus*. Reduções de 99% e 91% para as *Aureus* e *E.coli* foram experienciadas após 24h em revestimentos de TiO_2 produzidos por deposição fase líquida (Sun, 2008). Li *et al.* (2011) implantaram iões Ag e N em superfícies de Ti via plasma imersão, obtendo revestimentos com teores de prata de cerca de 4 %at. Foram observadas reduções de 100% e 95% na *E.coli* e *Aureus*, respectivamente. Song *et al.* (2011) recorrendo à técnica de pulverização catódica corrente contínua modo magnetirão reactivo produziram revestimentos multicamadas, com a camada de topo TiO_2/Ag com 10%at. de Ag, e relataram efeito antimicrobiano contra o *Aureus*. O mesmo efeito é reportado por Foster *et al.* (2010) com revestimentos TiO_2/Ag produzidos por CVD. Estes relatos todos têm em comum o efeito antibacteriano contra as bactérias usadas neste trabalho. No entanto, verificam-se diferenças notórias na relação teore de prata e efeito antibacterino. Retira-se que o efeito antibacteriano dependerá na origem da técnica de produção de revestimentos e materiais utilizados. Subjacente a estes dois factores estão as propriedades físico-químicas dos mesmos, que influenciam a libertação de iões Ag^+ . Ou seja, o método mais preciso de analisar o efeito será através da quantificação de iões ou partículas de Ag no meio decorrente da concentração daqueles no meio, e à *posteriori* obter uma relação com as propriedades dos revestimentos.

Ressalva-se nos estudos reportados anteriormente a análise pontual efectuada na maioria dos casos, através do método contagem de colónias. O presente estudo considerou a curva de crescimento dos microorganismos, sendo portanto uma análise em função do tempo é reveladora de particularidades. As figuras 7.9 e 7.10 ilustram essa evolução. Obviamente, que a taxa de crescimento relativa exprime a evolução retratada nos gráfico, contudo a informação gráfico fornece outra perspectiva do comportamento.

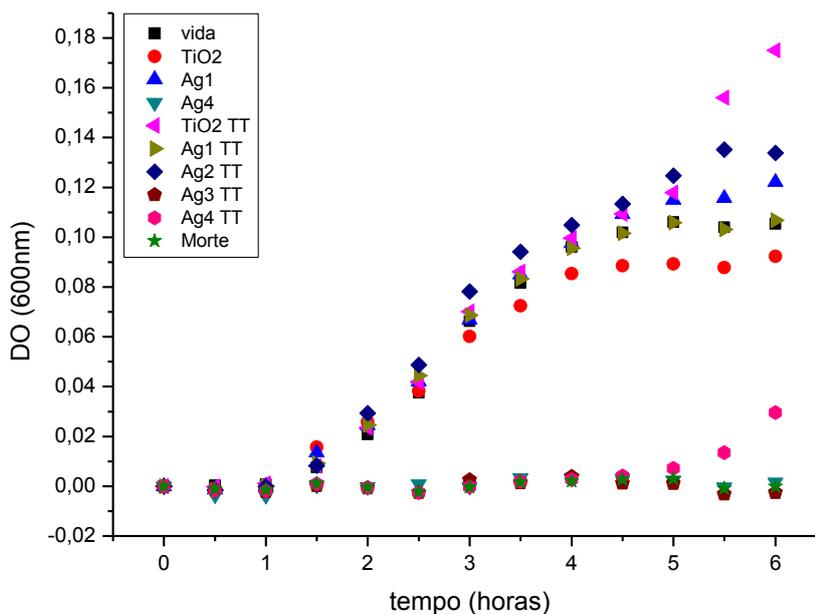


Figura 7.9: Curvas de crescimento da bactéria *E. coli* quando exposta a meios condicionados com os revestimentos.

As figuras revelam que o termo mais preciso para avaliar o efeito é bacteriostático. Isto porque, como se observa da figura 7.9, no revestimento Ag4 TT a *E. coli* parece começar a recuperar entre as 5 e 6h. Suspeitamente, nos meios em que a bactéria inicia a fase exponencial no mesmo período que o controlo de vida, esta prolifera melhor.

Relativamente ao comportamento do *Aureus*, comprova-se na figura 7.9, a tendência de crescimento superior em relação ao controlo de vida para alguns meios. Mantém um maior intervalo da fase *lag* para o revestimento Ag4 TT, agora inferior ao verificado na *E. coli*, o que dever-se-á à maior resistência das bactérias gram positivas fundamentado na diferença de composição da parede celular (Kim, 2007; Tiwari, 2008).

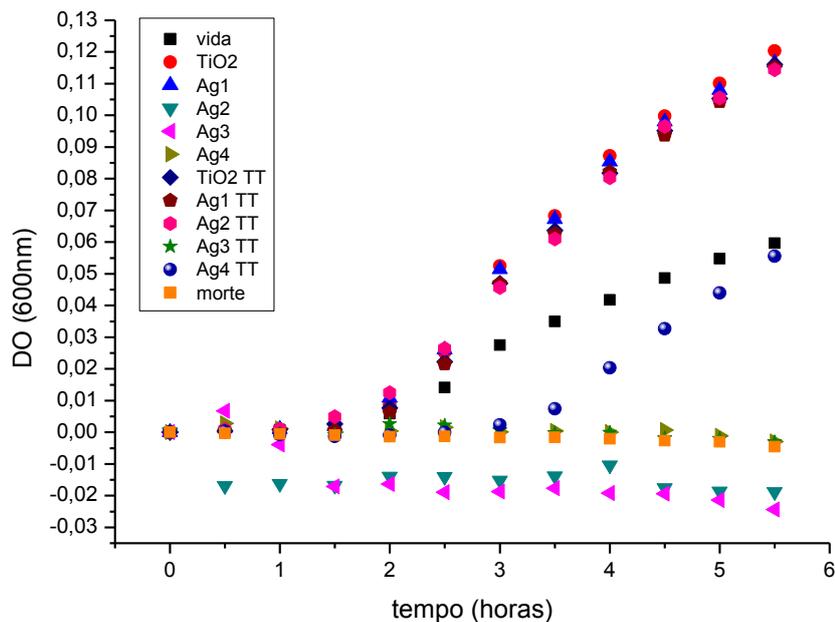


Figura 7.10: Curvas de crescimento da bactéria *S. aureus* quando exposta a meios condicionados com os revestimentos.

