

Jorge Manuel Ramos Nunes

# FILMES FINOS HÍBRIDOS NANOESTRUTURADOS COMPATÍVEIS COM O TECIDO NERVOSO

Tese de Doutoramento na área científica de Engenharia de Materiais, orientada pela Senhora Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade e pelo Senhor Professor Doutor Carlos Jorge Bandeira Duarte e apresentada ao departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA





Universidade de Coimbra  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Departamento de Engenharia Mecânica

# **Filmes finos híbridos nanoestruturados compatíveis com o tecido nervoso**

Tese para a obtenção do grau de Doutor em  
Engenharia de Materiais

Jorge Manuel Ramos Nunes

Coimbra  
2013





## Ficha Técnica

**Título:** Filmes finos híbridos nanoestruturados compatíveis com o tecido nervoso

**Autor:** Jorge Manuel Ramos Nunes

**Editor:** Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra

**Capa:** Imagens ilustrativas de alguns dos resultados deste trabalho;

**Quadrante superior esquerdo:** Imagem de microscopia eletrónica de transmissão do filme fino SiAgAu5.

**Quadrante superior direito:** Imagem de microscopia de força atómica da superfície SiAgAu4

**Quadrante inferior esquerdo:** Imagem de microscopia de fluorescência da superfície SiAgAu4 após teste com cultura de células neuronais.

**Quadrante inferior direito:** Imagem de microscopia eletrónica de varrimento da superfície SiAgAu4 após teste com cultura de células neuronais.

Bolsa de doutoramento (SFRH / BD / 47586 / 2008) financiada por:



# FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR





## Agradecimentos

*5 anos... ou 5 dias?...*

*O tempo passou sem parar,  
Rodopiando louco entre círculos abertos,  
Cruzando-se por entre sombras e Holofotes,  
Vultos esquecidos numa música...*

*Muitas pessoas cruzaram seus caminhos,  
Entre cortinas esquecidas no tempo,  
Incógnitas do início e do fim,  
Sem nome, forma ou sabor,  
Tentação solta livre de pecado.*

*Tudo começa, tudo acaba,  
Mesmo sem sabermos razão ou significado,  
Entre batuques sentidos que formam música,  
Letras escritas sobre um joelho dorido  
Por rastejar em caminhos menos dignos...*

*Frases sentidas num furacão de sensações,  
Doces sensações estaladiças mexidas com um garfo,  
Feitas com o calor suave de um coração gentil,  
Servidas no início de mais um dia...  
Ou terá sido a Alvorada de mais um ano?*

*O tempo perdeu-se,  
Mas ganharam-se memórias, saber,  
Ligações indeléveis pelo tempo em si,  
Marcadas com um sorriso que alegra um adormecer,  
E um fim que foi mais um início...*

*E tanto começar como acabar cruzam-se,  
Começam num ponto, num ritmo, a 1/4 do fim...  
Ou a 3/4 do início?...  
Não sabemos, nem interessa...  
Tudo são memórias já...*

*Tal como um agradecer sentido é feito durante o caminho,  
Nunca fingido em vão num fim,  
Desperdiçado por entre linhas nunca mais lidas.  
Aqui, eu não vos agradeço.  
Aqui, eu vos relembro, pois nunca vos esquecerei.*

## Resumo

O interesse no desenvolvimento de materiais para aplicações médicas é enorme e as oportunidades da sua utilização na área das neurociências são consideradas como revolucionárias, com um número vasto de potenciais aplicações. Uma dessas aplicações consiste na utilização de elétrodos que permitem fornecer estímulos elétricos ao tecido nervoso, permitindo, por exemplo, reestabelecer a audição em surdos profundos e o tratamento de várias patologias associadas ao sistema nervoso central tais como a epilepsia, a doença de Alzheimer, o tratamento de dor crónica ou a depressão profunda resistente a fármacos. De facto, este tipo de tratamento demonstrou a sua eficácia, mas a reação adversa do organismo tem como consequência a formação da cicatriz glial, que isola o elétrodo do tecido circundante tornando-o incapaz de desempenhar a sua função.

As abordagens efetuadas com o objetivo de resolver os problemas associados à utilização de elétrodos neuronais passam pelo material maciço, onde a investigação de novos materiais ou a modificação da forma e geometria dos materiais usualmente utilizados são algumas das vias seguidas por diferentes grupos de investigação. Outra linha de investigação que tem sido seguida é a da modificação da superfície de elétrodos já disponíveis no mercado com o objetivo de melhorar a compatibilidade química, biológica e mecânica entre a superfície do elétrodo invasor e o complexo sistema celular que constitui o sistema nervoso central. O objetivo deste trabalho enquadra-se nesta última linha de trabalho, e abordou a modificação de um dos materiais mais utilizados nestas aplicações – o silício – pela deposição de filmes finos híbridos (cerâmico/metal) nanoestruturados utilizando a técnica de pulverização catódica.

Os revestimentos desenvolvidos resultaram da codeposição a partir de alvos de sílica, de prata, de ouro e de cobre. Os revestimentos depositados podem ser agrupados nos que continham apenas um elemento metálico (designados por SiAg, SiAu e SiCu) e nos que resultaram da codeposição com dois elementos metálicos (designados por

SiAgAu, SiCuAg e SiCuAu). As superfícies modificadas foram caracterizadas exaustivamente sendo de salientar os seguintes aspetos: i) todos os filmes finos, com teores de metal inferiores 30%at., apresentaram uma estrutura nanocompósita constituídos por uma matriz amorfa de sílica onde o(s) elemento(s) metálico(s) de dimensões nanométricas se encontra(m) disperso(s); ii) o estudo topográfico das superfícies evidenciou que o tamanho de partícula era inferior a 100 nm e a rugosidade superficial média inferior a 25 nm. Após a avaliação da adesão dos filmes, por um teste específico para a aplicação final, as superfícies moderadamente hidrófilas e com valores de potencial zeta medianamente negativo foram selecionadas para os ensaios onde foi avaliada a sua capacidade antimicrobiana.

As estirpes de bactérias selecionadas, *Acinetobacter lwoffii* (DSM 2403), *Enterococcus faecalis* (LMG 7937) e *Pseudomonas aeruginosa* (LMG 1242), são das mais referenciadas como agentes patogénicos em termos de infeções nosocomiais. Os testes realizados aferiram através da formação de um halo de inibição de crescimento quando em contato com os meios sólidos inoculados, bem como da capacidade de atuar na viabilidade celular através do impedimento na formação de colónias, quando os meios de suspensão das bactérias continham soro fisiológico previamente incubado com as superfícies em estudo.

Após o conjunto de caracterizações abióticas e bióticas, a superfície que se evidenciou como mais promissora, SiAgAu4, foi testada em cultura de células isoladas a partir do córtex frontal do embrião de rato. A cultura de células do córtex revelou que o revestimento, quando comparado com o material base do eletrodo, o silício, promoveu a adesão e diferenciação de células neuronais.

Em suma, os resultados mostram que os filmes finos desenvolvidos e estudados ao longo deste trabalho são promissores para serem utilizados na modificação de matrizes de silício usadas como implantes no sistema nervoso central.

**Palavras-Chave:** implantes neurais, silício, pulverização catódica, filmes finos nanoestruturados, propriedades antimicrobianas; cultura de células do córtex frontal.

## *Abstract*

There is an enormous interest in the development of materials for medical devices and the opportunities of its use in neurosciences area are revolutionary, with unlimited potential applications. One of the applications consists of neural electrodes which allow to deliver electric stimuli to the nervous tissue, allowing to re-establish audition in deep deafness and treatment in epilepsy, Alzheimer, chronic pain or drug resistant depression, among other diseases. In fact, this kind of treatment has shown its effectiveness, but the adverse reaction of the organism usually induces the isolating of the electrode, by the formation of the glial scar, and unable its correct function.