Chen *et al.* (2010) e Tiwari *et al.* (2008) experienciaram que o aumento da concentração de NP's Ag reproduz-se num aumento da fase *lag* e numa diminuição da concentração de bactérias na fase estacionária, quando assim ocorre. Estas afirmações não são concordantes com os resultados obtidos, contudo seria necessário um maior intervalo de tempo de análise para relatar tal.

O reconhecido efeito bactericida dos iões Ag^+ contrasta com o parcial conhecimento do mecanismo subjacente. Foi proposto que os iões interagem com os grupos thiol de enzimas vitais, inactivando-as. Evidências experimentais sugerem que o ADN perde a capacidade de replicação aquando da interacção da bactéria com os iões (Feng, 2000). Outros estudos referem a ocorrência de alterações estruturais na membrana celular bem como a formação de aglomerados densos constituídos por prata e enxofre (Feng, 2000; Nover, 1983).

7.2.2. HALO DE INIBIÇÃO

No ensaio qualitativo, halo de inibição induzido pelos agentes antimicrobianos, expôs-se uma camada de cada microorganismo em contacto directo com o revestimento durante 24h. Este ensaio difere do anterior pelas fases dos constituintes do sistema, fase do meio e estado do agente antimicrobiano. Segundo Humphrey & Lightbown (1952) o raio da zona de inibição, r , depende essencialmente da quantidade de substância dissolvida, M , da profundidade da

camada de agar, h , da constante de difusão, D , e do tempo após o contacto, t , como expresso na equação 7.1.

$$r^2 = Dt (\log M - \log 4\pi hDt) \quad (7.1)$$

Ora, decorre desta equação que há uma série de factores que interferem com o halo de inibição o que impede a comparação de resultados com outros autores, de forma rigorosa. Um outro aspecto a ter em conta, resulta da utilização dos revestimentos sólidos ao invés do procedimento habitual realizado com extratos na fase líquida. Este aspecto é relevante na análise pois a difusão em sólidos é extremamente baixa devido ao arranjo compacto das partículas, o que portanto dificulta a libertação do agente, neste caso Ag^+ para o meio.

Na figura 7.10 estão representadas as imagens obtidos por *Chemi Doc*, do halo de inibição para os diferentes microorganismos e revestimentos.

Constata-se que os revestimentos provocam efeitos semelhantes nas bactérias, *E.coli* e *Aureus*. Os revestimentos Ag2, Ag3, Ag4 induzem um halo mínimo mas significativo de actividade de acordo com o que foi exposto anteriormente. Os mesmos revestimentos após TT são representativos de halos de raios inferiores, o que está de acordo com o efeito bacteriostático analisado no ensaio quantitativo. Os restantes revestimentos, como seria de esperar, não manifestam actividade antibacteriana. O antibiótico, kan, tem um potente efeito antibacteriano, potenciado pela fase líquida.

No que concerne aos resultados da *C.albicans*, esta mostrou ser resistente aos iões Ag^+ libertados, às partículas Ag à superfície dos revestimentos bem como aos antibióticos kanamicina e fluconazol.

A disposição de uma camada de microorganismos em ágar, pode levar á formação de biofilmes. Os biofilmes apesar de crescerem mais lentamente, são muito mais densos do que as culturas em suspensão, levando a crer que as células do biofilme estejam menos predispostas para a actuação de agentes antibacterianos. Manifestamente, os biofilmes possuem maior resistência do que células “dispersas”, atribuída a limitações difusionais na matriz dos biofilmes, expressão de genes resistentes e baixa actividade metabólica das células localizadas nas camadas mais profundas (Baillie, 2000; Beloin, 2008; Chandra, 2010; Harriott, 2009). Em 1995, foi demonstrado que biofilmes formados por *C.albicans* são muito mais resistentes a antifúngicos do que em suspensão, o que pode explicar os resultados obtidos (51). Cardoso (2004) experienciou que a concentração mínima de fluconazol que inibe em 50% o crescimento visível da *C. albicans* 12A em meio RPMI¹⁹ em suspensão foi de 0,2

¹⁹ Meio de cultura recomendado para fungos – RPMI -1640 – Sigma-Aldrich

- $04 \mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto em biofilme foi superior a $12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A diferente suscetibilidade da *C.albicans* quando em suspensão e biofilme pode ser a razão dos resultados obtidos.

O ligeiro efeito antibacteriano dos revestimentos após TT dever-se-á ao contacto das partículas Ag com as bactérias alterando e provocando o colapso da parede celular (Huang *et al.*, 2010).

Observa-se que o diâmetro da zona de inibição não aumenta com o aumento do teor de prata nos revestimentos. Contudo a julgar pelas áreas de superfície 120, 108 e 108 μm^2 , respectivamente Ag2, Ag3 e Ag4, parece que tem alguma influência. O que a verificar-se transmitiria um aumento do efeito antibacteriano com o aumento do número de partículas de Ag à superfície. Este ponto realça a importância das propriedades dos revestimentos na interacção com microorganismos.

De uma forma geral, estes resultados confirmam o comportamento observado no ensaio anterior com a particularidade de os revestimentos TT exibirem um fraco efeito antibacteriano devido ao contacto directo com as bactérias.

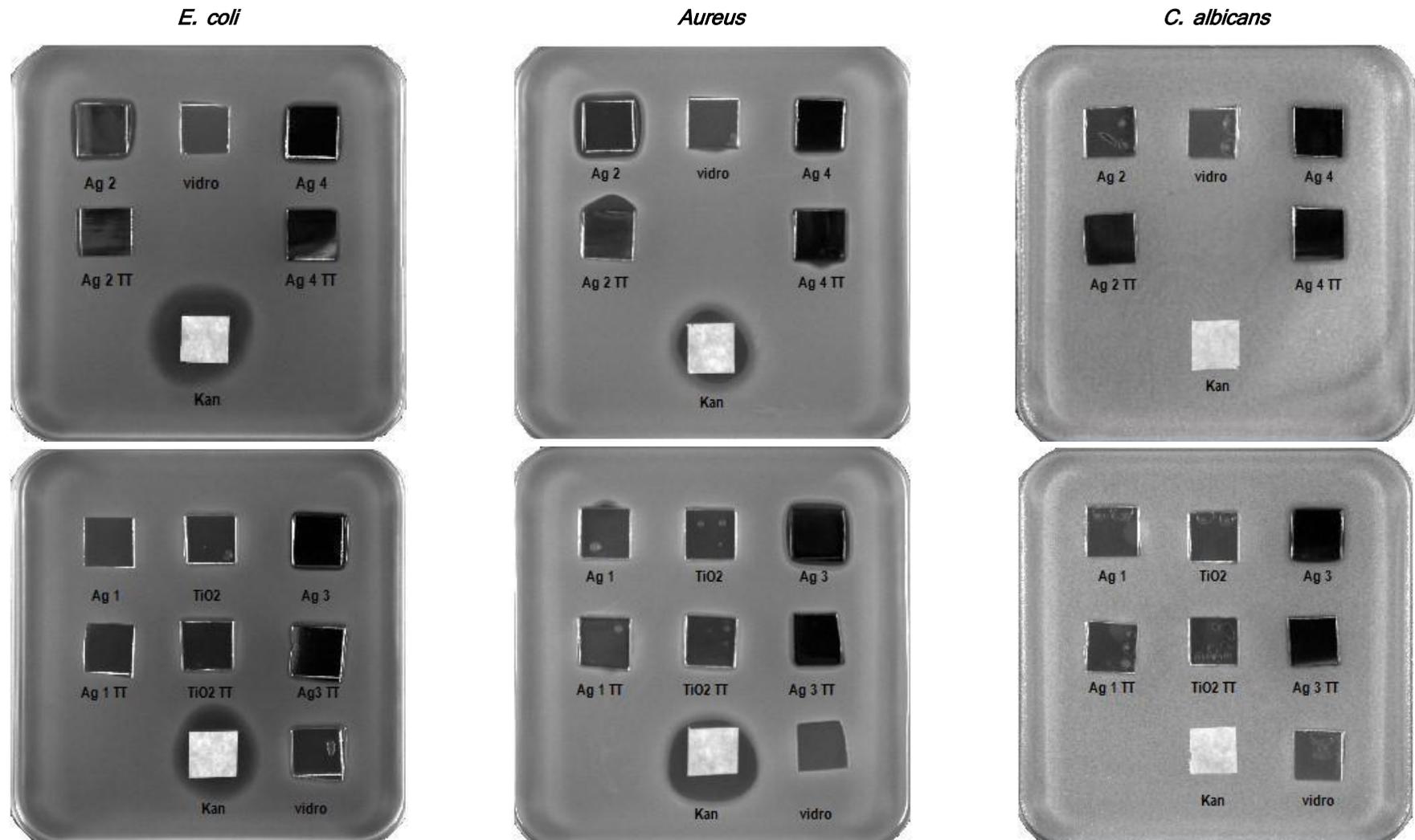


Figura 7.11: Resultados dos testes qualitativos para os difentes revestimentos e microorganismos.

7.3. CONCLUSÕES PARCIAIS

Os extractos condicionados com os filmes Ag2, Ag3, Ag4 e Ag4 TT revelam toxicidade com as células MEF's. O efeito é amplificado quando as células BJ5TA estão em contacto directo com os filmes, produzindo efeitos tóxicos todos os filmes com Ag. Apesar de não se poder inferir da amplificação de toxicidade devido ao uso de diferentes tipos de células que podem possuir diferentes susceptibilidade à Ag, é claro que o efeito tóxico tanto é manifestado via solução como por contacto directo. Os resultados dos microorganismos confirmam a toxicidade exibida pelos filmes referenciados, parecendo existir um limite a partir do qual o efeito é delactor.

8. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os materiais utilizados neste trabalho, TiO_2/Ag possuem um largo espectro de propriedades com potenciais aplicações como se constatou da versatilidade de propriedades apresentadas.

Conclui-se que a incorporação de Ag no filme por pulverização catódica em modo reactivo, teve um efeito retardador na cristalização do TiO_2 . O aumento de prata nos filmes promoveu uma diminuição estequiométrica do TiO_2 , acompanhada da formação de morfologia menos compactas. Este facto desencadeia um aumento da rugosidade que por interferir com a molhabilidade, tem um efeito positivo. A dureza, parâmetro relevante na futura aplicação do material, comportou-se como era esperado. O aumento da prata induziu uma diminuição generalizada deste parâmetro, concluindo-se que há diferenças significativas entre a prata estar embebida na matriz TiO_2 ou estar maioritariamente à superfície. Genericamente, há uma relação directa entre o teor de prata no filme e as propriedades estudadas.

O sistema multi-camadas que se pretende produzir é composto por materiais com diferentes susceptibilidades à temperatura e por esse motivo, a deposição do material à temperatura ambiente revela-se fundamental. Academicamente, o tratamento térmico a 500°C favoreceu a cristalização e aumento de grão da anatase, rutilo e prata baseada em processos de difusão da prata para a superfície, o que provocou um aumento da rugosidade e a passagem de morfologia colunares para granulares. Estes acontecimentos têm um efeito positivo na diminuição da dureza e no aumento da molhabilidade.

Outros dos objectivos deste estudo era a produção de filmes finos bactericidas. Neste campo, as expectativas foram superadas. Todos os filmes com percentagem atómica de prata superior a 10% manifestaram efeito bactericida, quer via transmissão aquosa de agentes quer

via contacto directo, conferindo-se o reconhecido efeito antibacteriano da prata. Por outro lado, e porque a interface também converge para a pele, estudou-se o efeito dos filmes quando em contacto com células eucarióticas. Os resultados demonstraram que as células sofreram apoptose ou necrose após contacto directo e indirecto de 24, 48 e 72h, quando presentes a meios condicionados ou filmes de teor de prata superior a 10% at.. Concluiu-se que filmes tratados térmicamente apresentaram menor ou semelhante toxicidade consoante o tipo de teste, relevando a importância das propriedades físico-químicas na libertação de agentes tóxicos.