Several approaches have been made during the past decades to overcome these problems. One of the fields of research relays on the development of new bulk materials or new design of the conventional materials. Simultaneously, the conventional electrodes can be surface modified in order to allow a better biological, chemical and mechanical compatibility between the surface of the electrode and the complex system which constitutes the central nervous tissue.

Within this frame, the present work reports the development of nanostructured hybrid ceramic/metal thin films to modify the surface of one of the materials widely used as neural implant: silicon. The coatings were deposited by r.f. magnetron sputtering from silica and silver, gold, copper targets. Two different set of coatings were produced: those of silica with only one metallic element and a second set of thin films of silica co-deposited with a combination of two of the metals.

The modified surfaces were extensively characterized and it can be highlighted that all the thin films with metal content below 30 at.% where of nanocomposite nature with an amorphous silica matrix where the metallic element of nanometric dimension was dispersed.

The topographic study of the surfaces showed that the particle size was smaller than 100nm and surface average roughness inferior to 25nm. After the evaluation of the adhesion of the coatings by a specific test for the envisaged final application, the moderately hydrophilic surfaces with a negative zeta potential, described in the literature as the most favourable to the neuron growth, were selected for the antimicrobial tests.

The selected bacteria for the tests of the antimicrobial properties, *Acinetobacter lwoffii* (DSM 2403), *Enterococcus faecalis* (LMG 7937) e *Pseudomonas aeruginosa* (LMG 1242), are the most used pathogens for the study of nosocomial infections. The performed tests showed a growth inhibition halo for some of the modified surfaces in contact with the inoculated solid mediums. The viability tests revealed that some of the surfaces also inhibited the growth of colonies if the suspension medium contained the saline solution that was previously incubated with the tested surfaces. The thin film with the most promising results, SiAgAu4, was used in a cortex rat embryo cell culture.

The *in vitro* tests with the neural cells revealed that the presence of the coating minimized the microglia and astrocytes reaction and promoted neurons adhesion, when compared with the base material, silicon.

The results indicate that it is possible to successfully modify the surface of silicon with nanostructures ceramic/metal thin films. The preliminary *in vitro* results indicate very good antimicrobial properties along with very promising biological performance. Overall, the modified surfaces are good candidates for the modification of the surface of silicon neural implants

**Keywords:** neural implants, silicon, sputtering, nanostructured thin films, anti-microbial properties, frontal cortex cell culture.



## Abreviaturas e Símbolos

AFM	<i>Microscopia por força atômica, do inglês Atomic Force Microscopy</i>
BBB	<i>Barreira sangue-cérebro, do inglês Blood Brain Barrier</i>
BSA	<i>Albumina, do inglês Bovine Serum Albumin</i>
CNT	<i>Nano tubos de carbono</i>
DLC	<i>Diamond like carbon</i>
DO	<i>Densidade Ótica</i>
E	<i>Módulo de Elasticidade</i>
EBPVD	<i>Deposição física por feixe de eletrões, do inglês Electron Beam Physical Vapor Deposition</i>
EPMA	<i>Microanálise por sonda electrónica, do inglês Electron Probe Micro Analysis</i>
GFAP	<i>Proteína ácida fibrilar da glia, do inglês glial fibrillary acidic protein</i>
H	<i>Dureza</i>
HBSS	<i>Solução de Hank, do inglês Hank's Balanced Salt Solution</i>
ICDD	<i>Centro internacional de dados de difração, do inglês International Center for Diffraction Data.</i>
LB	<i>Meio Luria-Bertani</i>
MNB	<i>Meio Neuro Basal</i>
PBS	<i>Solução tampão fosfato, do inglês Phosphate-Buffered Solution</i>
PDMS	<i>Polidimetilsiloxano</i>
PEDOT	<i>Poli(3,4-etilenodioxitofeno)</i>
PPy	<i>Polipirrol</i>
PSS	<i>Poli(sulfonato de estireno)</i>
PTh	<i>Politiofeno</i>
PTFE	<i>Poli(tetrafluoroetileno)</i>
RGD	<i>Arginina-glicina-ácido aspartico</i>
SEM	<i>Microscopia electrónica de varrimento, do inglês Scanning Electron Microscopy</i>
SNP	<i>Sistema Nervoso Periférico</i>
SNS	<i>Sistema Nervoso Central</i>
TEM	<i>Microscopia electrónica de transmissão, do inglês Transmission Electron Microscopy</i>
UV	<i>Ultra-violeta</i>
$\tau_0$	<i>Tensão de adesão da água</i>



# Índice

<i><u>Introdução</u></i>	1
<i>Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica</i>	5
1.1 <i>Sistema Nervoso</i>	7
1.2 <i>Dispositivos invasivos neurais</i>	10
1.2.1 <i>Implantes nervosos</i>	10
1.2.2 <i>Implantes cerebrais</i>	13
1.2.3 <i>Materiais utilizados em elétrodos</i>	15
1.3 <i>Problemas associados aos dispositivos invasivos neurais</i>	17
1.3.1 <i>Reação biológica à inserção de elétrodos</i>	17
1.3.2 <i>Infeções nosocomiais</i>	19
1.4 <i>Modificação de elétrodos para estimulação do tecido nervoso</i>	28
<i>Capítulo 2 – Materiais e Procedimentos Experimentais</i>	37
2.1 <i>Materiais</i>	39
2.2 <i>Técnica de Deposição de filmes finos: Pulverização Catódica</i>	39
2.3 <i>Técnicas de caracterização</i>	45
2.3.1 <i>Microanálise por sonda eletrônica</i>	45
2.3.2 <i>Difração de Raios X</i>	44
2.3.3 <i>Microscopia Eletrônica de Varrimento</i>	46
2.3.4 <i>Microscopia eletrônica de Transmissão</i>	47
2.3.5 <i>Propriedades mecânicas</i>	47
a) <i>Dureza</i>	48
b) <i>Módulo de elasticidade</i>	48
2.3.6 <i>Adesão</i>	48

2.3.7 <i>Microscopia de Força Atômica</i>	49
2.3.8 <i>Ângulos de contacto</i>	49
2.3.9 <i>Potencial Zeta</i>	50
2.3.10 <i>Testes microbiológicos</i>	50
2.3.11 <i>Testes Celulares</i>	51
a) <i>Isolamento e cultura de neurónios do córtex frontal</i>	51
b) <i>Protocolo de imunocitoquímica</i>	52
<i>Capítulo 3 – Análise e Discussão de Resultados</i>	55
3.1 <i>Composição Química</i>	57
3.2 <i>Morfologia/Topografia</i>	64
3.3 <i>Estrutura</i>	80
3.4 <i>Propriedades mecânicas</i>	93
3.5 <i>Ângulos de Contacto</i>	99
3.5.1 <i>Tensão de adesão da água</i>	104
3.6 <i>Carga superficial e adesão</i>	108
3.7 <i>Testes in vitro</i>	117
3.7.1 <i>Células procarióticas</i>	117
3.7.2 <i>Células eucarióticas</i>	127
<i>Conclusões</i>	141
<i>Referencias Bibliográficas</i>	145
<i>Anexo 1 – Técnica de deposição: pulverização catódica</i>	A1
<i>Anexo 2 – Técnicas de caracterização</i>	A3
A2.1 – <i>Microanálise por sonda eletrónica (EPMA )</i>	A3
A2.2 – <i>Difração de raios X</i>	A6
A2.3 – <i>Microscopia Eletrónica</i>	A9
A2.3.1 <i>Microscopia eletrónica de varrimento (SEM)</i>	A10
A2.3.2 – <i>Microscopia eletrónica de transmissão (TEM)</i>	A11
A2.4 – <i>Propriedades mecânicas</i>	A12

<i>A2.5 – Microscopia de força atômica</i>	<i>A15</i>
<i>A2.6 – Ângulos de contato</i>	<i>A16</i>
<i>A2.7 – Potencial zeta</i>	<i>A17</i>
<i>Anexo 3 – Testes celulares para pré-seleção de superfícies</i>	<i>A19</i>
<i>Anexo 4 – Soluções utilizadas nos testes in vitro</i>	<i>A20</i>
<i>Anexo 5 – Fichas ICDD</i>	<i>A22</i>
<i>Anexo 6 – Diagramas de Fase</i>	<i>A28</i>
<i>Apêndice 1 – Desconvolução dos difratogramas</i>	<i>A30</i>
<i>Apêndice 2 – Testes microbiológicos</i>	<i>A40</i>
<i>A 2.1 – Formação do halo de inibição de crescimento</i>	<i>A40</i>
<i>A 2.2 – Avaliação da viabilidade celular de A.Lwoffii</i>	<i>A43</i>



# Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Esquema geral do sistema nervoso com destaque para o eixo somatossensorial (a) e o eixo motor (b) <sup>[adaptado de 1]</sup> .	7
<b>Figura 1.2</b> – Estrutura de um neurónio multipolar <sup>[adaptado de 1]</sup> .	9
<b>Figura 1.3</b> – Células constituintes do SNC <sup>[adaptado de 5]</sup> .	9
<b>Figura 1.4</b> – a) Esquema dos constituintes do implante coclear <sup>[adaptado de 10]</sup> ; b) parte interna de um implante coclear <sup>[adaptado de 11]</sup> .	11
<b>Figura 1.5</b> – Representação esquemática de um estimulador da medula espinal (a) e de um estimulador do nervo vago (b) <sup>[adaptado de 20]</sup> .	12
<b>Figura 1.6</b> – Representação esquemática do implante do eléctrodo e <i>pacemaker</i> em estimulação cerebral profunda <sup>[adaptado de 37]</sup> .	14
<b>Figura 1.7</b> – Algumas geometrias de eléctrodos de silício: a) concava, b) convexa <sup>[adaptado de 42]</sup> .	15
<b>Figura 1.8</b> – Distribuição de astrócitos no córtex cerebral de rato após implantação de um eléctrodo de silício. Os astrócitos foram marcados por imunocitoquímica, usando um anticorpo anti-GFAP. As preparações foram observadas por microscopia confocal 2 (A), 4 (B), 6 (C) e 12 (D) semanas após implantação do eléctrodo. O controlo foi efetuado pela inserção e remoção imediata do eléctrodo <sup>[adaptado de 61]</sup> .	19
<b>Figura 1.9</b> – Representação esquemática de uma bactéria (A) <sup>[adaptado de 77]</sup> e do detalhe da diferença da constituição da parede celular entre uma bactéria Gram positiva (B) e Gram negativa (C) <sup>[adaptado de 78]</sup> .	21
<b>Figura 1.10</b> – Representação esquemática do processo de formação do biofilme: 1) adesão inicial; 2) adesão irreversível; 3) e 4) estágios de maturação com a formação de micro e macro colónias; 5) dispersão <sup>[adaptado de 80]</sup> .	22
<b>Figura 1.11</b> – Esquema com as principais abordagens através das quais um material pode impedir a infeção bacteriana <sup>[adaptado de 72]</sup> .	24
<b>Figura 1.12</b> – Micrografia de SEM de <i>Acinetobacter lwoffii</i> <sup>[adaptado de 90]</sup> .	25
<b>Figura 1.13</b> – Micrografia de SEM de <i>Enterococcus faecalis</i> <sup>[adaptado de 93]</sup> .	25
<b>Figura 1.14</b> – Micrografia de SEM de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>[adaptado de 96]</sup> .	26

<b>Figura 1.15</b> – Representação esquemática dos efeitos toxicológicos de nanopartículas em biofilmes bacterianos. A ampliação central ilustra os efeitos irreversíveis das nanopartículas e dos seus iões em várias localizações das bactérias tais como: parede celular, DNA e mitocôndrias [adaptado de 101].	27
<b>Figura 1.16</b> – Micrografia de SEM da ponta de um eléctrodo metálico, isolado com um revestimento de Paralyne C® com 3µm de espessura [adaptado de 102].	28
<b>Figura 2.1</b> - Esquema da câmara de deposição: 1-Paredes da câmara de deposição; 2-Cátodo; 3-Alvo; 4-Proteção cátodo/alvo; 5-Anel de fixação do alvo; 6-Ligação ao gerador; 7-Valvula de vácuo acima da saída para a bomba de vácuo; 8-Anteparo; 9-Ânodo.	40
<b>Figura 2.2</b> – Esquema da disposição das mostras no porta amostras	42
<b>Figura 2.3</b> – Equipamento de EPMA utilizado.	45
<b>Figura 2.4</b> – Fotografia do equipamento de nanodureza utilizado.	47
<b>Figura 3.1</b> – Esquema ilustrativo do estado de equilíbrio na deposição por pulverização catódica de ligas metálicas.	63
<b>Figura 3.2</b> – Esquema ilustrativo da distribuição das espécies ejetadas a partir de dois alvos.	65
<b>Figura 3.3</b> – Micrografias representativas da superfície dos filmes finos de sílica com e sem dopagem com um metal.	66
<b>Figura 3.4</b> – Estágios diferentes no crescimento do revestimento de sílica e ouro: a) no estágio inicial há diversos pontos de nucleação; b) num estágio mais tardio, algumas das partículas já finalizaram o seu crescimento, enquanto ocorrem novas nucleações [adaptado de 173].	67
<b>Figura 3.5</b> – Simulação da estrutura final dos revestimentos resultantes da codeposição de sílica e ouro para: a) 5% at. de ouro; b) 10% at. de ouro (apenas está representada a fração correspondente ao ouro) [adaptado de 173].	68
<b>Figura 3.6</b> – Diagrama de Thornton. Zona 1: Estrutura porosa constituída por cristalites alongadas separadas por espaços vazios. Zona T: Estrutura de transição constituída por grãos fibrosos densamente empilhados. Zona 2: Constituída por grãos colunares. Zona 3: Estrutura constituída por grãos recristalizados [adaptado de 180].	69