Concluiu-se também que, os filmes com percentagem de prata superior a 10%at. apresentam efeito tóxico a células eucariotas e procariotas, o que faz com que o intervalo de percentagem de prata a trabalhar no futuro se deva situar entre os 0,1 e 10%at., de forma a não induzir toxicidade em células humanas. Há estudos que mostram um efeito tóxico da prata superior em microorganismo relativamente às células humanas. Assim sendo, teoricamente o ponto a estudar efectivamente é a composição elementar de prata para que seja bactericida. Paralelamente, deve ocorrer a simulação e estudo do intervalo de dureza óptimo do sistema multi-camadas e qual a contribuição que deve ter o filme TiO_2/Ag .

Uma propriedade que tem importância vital é a condutividade do filme. Devido à condutividade elevada da prata, é provável que o filme TiO_2/Ag perca o carácter isolador, e portanto advêm a necessidade de um estudo rigoroso neste âmbito.

Será da integração da dureza, condutividade e efeitos biológicos, não esquecendo o desgaste à corrosão, que se concluirá acerca do intervalo de valores óptimos para a produção da camada superficial deste sistema.

BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen T., “*Atomic Layer Deposition of Noble Metal Thin Films*”. University of Helsinki, 2005. Disponível em: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/kemia/vk/aaltonen/atomicla.pdf>.
- Ajayan P.M., Marks L.D., *Physical Review Letters*, **60**, pp. 585-587, 1988.
- Amin A., Köhl D., Wuttig M., *Journal of Physics D: Applied Physics*, **43**(40), pp. 5303, 2010.
- Arcos T., Oelhafen P., Aebi U., Hefti A., Düggelin M., Mathys D., Guggenheim R., *Vacuum*, **67**, pp. 463-470, 2002.
- Arkles B., Pan Y., Kim Y.M., *Silanes and Other Coupling Agent*, **5**, 2009.
- AshaRani P.V., Mun G.L.K., Hande M.P., Valiyaveetil S., *ACS NANO*, **3**(2), pp. 279-288, 2008.
- Ashby M.F., Jones D.R.H., “*Engenharia dos Materiais: uma introdução a propriedades, aplicações e projecto*”, Campus/Elsevier, 3ª edição, 2007.
- Auffan M., Rose J., Bottero J-Y., Lowry G.V., Jolivet J-P., *Nature Nanotechnology*, **4**, pp. 634-641, 2009.
- Baillie G.S. e Douglas L.J., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **46**, pp. 397-403, 2000.
- Belizário J.E., Alves J., Occhiucci J.M., Malpartida M.G., Sesso A., *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **40**(8), pp. 1011-1024, 2007.
- Beloin C., Roux A., Ghigo J-M., *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **322**, pp. 249-289, 2008.
- Berg J.M., Eriksson L.G.T., Claesson P.M., Borge K.G.N., *Langmuir*, **10**, pp. 1225-1234, 1994.

BIBLIOGRAFIA

- Bico J., Marzolin C., Quéré D., *Europhysics Letters*, **47(2)**, pp. 220-226, 1999.
- Bogaerts A., Neyts E., Gijbels R., Van der Muller J., *Spectrochimica Acta Part B*, **57**, pp. 609-658, 2002.
- Bonn D., Eggers J., Indekeu J., Meunier J., Rolley E., *Reviews of Modern Physics*, **81**, pp. 739-805, 2009.
- Cahn R.W., “*Concise Encyclopedia of Materials Characterization*”, Elsevier, 2nd edition, 2005.
- Cao H. e Liu X., *Wiley: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2, pp. 670-684, 2010.
- Cardoso, Bárbara Cachada, “*Efeito dos antifúngicos em suspensão e biofilmes de Candida albicans e Candida dubliniensis*”, Tese de Mestrado em Biotecnologia, Universidade do Minho, 2004.
- Carvalho, P.M.F., “*Preparação e caracterização de filmes finos coloridos de ZrN_xO_y* ”, Tese de Mestrado em Física (Ensino), Universidade do Minho, 2004.
- Castanho J., “*A influência de intercamadas dúcteis no comportamento mecânico de revestimentos duros*”, Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2003.
- Castanhola A., Texto de apoio às aulas de Técnicas de Análise de Superfície, 2010.
- Cavaleiro A., “*Estudo de Revestimentos W-C-(Co) Depositados sobre Aço Rápido por Pulverização Catódica*”, Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 1990.
- Cavaleiro A., Vieira M.T., *Textos de apoio às disciplinas de Engenharia de Superfícies e degradação e protecção de superfícies*, 1995.
- Chandra J., Mukherjee P.K., Leidich S.D., Faddoul F.F., Hoyer L.L., Douglas L.J., Ghannoum M.A., *Journal of Dental Research*, **80**, pp. 903, 2001.
- Chao H.E., Yun Y.U., Xing F.H.U., Larbot A., *ECERS*, **23**, pp. 1457-1464, 2003.
- Chaudhury Manoj K., *Material Science and Engineering*, **R16**, pp. 97-159, 1996.
- Chen W., Liu Y., Courtney H.S., Bettenga M., Agrawal C.M., Bumgardner J.D., Ong J.L., *Biomaterials*, **27**, pp. 5512-5517, 2006.
- Chen S.F., Li J.P., Qian K., Xu W.P., Lu Y., Huang W.X., Yu S.A., *NanoResearch*, **3**, pp. 244-255, 2010.
- Cheng Q., Li C., Pavlinek V., Saha P., Wang H., *Applied Surface Science*, **252(12)**, pp. 4154-4160, 2006

- Chiaverini V., “*Tecnologia Mecânica: Processos de fabricação e tratamento*”, Vol.II, 2ª edição, Makron Books. São Paulo: 1986.
- Claus, G.W., *Understanding microbes: a laboratory textbook for microbiology*, W.H. Freeman and Company; 1989.
- Coblentz W.S., “*Ceramics and Glasses: Engineered Materials Handbook*”, ASM International, Vol.4, 1991
- Correia L.G., “*Diabetes: Factos e Números 2010. Relatório Anual do observatório Nacional da Diabetes Portugal*”, Observatório da Diabetes, 2010.
- Costa M. e Almeida M., “*Fundamentos da Física*”, Almedina, 2ª edição, 2004.
- Cowen L.E., Kohn L.M., Anderson J.B., *Journal of Bacteriology*, **183**, pp. 2971-2978, 2001.
- Crossley K.B., Jefferson K.K., Archer G., Fowler V.G., “*Staphylococci in Human Diseases*”, Wiley-Blackwell, 2009.
- Dias A. Romão, “*Ligação Química*”, IST Press, 2006.
- Diebold Ulrike, *Surface Science Reports*, **48**, pp. 53-229, 2003.
- Eisberg e Resnick, “*Física Quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas*”, Elsevier (editora Campus), 24ª tiragem, 1979.
- Ekwall B., Silano V., Paganuzzi-Stammati A., Zucco F., *Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures*, John Wiley & Sons Ltd, Chapter 7, 1990.
- Disponível em: http://dgc.stanford.edu/SCOPE/SCOPE_41/SCOPE_41_2.02_Chapter_7_75-98.pdf.
- Enghah P., “*Encyclopedia of the Elements: Technical Data, History, Processing and Applications*”, Wiley-VCH, 2004.
- Esfahani M.N. e Habibi M.H., *International Journal of Photoenergy*, **2008**, doi:10.1155/2008/628713, 2008.
- Ewald A., Gluckermann S.K., Thull R., Gbureck U., *BioMedical Engineering Online*, **5**, 22, 2006.
- Feil A.F., “*Deposição e Caracterização de filmes finos de TiO_x formados por DC magnetron sputtering reactivo: transição estrutural*”, Tese de Mestrado, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.
- Feng Q. L., Wu J., Chen G. Q., Cui F. Z., Kim T. N., Kim J. O., *Journal of Biomedical Materials Research*, **52**, pp. 662, 2000.

BIBLIOGRAFIA

Foster H.A., Sheel D.W., Sheel P., Evans P., Varhese S., Rutschke N., Yates H., *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, **216**, pp. 283-289, 2010.

Freshney, R.I., *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5ª edition, Wiley, 2000.

Gabriel M.R.S., *El paciente amputado: Labor de equipo*, Springer-Verlag Ibérica, 1ª edição, 2001.

Gailey R., McFarland L.V., Cooper R.A., Czerniecki J., Gambel J.M., Hubbard S., Maynard C., Smith D.G., Raya M., Rieber G.E., *Journal of Rehabilitation Research & Development*, **47(4)**, pp. 317-332, 2010.

Galdikas, Arvidas, *Surface Science*, **600**, pp. 2705-2710, 2006.

Gan D., *Diabetes Atlas*, International Diabetes Federation, 3rd edition, 2006.

Geertzen J.H.B., Martina J.D., Rietman H.S., *Prosthetics and Orthotics International*, **25**, pp. 14-20, 2001.

Giavaresi G, Tschon M, Daly JH, Liggat JJ, Sutherland DS, Agheli H, Fini M, Torricelli P, Giardino R., *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(12), pp. 1405-1423, 2006.

Giessibl F.J., *Advances in atomic force microscopy*, Review of Modern Physics, 2003.

Gogotsi Y., Domnich V., Aratyn Y, Kriven W., *Review on Advanced Materials Science*, **17**, pp. 33-41, 2008.

Gribb A.A. e Banfield J.F., *American Mineralogist*, **82**, 717, 1997.

Gotic M., Ivanda M., Sekulic A., Music S., Popovic S., Turkovic A., Furik K., *Materials Letters*, **28**, pp. 225-229, 1996.

Hagberg H., Branemark R., *Prosthetics and Orthotics International*, **25**, pp. 186-194, 2001.

Hall E. O., *Proceedings of the Physical Society of London*, **643**, 747, 1951.

Hansen J.O., Lira E., Galliker P., Wang J.-G., Sprunger P.T., Li Z., Lagsgaard E., Wendt S., Hammer B., Besenbacher F., *Journal of Physical Chemistry*, **114**, pp. 16964-16972, 2010.

Harriott M.M. e Noverr M.C., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53(9)**, pp. 3914-3922, 2009.

Hengerer R., Bolliger B., Erbudek M., Gratzel M., *Surface Science*, **460**, pp. 162-169, 2010.

Henry D. e Goodge J.

disponível em: http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/wds.html – 3/08/2011.

- Horakova M., Martin N., Aubry E., Spatenka P., *Catalysis Letters*, **132**, pp. 244-247, 2009.
- Horcas I., Fernandez R., Gomez-Rodriguez J.M., Colchero J., Gomez-Herrero J., Baro A. M., *Review of Scientific Instruments*, **78**, 013705, 2007.
- Hsieh Y-L. e Timm D.A., *Journal of Colloid and Interface Science*, **123(1)**, pp. 275-286, 1988.
- Huang H-L., Chang Y-Y., Lai M-C., Lin C-R., Lai C-H., Shieh T-M., *Surface and Coatings Technology*, **205**, pp. 1636-1641, 2010.
- Humphrey J.H. e Lightbown J.W., *Journal of general Microbiology*, **7**, pp. 129-143, 1952.
- Hwang J., Lee S.B., Oh K.T., Kim K.N., Kim K.M., *Key Engineering Materials*, vols. **309-311**, pp. 379-382, 2006.
- Irwin P.L., Nguyen L.T., Paoli G.C., Chen C., *BMC Microbiology*, **10**, pp. 207-221, 2010.
- IUPAC, *Pure and Applied Chemistry*, **66(8)**, pp. 1667-1738, 1994.
- Jamuna-Thevi K., Bakar S.A., Ibrahim S., Shahab N., Toff M.R.M., *Vacuum*, In Press, 2011. doi:10.1016/j.vacuum.2011.06.011.
- Janmey P.A., Winer J.P., Murray M.E., Wen Q., *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **66**, pp. 597, 2009.
- Joshi V.A., "Titanium Alloys: An atlas of Structures and Fracture Features", CRC Taylor&Francis, 2006.
- Joyce-Wöhrmann and Münstedt H., *Infection*, **27(1)**, S46-S48, 1999.
- Jung L.-K., Lee S.B., Boo J.-H., Ku S.-J., Yu K.-S., Lee J.-W., *Surface and Coatings Technology*, 174-175: 296-302, 2003.
- Kamusewitz H. e Possart W., *Applied Physics A*, **76**, pp. 899-902, 2003.
- Kandasamy K., Surplice N.A., *Journal of Physics: Condensed Solid State Physics*, **13**, pp. 689-694, 1980.
- Kapandji A.I., "Fisiologia Articular: esquemas comentados de mecânica humana", vol. II, 5ª edição, Editora Manole LTDA, 1990.
- Kapp S.C.P., Cummings D.C., "Transibial Amputation: Prosthetic Management, Atlas of Limb Prosthetics: Surgical", Prosthetic and Rehabilitation Principles; Chapter 18.
Disponível em: <http://www.oandplibrary.org/alp/chap18-02.asp?mode=print>. Consultado 22-08-2011.