<b>Figura 3.7</b> – Micrografias representativas da morfologia da secção transversal dos filmes finos de sílica dopados com um metal.	70
<b>Figura 3.8</b> – Micrografias representativas da morfologia da superfície dos filmes finos de sílica dopada com dois metais.	73
<b>Figura 3.9</b> – Micrografias representativas da morfologia da secção transversal dos filmes finos de sílica dopada com dois metais.	74
<b>Figura 3.10</b> – Imagens por microscopia de força atômica da superfície dos filmes de sílica: a) topografia; b) fase.	75
<b>Figura 3.11</b> – Imagens por microscopia de força atômica da superfície dos filmes de sílica codepositados com prata: a) topografia; b) fase.	76
<b>Figura 3.12</b> – Imagens por microscopia de força atômica da superfície dos filmes de sílica codepositados com Au, Cu, AgAu e CuAg: a) topografia; b) fase.	77
<b>Figura 3.13</b> – Difratoograma do alvo de sílica utilizado para a deposição dos filmes finos	80
<b>Figura 3.14</b> – Difractogramas dos filmes finos de sílica sem (azul) e com codeposição de ouro (de SiAu3 a SiAu8).	81
<b>Figura 3.15</b> – Difractogramas dos filmes finos de sílica sem (azul) e com codeposição de prata (de SiAg4 a SiAg8).	82
<b>Figura 3.16</b> – Difractogramas dos filmes finos de sílica sem (azul) e com codeposição de cobre (de SiCu4 a SiCu8).	83
<b>Figura 3.17</b> – Difractogramas dos filmes finos de sílica codepositados com prata e ouro (de SiAgAu2 a SiAgAu10).	84
<b>Figura 3.18</b> – Difractogramas dos filmes finos de sílica codepositados com cobre e prata (CuAg3 a CuAg10).	85
<b>Figura 3.19-</b> Difractogramas dos filmes finos de sílica codepositados com cobre e ouro (CuAu2 a CuAu8).	86
<b>Figura 3.20</b> – Micrografias de campo claro de microscopia eletrónica de transmissão, e respetivos padrões de difração, dos filmes finos de sílica codepositados com ouro.	87
<b>Figura 3.21</b> – Micrografias de campo claro de microscopia eletrónica de transmissão, e respetivos padrões de difração, dos filmes finos do sistema SiAg e SiCu.	88

<b>Figura 3.22</b> – Micrografias de campo claro de microscopia eletrônica de transmissão, e respectivos padrões de difração, dos filmes finos do sistema SiAgAu.	89
<b>Figura 3.23</b> – Micrografias de campo claro de microscopia eletrônica de transmissão, e respectivos padrões de difração, dos filmes finos do sistema SiCuAu.	90
<b>Figura 3.24</b> – Sobreposição de fotografias de campo escuro sobre campo claro de microscopia eletrônica de transmissão, onde os grãos coloridos correspondem aos que difratam segundo o primeiro anel visível.	90
<b>Figura 3.25</b> – Ensaios preliminares de nanoindentação sobre filmes do sistema SiAg, com várias profundidades de indentação, sobre dois substratos diferentes. Círculos abertos: substrato de aço; círculos fechados: substrato de silício.	94
<b>Figura 3.26</b> – Fotografias de lâminas de vidro após o ensaio de potencial zeta: a) sem alteração aparente (sim em adesão); b) com alteração visual (reagiu em adesão); c) falta de revestimento no final do ensaio (não em adesão).	112
<b>Figura 3.27</b> – Comparação de propriedades entre o cérebro e gel de ágar [adaptado de 220]	112
<b>Figura 3.28</b> – Fotografias representativas dos resultados observados durante o teste de formação do halo de inibição: SiO <sub>2</sub> sem halo de inibição; SiCuAu <sub>3</sub> com halo de inibição assimétrico; SiAgAu <sub>4</sub> com halo de inibição de 4mm; SiCu <sub>8</sub> com alteração da coloração.	117
<b>Figura 3.29</b> – Fotografias de microscopia ótica das superfícies após o teste de formação do halo de inibição com <i>A. lwoffii</i> .	120
<b>Figura 3.30</b> – Fotografias de microscopia ótica das superfícies após o teste de formação do halo de inibição de <i>E. faecalis</i> .	122
<b>Figura 3.31</b> – Fotografias de microscopia ótica das superfícies após o teste de formação do halo de inibição de <i>P. aeruginosa</i> .	124
<b>Figura 3.32</b> – Imagens por microscopia de força atômica da superfície dos filmes de sílica SiAgAu <sub>4</sub> e SiAgAu <sub>5</sub> após imersão em soro fisiológico: a) topografia; b) fase.	127

- Figura 3.33** – Neurónios do córtex cerebral mantidos em cultura sobre uma superfície de poli-D-lisina (a) ou de silício (b) durante 10 dias. As células foram observadas por microscopia ótica. 129
- Figura 3.34** – Neurónios do córtex cerebral mantidos em cultura sobre uma superfície de poli-D-lisina (a, b) ou de silício (c, d) durante 10 dias. As células foram observadas por microscopia eletrónica de varrimento 130
- Figura 3.35** – Neurónios do córtex cerebral mantidos em cultura sobre uma superfície de PDL, Si, SiAgAu4 ou SiAgAu5, durante 14 dias. As células foram observadas por microscopia eletrónica de varrimento. (barra = 10  $\mu\text{m}$ ) 131
- Figura 3.36** – Marcação de núcleos em culturas de células do córtex cerebral preparadas sobre superfícies de PDL, Si, SiAgAu4 ou SiAgAu5. As células foram cultivadas durante 14 dias antes da marcação com o corante de DNA Hoechst 33342. (barra = 200  $\mu\text{m}$ ) 132
- Figura 3.37** – Cultura de neurónios do córtex cerebral onde foi aplicado um trauma mecânico com uma agulha hipodérmica ao fim de 9 dias em cultura. Depois de efetuada a lesão, as células foram mantidas em cultura durante mais 5 dias antes de serem fixadas. As células foram cultivadas sobre uma superfície de PDL e a preparação foi observada num microscópio ótico. 135
- Figura 3.38** – Densidade celular e identificação de astrócitos em culturas de células do córtex cerebral, mantidas sobre lamelas revestidas com PDL (controlo). As células foram cultivadas sobre lamelas de vidro revestidas com PDL; ao 9º dia em cultura foi colocada sobre a lamela de vidro uma superfície revestida com Si (painel da direita) e as culturas foram mantidas durante mais 5 dias. As células em ambas as superfícies foram fixadas, incubadas com um anticorpo anti-GFAP (fluorescência verde) e coradas com Hoechst 33342 (fluorescência azul). As preparações foram visualizadas por microscopia de fluorescência. 136

<b>Figura 3.39</b> – Densidade celular e identificação de astrócitos em culturas de células do córtex cerebral, mantidas sobre lamelas revestidas com PDL (lamela controlo). As células foram cultivadas sobre lamelas de vidro revestidas com PDL; ao 9º dia em cultura foi colocada sobre a lamela de vidro uma superfície revestida com SiAgAu4 e as culturas foram mantidas durante mais 5 dias. As células em ambas as superfícies foram fixadas, incubadas com um anticorpo anti-GFAP (fluorescência verde) e coradas com Hoechst 33342 (fluorescência azul). As preparações foram visualizadas por microscopia de fluorescência.	137
<b>Figura A1.1</b> – Esquema do processo de deposição.	A2
<b>Figura A1.2</b> – Erosão preferencial em alguns alvos.	A3
<b>Figura A2.1</b> – Esquema da microssonda utilizada	A4
<b>Figura A2.3.1</b> – Esquema de funcionamento do equipamento SEM.	A10
<b>Figura A2.3.2</b> – Esquema de funcionamento do equipamento TEM.	A11
<b>Figura A2.4.1</b> – Gráfico típico de um ensaio de dureza. a) fase de carga; b) fase de fluência; c) fase de descarga.	A13
<b>Figura A2.4.2</b> – Diferença entre a profundidade de indentação corrigida e a real.	A14
<b>Figura A2.6.1</b> – Ângulo de contacto entre uma gota de líquido e uma superfície sólida.	A17

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1</b> – Condições de limpeza dos alvos e do substrato	41
<b>Tabela 2.2</b> – Condições de deposição dos filmes de sílica dopados com um metal: ouro, prata ou cobre	43
<b>Tabela 2.3</b> – Condições de deposição dos filmes de sílica dopados com dois metais: ouro e prata, prata e cobre, ouro e cobre.	44
<b>Tabela 2.4</b> - Condições utilizadas na análise quantitativa dos filmes finos operatórias da microsonda	45
<b>Tabela 3.1</b> – Designação e composição química dos filmes finos de sílica dopados com um metal.	57
<b>Tabela 3.2</b> – Designação e composição química dos filmes finos de sílica dopados com dois metais.	61
<b>Tabela 3.3</b> – Rugosidade média de superfície ( $S_a$ ), Rugosidade média quadrática da superfície ( $S_{ms}$ ), <i>skew</i> , <i>kurtosis</i> e área real da superfície (ARS) dos revestimentos de sílica codepositada com um metal.	78
<b>Tabela 3.4</b> – Rugosidade média de superfície ( $S_a$ ), Rugosidade média quadrática da superfície ( $S_{ms}$ ), <i>skew</i> , <i>kurtosis</i> e área real da superfície (ARS) dos revestimentos de sílica codepositados com dois metais.	79
<b>Tabela 3.5</b> – Estrutura dos filmes finos de sílica dopados com um metal após caracterização por DRX e TEM.	91
<b>Tabela 3.6</b> – Estrutura dos filmes finos de sílica dopados com dois metais após caracterização por DRX e TEM.	92
<b>Tabela 3.7</b> – Dureza e módulo de elasticidade dos filmes finos de sílica dopados com um metal.	96
<b>Tabela 3.8</b> – Dureza e módulo de elasticidade dos filmes finos de sílica dopados com dois metais	98
<b>Tabela 3.9</b> – Valores médios e desvio padrão dos ângulos de contacto, aparente e real (modelo de Wenzel), entre água e filmes finos de sílica codepositados com um metal.	100
<b>Tabela 3.10</b> – Ângulo de contacto original e de Wenzel em água dos filmes finos de sílica dopados com 2 metais	103

<b>Tabela 3.11</b> – Tensão de adesão da água ( $\tau_0$ ) dos filmes finos de sílica dopados com um metal.	106
<b>Tabela 3.12</b> – Tensão de adesão da água ( $\tau_0$ ) dos filmes finos de sílica dopados com dois metais.	107
<b>Tabela 3.13</b> – Adesão e potencial zeta das superfícies. As amostras a sombreado são as que apresentam resultados menos favoráveis para a cultura de células neurais.	110
<b>Tabela 3.14</b> – Avaliação da adesão dos filmes finos ao substrato de silício pelo ensaio de inserção em ágar.	113
<b>Tabela 3.15</b> – Resumo das principais propriedades/características dos revestimentos de sílica codepositados com um metal (A sombreado estão assinaladas as superfícies que foram excluídas para os testes <i>in vitro</i> ).	115
<b>Tabela 3.16</b> – Resumo das principais propriedades/características dos revestimentos de sílica codepositados com dois metais (A sombreado estão assinaladas as superfícies que foram excluídas para os testes <i>in vitro</i> ).	116
<b>Tabela 3.17</b> – Resultados da presença ou ausência do halo de inibição de crescimento bacteriano e características do mesmo após contacto com as superfícies revestidas.	118
<b>Tabela 3.18</b> – Variação da percentagem de inibição na formação de CFU <i>A.lwoffii</i> exposta ao soro fisiológico que esteve em contacto com as superfícies.	126

## *Introdução*

A utilização de materiais não biológicos no organismo para restaurar, substituir ou reforçar funções biológicas está na base do desenvolvimento de biomateriais. Apesar de, desde há algumas décadas, esta ser uma área em franco progresso científico, a verdade é que a primeira prótese conhecida, e que apresentava sinais de uso quotidiano, é a de um dedo do pé encontrado numa múmia com mais de 2600 anos de idade.

O sucesso da utilização de biomateriais como implantes ou próteses depende essencialmente de três fatores: i) as propriedades do material, incluindo a sua capacidade de provocar a resposta adequada no hospedeiro; ii) o estado geral de saúde do recetor e iii) a perícia técnica do cirurgião. As propriedades/características destes biomateriais devem ser otimizadas para que desempenhem a função pretendida de um modo seguro, reproduzível, económico e para que sejam fisiologicamente aceites pelo organismo recetor. Esta será, talvez, a principal razão pela qual, apesar dos inúmeros e sucessivos avanços, as soluções encontradas não serem totalmente eficazes, apesar de ser cada vez mais frequente o uso de dispositivos biomédicos implantáveis para a melhoria da qualidade de vida. Com efeito, e apenas para dar alguns exemplos, ainda não há um dispositivo que permita restabelecer na totalidade a visão em pessoas invisuais ou um coração artificial fiável. Não obstante, as soluções desenvolvidas têm permitido prolongar por algum tempo (que pode ir de semanas a várias dezenas de anos) o tempo de vida do paciente, com a manutenção, na grande maioria dos casos, de uma independência e qualidade de vida aceitáveis.

## Introdução

Apesar de a engenharia genética e a cultura de tecidos serem abordagens promissoras para a regeneração de tecidos e órgãos do corpo humano, estas áreas estão ainda no início do seu desenvolvimento e longe de uma aplicação sistemática e fiável para a maioria da população. Assim, ainda é legítimo pensar em desenvolver/modificar materiais para poderem ser implantados, de modo a ficarem em íntimo contacto com o tecido humano. Quando a utilização de dispositivos médicos invasivos tem como objetivo específico a implantação no sistema nervoso, os desafios colocados são, evidentemente, incrementados dada a complexidade deste sistema bem como as funções a ele associadas.

Alguns exemplos da utilização de materiais em neurociências incluem os de monitorização da pressão intracraniana, os utilizados na regeneração de tecido nervoso periférico, os que permitem a avaliação *in vivo* da biomecânica da região da medula espinal, os desenhados como sistemas de libertação controlada de fármacos e os microeléctrodos para o sistema nervoso. Neste último caso os dispositivos poderão ser utilizados para aumentar ou diminuir uma determinada função neurológica. Um dos exemplos mais vezes descrito na literatura é a utilização de implantes para diminuir, ou mesmo anular, os indesejáveis movimentos espontâneos que caracterizam a doença de Parkinson.

Um dos grandes problemas existentes nesta área de Biomedicina reside na falta de compatibilidade dos materiais utilizados com o sistema biológico. Com efeito, os materiais mais utilizados em implantes no sistema nervoso são o silício, o tungsténio, o ouro, o irídio e em alguns casos o aço inoxidável. Como material isolante que rodeia todo o implante, à exceção do local de entrega do estímulo, os materiais poliméricos são os preferidos, apesar de atualmente a investigação se direccionar para os óxidos de metais, tais como o óxido de irídio. O problema de corrosão associado à sua implantação no meio biológico tem vindo a ser contornado pela modificação da sua superfície com materiais tão distintos como biomoléculas, polímeros condutores, filmes de ligas metálicas ou géis à base de silicone. Acresce o facto de apesar de testes efetuados de acordo com as normas ISO 10993 terem assegurado a não citotoxicidade dos materiais anteriormente referidos, os resultados de experiências *in vitro* e *in vivo* mostram uma realidade bem distinta. Com efeito, os estudos efetuados ao longo das últimas três décadas demonstraram que o encapsulamento do material implantado ocorre devido à complexidade do tecido nervoso que contém vários tipos de células, incluindo os astrócitos, cuja reatividade varia no espaço e ao longo do tempo.