BIBLIOGRAFIA

- Kholmonov I.N., Barborini E., Vinati S., Piseri P., Podestà A., Ducati L., Lenardi C., Milani P., *Nanotechnology*, **14**, pp. 1168-1173, 2003.
- Kim J.S., Kuk E., Yu K.N., Kim J.H., Park S.J., Lee H.J., Kim S.H., Park Y.K., Park Y.H., Hwang C.Y., Kim Y.K., Lee Y.S., Jeong D.H., Cho M.H., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **3**, pp. 95–101, 2007.
- Kocevan K., Thesis: *Physics of surfaces and interfaces*; Jozef Stefan International Postgraduate School, March 2005.
- Koishi T., Yasuoka K., Fujikawa S., Ebisuzaki T., Zeng X.C., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, pp. 8435-8440, 2009.
- Krumeick F., *Properties of electrons, their interactions with matter and applications in electron microscopy*, Laboratory of Inorganic Chemistry, disponível em <http://www.microscopy.ethz.ch/downloads/Interactions.pdf>, consultado em 3-08-2011.
- Kuo Y.L., Chen H.W., Ku Y., *Thin Solid Films*, **515**, 3461, 2007.
- Labat F., Baranek P., Domain C., Minot C., Adamo C., *Journal of Chemical Physics*, **126**: 154703, 2007.
- Lando A., Kébaïli N., Cahuzac Ph, Collix C., Couillard M., Masson A., Schmidt M., Bréchnignac C., *European Physical Journal D*, **43**, pp. 151-154, 2007.
- Langevin P., Gravenstein N., Doyle T.J., Roberts S.A., Skinner S., Langevin S.O., Gulig P.A., *Anesthesiology*, **91**, pp. 1394-1400, 1999.
- Li J., Qiao Y., Ding Z., Liu X., *Surface and Coating Technology*, **205**, pp. 2430-2436, 2011.
- Liborio L., Harrison N., “*The thermodynamics of oxygen defective Magnéli phases in rutile: a first principles study*”, APS/123 QED, 2008.
- Liu Y., Liu C.-Y., Rong Q.-H., Zhang Z., *Applied Surface Science*, **220**, pp. 7-11, 2003.
- Liu Y., Choi H., Dionysiou D., Lowry G.V., *Chemistry of Materials*, **17**, pp. 5315–5322, 2005
- Loosdrecht M.C.M., Norde W., Lyklema J., Zehnder A.J.B., *Aquatic Sciences*, **52(1)**, 1990.
- Louro C.M., “*Comportamento do Sistema W-Si-N Função do Teor de Silício*”, Tese de Doutorado em Ciências dos Materiais, Universidade de Coimbra, 2000.
- Lütjering G., Williams J., “*Titanium*”, Springer-Verlag, 2003.

- Madigan M.T., Martinko J., Parker J., *"Brock Biology of Microorganisms"*, 8^a edition, Prentice Hall International, 1997.
- Mak A.F.T, *Journal of Rehabilitation and Development*, **38**(2), pp. 161-174, 2001.
- Mann A. B., *Nanotribology and Nanomechanics*, Part II, pp. 575-622, Springer, 2005.
- Manning L., Rogers B., Jones M., Adams J.D., *Review of Scientific Instruments*, **74**(9), pp. 4220-4222, 2003.
- Margaret I.P., Lui S.L., Poon V.K.M., Lung I., Burd A., *Journal of Medical Microbiology*, **55**, pp. 59-63, 2006.
- Marques H.P., Canário A.R., Moutinho A.M.C., Teodoro O.M.N.D., *Journal of Physics: Conference Series*, **61**, pp. 775-779, 2007.
- Martin N., Rousselot C., Palmino F., Mercier R., *Thin Solid Films*, **300**, pp. 113-121, 1997.
- Mattox D.M., *"Handbook of Physical Vapor Deposition Processing"*, 2nd edition, Elsevier, 2010.
- McHale G., *Langmuir*, **23**, pp. 8200-8205, 2007.
- Meldrum Al., Haglund R.F., Boatner L.A., White C.W., *Advanced Materials*, **13**, pp. 1431, 2001.
- Miyagi T., Kamei M., Ogawa T., Mitsuhashi T., Yamazaki A., Sato T., *Thin Solid Films*, **442**, pp. 32-35, 2003.
- Moutin M-J., Abramson J.J., Salama G., Dupont Y., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **984**(3), pp. 289-292, 1989.
- MRS Bulletin, *Mechanical Behaviour of NanoStructured Materials*, **24**, 34, 1999.
- Murray C.D. e Fox J., *Disability and Rehabilitation* **24**(17): 925-931, 2002.
- Musil J., *Nanostructure Science and Technology*, 407-463, 2006. DOI: 10.1007/978-0-387-48756-4_10.
- Mwabora J., Lindgren T., Averdano E., Jaramillo T., Lu J., Lindquist S.E., Granquist C.G., *Journal of Physical Chemistry B*, **108**, pp. 20193-20198, 2004.
- Nalwa H.S., *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, **6**, pp. 505-535, 2004.
- Nasab M.B. e Hassan M.R., *Trends in Biomaterials & Artificial Organs*, **24**(1), pp. 69-82, 2010.