Atualmente acredita-se que o mecanismo de instabilidade e degradação dos materiais implantados no tecido nervoso se deve ao seu encapsulamento por astrócitos e outras células da glia, formando a designada cicatriz glial, que isolam o implante dos neurónios vizinhos, aumentando a distância entre neurónios adjacentes. Na outra ponta do espectro que constitui a complexa questão da biocompatibilidade destes materiais implantados está a possibilidade de ocorrer uma proliferação ou recrutamento anormal de células. Tal facto, *per si*, não apresenta problemas fisiológicos imediatos, nem compromete o desempenho do sistema de avaliação. No entanto, a médio-longo prazo pode ocorrer um problema mais grave como o da não vascularização desta zona que se apresenta mais densa. Com efeito, o facto das trocas gasosas e de nutrientes não poderem ocorrer de um modo considerado normal leva à necrose do novo tecido formado e ao aparecimento de uma zona de morte celular que rodeia o material, eliminando a sua utilização, tal como no caso da cicatriz glial.

Em conclusão, continua a existir a necessidade de “apresentar” ao complexo e diversificado tecido nervoso central novas superfícies de materiais implantáveis que possam simultaneamente minimizar a adesão e a ativação dos astrócitos e das células da microglia, e manter a densidade de neurónios. Uma das abordagens mais promissoras, do ponto de vista de ciência e engenharia dos materiais, baseia-se na utilização de materiais nanoestruturados. Estes, ao serem condicionados a uma escala nanométrica, permitem obter um conjunto de propriedades, por vezes aparentemente antagónicas, globalmente promissoras para o desenvolvimento de superfícies com um desempenho biológico aceitável ou, como são vulgarmente designadas, biocompatíveis.

O principal objetivo do presente trabalho é o de modificar a superfície de silício (Si) com um material que possa simultaneamente servir de isolante e com compatibilidade celular incrementada face ao Si. O material selecionado para fazer a modificação foi o óxido de silício (SiO<sub>2</sub>) pois apresenta uma compatibilidade química com o material base que permite antever uma boa adesão e evitar os problemas associados à criação de interfaces. Assim, foram depositados, por pulverização catódica, filmes finos híbridos cerâmico/metal em que os metais utilizados foram o ouro, a prata e o cobre, criando os sistemas designados por SiAu, SiAg e SiCu. O estudo incidiu também no desenvolvimento de filmes finos do material cerâmico dopado com dois dos metais e as respetivas superfícies foram designadas por SiAgAu, SiAgCu e SiCuAu. Estes sistemas foram concebidos com o intuito da libertação de um dos metais que é descrito como possuindo propriedades antimicrobianas, caso de Ag e Cu, de modo a prevenir as infeções

## *Introdução*

nosocomiais. A técnica selecionada foi a pulverização catódica pois permite a modificação de matrizes de elétrodos, após a sua fabricação, de um modo uniforme no que concerne a composição e espessura do revestimento.

Esta tese está organizada em 3 capítulos:

No primeiro capítulo são abordados o sistema nervoso, os implantes utilizados neste tecido biológico, a resposta biológica à inserção destes materiais, alguns dos principais microrganismos associados a infecções nosocomiais e o trabalho efetuado por outros autores na modificação da superfície destes implantes.

Os materiais e os procedimentos experimentais adotados no decurso do trabalho constituem o segundo capítulo. O resumo das considerações teóricas de algumas das técnicas experimentais utilizadas encontra-se em anexo; o anexo 1 corresponde à técnica utilizada na modificação das superfícies; o anexo 2 aos fundamentos das técnicas de caracterização de materiais e o anexo 3 à composição química das soluções utilizadas, sobretudo nos testes antimicrobianos e nos testes *in vitro*.

A apresentação e a discussão dos resultados experimentais foram compiladas no capítulo 3 que se inicia pela caracterização dos filmes finos depositados e termina nos testes bióticos com bactérias e células eucarióticas.

As principais conclusões decorrentes do estudo realizado e algumas sugestões para a continuação do trabalho iniciado nesta tese são apresentadas antes da listagem da bibliografia consultada.

## *Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica*

Ao longo deste capítulo será introduzida a problemática abordada, o sistema nervoso, os implantes utilizados neste tecido biológico, a resposta biológica à inserção destes materiais, alguns dos principais microrganismos associados a infecções nosocomiais e o trabalho efetuado por outros autores na modificação da superfície destes implantes.

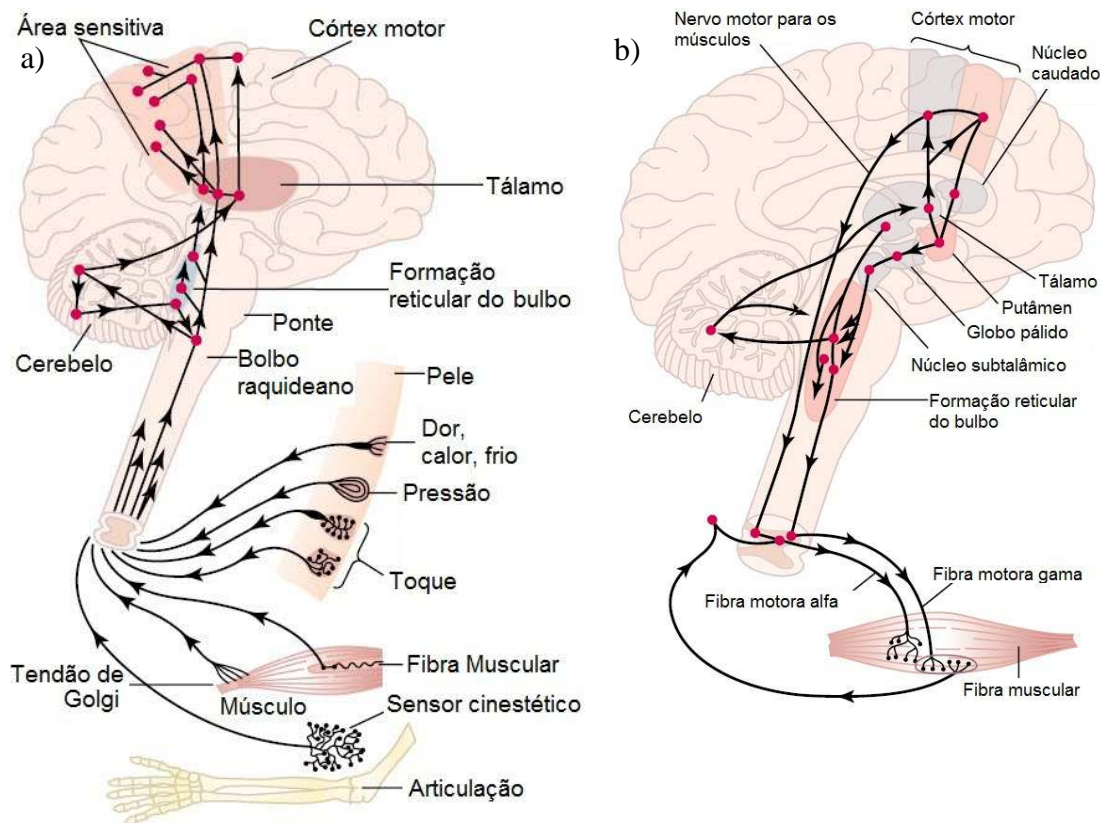
## *Capítulo 1*

## ***1.1 Sistema Nervoso***

O sistema nervoso é dotado de uma complexidade sem igual no corpo humano uma vez que recebe informação de todos os órgãos e, depois de os integrar e analisar, inicia uma resposta adequada do organismo. Acresce que o sistema nervoso age não só como regulador da homeostasia interna, mas também como intérprete dos estímulos exteriores<sup>[1]</sup>. Esta complexidade de funções é desempenhada pelo sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP) (Fig. 1.1). O sistema nervoso central inclui o cérebro, cerebelo e a medula espinal, enquanto o sistema nervoso periférico contém as células e fibras nervosas que servem de ponte de ligação entre os diversos órgãos e o sistema nervoso central. O SNP tem como função principal a comunicação dos diversos órgãos e dos membros superiores e inferiores com o SNC; inclui os neurónios sensoriais, responsáveis por conduzir a informação desde a periferia até ao SNC, neurónios motores, responsáveis pelo movimento voluntário, o sistema nervoso simpático e parassimpático, responsáveis pelo equilíbrio interno de órgãos e glândulas, e o sistema nervoso entérico, responsável pela regulação do sistema gastrointestinal<sup>[2]</sup>.

No SNC, e especificamente no cérebro, para além dos neurónios, existem diferentes tipos de células da glia. A presença de uma rede vascular interna permite o fornecimento dos componentes necessários à manutenção de uma intensa atividade metabólica<sup>[1]</sup>. Os neurónios são os principais responsáveis pela transmissão e interpretação da informação que chega ao sistema nervoso central. Estas células estão em contacto entre si e comunicam através de sinapses que podem ser químicas ou elétricas, consoante envolvam, respetivamente, a libertação de neurotransmissores ou a propagação direta de sinais elétricos de uma célula para outra<sup>[1]</sup>.

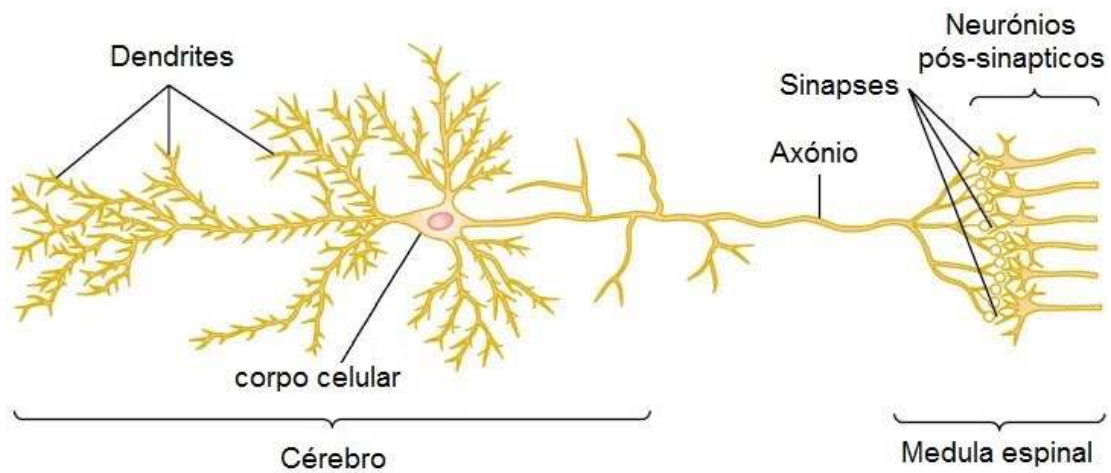
## Capítulo 1



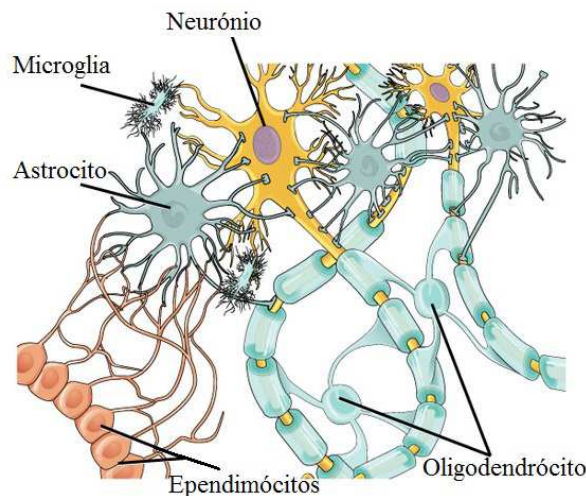
**Figura 1.1** - Esquema geral do sistema nervoso com destaque para: a) o eixo somatossensorial e b) o eixo motor [adaptado de 1].

Durante muito tempo os neurónios (Fig. 1.2) foram o foco da investigação das células do cérebro, sendo-lhes atribuído o papel mais importante no desempenho da função cerebral. Contudo, atualmente, é sabido que as células da glia são igualmente importantes sob o ponto de vista funcional<sup>[3]</sup>, desempenhando um papel fundamental na manutenção dos neurónios. Ao contrário dos neurónios diferenciados que nunca se dividem, as células da glia podem proliferar em condições específicas, sobretudo em resposta a situações que possam perturbar o equilíbrio interno<sup>[3]</sup>. As células da microglia, com características semelhantes aos macrófagos, são especializadas em fagocitar elementos estranhos, e constituem o sistema imunitário específico do cérebro e da medula espinal. As células que constituem a macroglia são fisiologicamente distintas e têm diferentes funções: os astrócitos localizam-se entre os neurónios e os vasos sanguíneos, assegurando um equilíbrio químico na área circundante aos neurónios; os oligodendrócitos e as células de Schwann constituem a bainha de mielina no SNC e SNP, respetivamente. As bainhas de mielina isolam eletricamente os axónios, permitindo uma rápida propagação do impulso nervoso. No SNC as células do plexo coróide são responsáveis pela produção

do líquido cefalorraquidiano<sup>[3,4]</sup>. As células designadas por endimócitos tem características semelhantes aos astrócitos, sem no entanto pertencer à sua família de células, e têm como função efetuar uma barreira entre o cérebro e o líquido cefalorraquidiano. Estas células tem também a função de remoção de toxinas originárias do metabolismo e trocas de espécies químicas entre o cérebro e o líquido cefalorraquidiano, funções que não são as dos astrócitos<sup>[3]</sup> (Fig. 1.3).



**Figura 1.2** – Estrutura de um neurónio multipolar <sup>[adaptado de 1]</sup>.



**Figura 1.3** – Células constituintes do SNC <sup>[adaptado de 5]</sup>.

## Capítulo 1

A comunicação do cérebro com o resto do organismo é efetuada por nervos, constituídos por aglomerados de axónios dos neurónios. Estes prolongamentos estão isolados eletricamente pela bainha de mielina e são designados por aferentes, quando levam a informação para o cérebro, por eferentes, quando trazem o sinal do cérebro para os órgãos, ou mistos, quando realizam ambas as funções.

### ***1.2 Dispositivos invasivos neurais***

Em 1771 Luigi Aloiso Galvani constatou que os músculos da perna de uma rã morta sofriam contração quando era efetuada uma descarga elétrica nos nervos. Esta observação constituiu a base para Alessandro Volta desenvolver a primeira pilha em 1800<sup>[6]</sup>. Contudo, apesar de algumas experiências em animais, apenas em 1874, com a experiência controversa efetuada por Roberts Bartholow em Mary Rafferty, foi demonstrada a excitabilidade do córtex cerebral por estimulação elétrica direta<sup>[7]</sup>. Deste modo ficou aberta a porta para a investigação e o desenvolvimento de dispositivos invasivos que pudessem estimular e registar a atividade das células do sistema nervoso central.