BIBLIOGRAFIA

- Neumann E.S., *Journal of Prosthetics and Orthotics*, **13**, pp. 111-122, 2001.
- Nordberg G. *et al.*, "*Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds*", Marcell Dekker, pp. 619-624, New York 1998.
- Nover L., Scharf K. D., Neumann D., *Molecular and Cellular Biology*, **3**, pp. 1648-1655, 1983.
- Oh J-H., Lee H., Kim D., Seong T-Y., *Surface and Coatings Technology*, **206**, pp. 185-189, 2011.
- Oliver W.C. e Pharr G.M., *Journal of Materials Research*, **19(1)**, 2004.
- Olson R.R., King M.E. Wehner G.K., *Journal of Applied Physics*, **50**, pp. 3677-3684, 1979.
- Orrenius S., McCabe M.J., Nicotera P., *Toxicology Letters*, **64-65**, pp. 357-364, 1992.
- Paiva, C., *Medicina Interna*, **7(4)**, pp. 234-238, 2001.
- Panayala N.R., Pena-Méndez E.M., Havel J., *Journal of Applied Biomedicine*, **6**, pp. 117-129, 2008.
- Patankar, Neelesh A., *Langmuir*, **19(4)**, pp. 1249-1253, 2003.
- Pawar S.G., Patil S.L., Chougule M.A., Jundale D.M., Patil V.B., *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, **22**, pp. 260-264, 2011.
- Pelczar M.J., Chan E.C.S., Krieg N.R., "*Microbiologia*", vol.II, McGraw Hill, 1981.
- Pelham R.J. e Wang Y., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **94**, 13661, 1997.
- Pellicer J., Garcia-Morales V., Hernández M.J., "*On the demonstration of the Young-Laplace equation in introductory physics courses*", Departamento de Termodinâmica, Universidade de Valência, disponível em: <http://www.uv.es/~juliop/docencia/Young-Laplace.pdf>.
- Petch N.J., *Journal of Iron and Steel Institute*, **174**, pp. 25, 1953.
- Piedade A.P., Vieira M.T., Martins A., Silva F., *Nanotechnology*, **18**, pp. 105103-105107, 2007.
- Prechtel A.K., *Forschungszentrum Julich GmbH*, **31**, 2005.
- Qin X.Y., Wu X.J., Zhang D., *NanoStructured Materials*, **5(1)**, pp. 101-110, 1995.
- Rahman M., Yu G., Soga T., Jimbo T., Ebisu H., Umeno M., *Journal of Applied Physics*, **88**, 4634, 2000.

- Ranade M.R., Navrotsky A., Zhang H.Z., Banfield J.F., Elder S.H., Zaban A., Borse P.H., Kulkarni S.K., Doran G.S., *Proceeding of the National Academy of Science*, **99**, pp. 6476-6481, 2002.
- Reijnt P., "*Functional analysis of Candida albicans genes encoding SH3-domain containing proteins*", PhD Thesis, University of Copenhagen, 2010.
- Reger D., Goode S., Mercer E., "*Chemistry, Principles and Practice*", Saunders College Publishing, 1993.
- Rielele F.L.S. , *The HeelFoot: Design of PlantarFlexing Prosthetic Foot*, Thesis, Twente University, 2003.
- Roberts R.B., *Journal of Physical D: Applied Physic*, **14**, L163:166, 1981.
- Rocha J., Apontamentos de apoio à Disciplina de Biossensores e Sinais Biomédicos, 2010/2011.
- Sá C. e Monteiro F.P., *Apontamentos: Técnicas de caracterização morfológica, microestrutura e microanalítica de superfície aplicadas aos materiais*.
- Santos V.P., Silveira D.R., Caffaro R.A., *São Paulo Medical Journal*, **124** (2), pp. 66-70, 2006.
- Sarkar S., Jana A.D. Samanta S.K., Mostafa G., *Polyhedron*, **26**, pp. 4419-4426, 2007.
- Schrand A.M., Rahman M.F., Hussain S.M., Schlager J.J., Smith D.A., Syed A.F. *Nanomed Nanobiotechnology*, **2**, pp. 544-568, 2010.
- ScienTek, disponível em: <http://www.stabilitysystem.com/arrheniusEquation.pdf> consultado em 9-08-2011.
- Schields P.J., Dunwoody N., MamaK., Gendron C., Bater S., *JCPDS – International Centre for Diffraction Data*, ISSN 1097-0002, 2008.
- Schierholz J.M., Lucas L.J., Rump A., Pulueren G., *Journal of Hospital Infection*, **40**, pp. 257-262, 1998.
- Schuisky M., Harsta A., Aidla A., Kukli K., Kiisler A.A., Aarik J., *Journal of Electrochemistry Society*, **147**, pp. 3319-3325, 2000.
- Seeley R.R., Stephens T.D., Tate P., "*Anatomia e Fisiologia*", McGraw Hill/ Lusociência , 6ª edição, 2005.
- Seery M.K., George R., Floris P., Pillai S.C., *Journal of Photochemistry Photobiology A*, **189**, pp. 258, 2007.
- Singleton P., "*Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*", 4ª edição, John Wiley and Sons, 1997.
- Skevington S.M., Lotfy M., O'Connell K.A., *Quality of Life Research*, **13**, pp. 299-310, 2004.

BIBLIOGRAFIA

- Skooq A., “*Princípios de Análise Instrumental*”, Bookman Porto Alegre, 5ª edição, 2002.
- So W.W., Park S.B., Moon S.J., *Journal of Materials Science Letters*, **17**, pp. 1219-1222, 1998.
- Sousa J., Ferreira W.F.C., “*Microbiologia*”, vol.I, Lidel, 1998.
- Sousa J., Casanova J.L., Pedroso P., Mota A., Gomes A.T., Seiceira F., Fabela S., Alves T., “*Elementos de Caracterização das Pessoas com deficiência e incapacidade em Portugal*”, CRPG e ISCTE, 2007.
- Springer S., “*Free Carriers in nanocrystalline titanium dioxide thin films*”, PhD thesis, Université de Bâle, 2004.
- So W.W., Park S.B., Moon S.J., *Journal of Materials Science Letters*, **17**, pp. 1219-1222, 1998.
- Sodré F. B., “*Elementos de Cristalografia*”, Fundação Calouste Gulbenkian, 2ª edição, 1996.
- Song D-H., Uhm S-H., Lee S-B., Han J-G., Kim K-N., *Thin Solid Films*, **519**, pp. 7079-7085, 2011.
- Sun S-Q., Sun B., Zhang W., Wang D., *Bulletin of Material Science*, **31(1)**, pp. 61-66, 2008.
- Takeda S., Suzuki S., Odaka H., Hosono H., *Thin Solid Films*, **392**, pp. 338-344, 2001.
- Thompson C.V., *Annual Review Materials Science*, **30**, 159-190, 2000.
- Tiwari D.K., Behari J., Sen P., *Current Science*, **95(5)**, 2008.
- Torrell M., Adochite R.C., Cunha L., Barradas N.P., Alves E., Beaufort M.F., Rivière J.P., Cavaleiro A., Dosta S., Vaz F., submetido *Journal of Nano Research*, 2011.
- Tsymbal E.Y., *Crystal Binding*, Physics **928** section 3
disponível em: http://physics.unl.edu/~tsymbal/teaching/SSP-927/Section%2003_Crystal_Binding.pdf – 18-08-2011.
- Vaz F., Adochite R.C., Torrell M., Cunha L., Alves E., Barradas N.P., Cavaleiro A., Riviere J.P. Eyidi D., *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, **5** (1), pp. 73-79, 2011.
- Vaz F., Adochite R.C., Torrell M., Cunha L., Alves E., Barradas N.P., Cavaleiro A., Munteanu D., Riviere J.P., Bourhis E.L., *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, submetido 2011.
- Venables, John A., “*Introduction to Surface and Thin Film Processes*”, Cambridge University Press, 2000.
- Viseu T.M.R. e Ferreira M.I.C., *Vacuum*, **52**, 115-120, 1999.

- Wagner L.V., Bagley A.M., James M.A., *Journal of Prosthetics and Orthotics*, **19(2)**, 2007.
- Wang S.F., Hsu Y.-F., Lee Y.-S., *Ceramics International*, **32**, pp. 121-125, 2006.
- Wenzel T., Bosbach J., Stietz F., Trager F., *Surface Science*, **432**, pp. 257-264, 1999.
- Wenzel R.N., *Journal of Physical Chemistry*, **53(9)**, pp. 1466-1467, 1949.
- Winters H.F., *Journal of Vacuum Technology*, **3**, pp. 493, 1982.
- Wolgemuth C.W., *Physics*, **4: 4**, 2011. DOI: 10.1103/Physics.4.4.
- Yokoyama, A., Komiyama, H., Inoue, H., Masumoto, T., Kimura, H.M., *Journal of Catalysis*, **68**, pp. 355-361, 1981.
- Yu B., Leung K.M., Guo Q., Lau W.M., Yang J., *Nanotechnology*, **22(115)**, pp. 603, 2011.
- Zakrzewska K., Radecka M., Kruk A., Osuch W., *Solid State Ionics*, **157**, pp. 349-356, 2003.
- Zhang C. e Lindan P.J.D., *Journal of Chemical Physics*, **118**, pp. 10, 2003.
- Zhang H. e Banfield J.F., *Journal Physics Chemistry B*, **104**, pp. 3481-3487, 2000.
- Zhang W., Li Y., Wang F., *Journal of Matter Science Technologic*, **18(2)**, 2002.
- Zhang W., Zhu S., Li Y., Wang F., *Journal of Material Science Technologic*, **20(1)**, 2004.
- Zhang W., Zhang M.S., Yin Z., *Physical Status Solid A*, **179(319)**, 2000.
- Zhou W., Zhong X., Wu X., Yuan L., Shu Q., Xia Y., *Journal of the Korean Physical Society*, **49(5)**, pp. 2168-2175, 2006.
- Zisman W.A., *Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution*, US Naval Research Laboratory, 1964.

Referências eletrônicas:

- 1 - <http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/matan/teaching/download/fracture.pdf>.
- 2 - <http://mee-inc.com/sem.html>.
- 3 - <http://www.materials.ac.uk/elearning/matter/IntroductionToElectronMicroscopes/SEM/everhart.html>.
- 4 - http://www.edcc.com.cn/pdf/OCA20_E.pdf.
- 5 - <http://www.idf.org/node/1255?unode=F2E52CF1-7C7D-40D8-821B-46C9A815F086>.
- 6 - <http://www.oandp.com/resources/patientinfo/manuals/bkindex.htm>.
- 7 - http://www.einstein.edu/rx_files/mossrehab/amputee-manual.pdf.
- 8 - http://www.brighamandwomens.org/Patients_Visitors/pcs/RehabilitationServices/Physical%20Therapy%20Standards%20of%20Care%20and%20Protocols/General%20-%20LE%20Amputation.pdf.
- 9 - <http://www.xn--amputao-2wa9a.com/amputacao-complicacoes.html>.
- 10 - <http://emedicine.medscape.com/article/317358-overview>.
- 11 - <http://www.albertadiabetes.ca/pdf/atlas/O9/Atlas-6%28web%29.pdf>.
- 12 - http://www-physics.lbl.gov/~spieler/SLAC_Lectures/PDF/Sem-Det-I.pdf.
- 13 - http://media.library.ku.edu.tr/Standards/ISO_10993-1.pdf.
- 14 - http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/PI-DAL1025-1100_T1%20AlamarBlue%20Rev%201.1.pdf
- 9/08/2011.
- 15 - <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/58441/Beers-law>. Consultado 14-08-2011.
- 16 - Gwiddion - <http://gwyddion.net> - Consultado 9-08-2011
- 17 - <http://www.specialchem4adhesives.com/home/editorial.aspx?id=1785>. Consultado 21-08-2011.