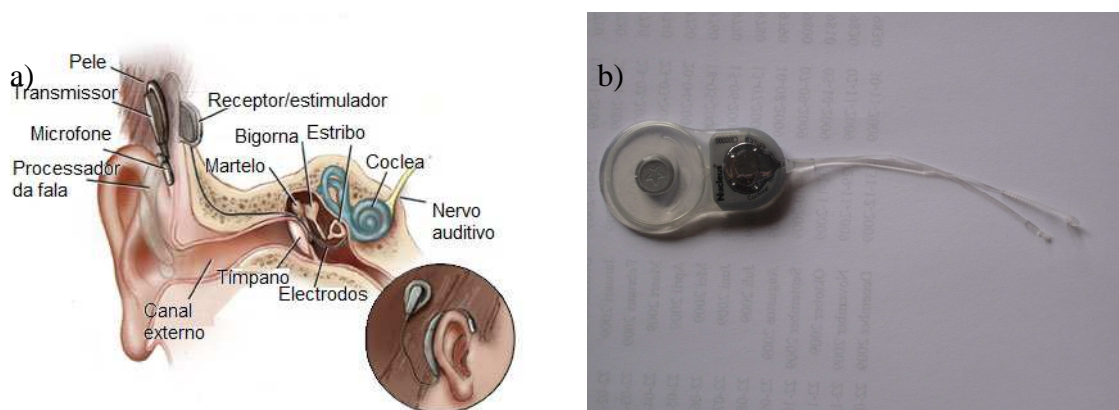
#### ***1.2.1 Implantes nervosos***

Entre os anos 1950 e 1960 foram efetuadas as primeiras experiências com a estimulação do nervo auditivo. O primeiro implante coclear foi desenvolvido em 1961, por Williams F. House, onde o sinal do som não processado era transmitido ao nervo auditivo através de um eléctrodo de platina revestido com Poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) com cinco contactos, implantado diretamente no nervo<sup>[8,9]</sup>. No entanto, como todos os contactos forneciam o mesmo sinal, o implante não permitia ao seu recetor entender o que lhe era dito, e apenas auxiliava a leitura de lábios dado tornar perceptível o ritmo do discurso.

Anos mais tarde, em 1964, foi descoberto que, dependendo da zona em que era estimulado no nervo auditivo, era possível distinguir os sons agudos dos graves, o que permitiu o desenvolvimento e a evolução do implante coclear<sup>[9]</sup>. Este é formado pelos componentes externos, que englobam 1 ou 2 microfones, por um microprocessador, para



tratar o som, e um transmissor; os componentes internos incluem um recetor, um estimulador e um conjunto de eléctrodos (até 22 unidades) que são implantados diretamente no nervo auditivo (Fig. 1.4)<sup>[9,10]</sup>.



**Figura 1.4** - a) Esquema dos constituintes do implante coclear<sup>[adaptado de 10]</sup>; b) parte interna de um implante coclear<sup>[adaptado de 11]</sup>.

O desenvolvimento dos implantes cocleares, coadjuvados por terapia auditiva, tornou possível entender o discurso falado, apesar de não ser eficaz quando existe muito ruído ambiente ou muitas pessoas a falar em simultâneo. Contudo, a sua eficácia depende realmente de quão cedo são implantados, dado que a falta de estímulo no tecido nervoso leva à sua degeneração e atrofia, o que diminui a capacidade do cérebro para processar e interpretar o sinal<sup>[12, 13]</sup>.

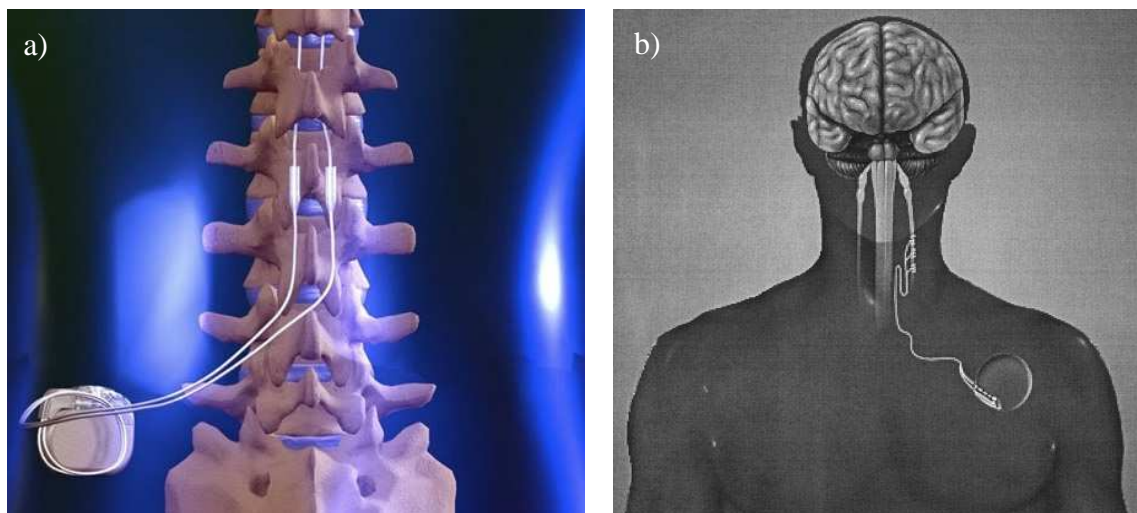
O princípio de funcionamento do implante coclear também foi aplicado na tentativa de restaurar a visão a invisuais, cujo nervo ótico não se encontra lesionado, através do designado olho biónico<sup>[14]</sup>. Contudo, o seu desempenho está limitado fundamentalmente devido à dificuldade na entrega da informação ao nervo ótico, ou seja, na conversão do sinal enviado pelo sensor num estímulo capaz de ser interpretado pelo nervo. Apenas recentemente, com recurso a um implante com 1500 eléctrodos, foi possível ao paciente distinguir contornos difusos<sup>[15]</sup>. De facto, a quantidade de informação contida no som é muito inferior à presente numa imagem, e o método de fornecer esses dados é o grande alvo da investigação nestes dispositivos, não só ao nível do número, formato e

## Capítulo 1

dimensão dos elétrodos a implantar, mas também ao nível da transformação dos dados na interface entre o sensor e o nervo<sup>[16]</sup>.

No que concerne a utilização de elétrodos para a estimulação da medula espinal há fundamentalmente 2 casos a considerar: o que tem como objetivo recuperar o movimento dos músculos devido a lesão na medula espinal e o que pretende tratar a dor crónica<sup>[17-19]</sup>. Em casos de acidentes, tumores, ou mesmo malformações congénitas, a medula espinal pode ficar seccionada, com a concomitante perda de reatividade dos axónios. Em alguns casos, é possível suturar as duas extremidades e recuperar o seu funcionamento após fisioterapia. Nos casos em que tal não é possível é necessário a utilização de elétrodos para servirem de ponte de comunicação<sup>[17,18]</sup>.

Os estimuladores da medula espinal são utilizados desde o início dos anos 80 para casos de dor crónica. Ao implantar os elétrodos em zonas específicas, normalmente antes da zona de inserção responsável pela dor, é possível tornar essa dor tolerável sem a necessidade de quaisquer fármacos, através da regulação da intensidade<sup>[1]</sup> e frequência da corrente (Fig. 1.5). Apesar destes dispositivos terem demonstrado a sua eficácia a longo prazo, a medula espinal é uma zona vulnerável, havendo o risco de ocorrerem lesões mais graves durante e após a intervenção cirúrgica<sup>[19]</sup>.



**Figura 1.5** – Representação esquemática de um estimulador da medula espinal (a) e de um estimulador do nervo vago (b) <sup>[adaptado de 20]</sup>.

O nervo vago ou pneumogástrico é um dos responsáveis pela comunicação do cérebro com os órgãos internos tais como o coração, os pulmões, o estômago ou o fígado. Este tipo de ligação é designado como não consciente e destina-se a manter a necessária homeostasia interna<sup>[21,22]</sup>. Em 1997 foram aprovados os primeiros implantes neste nervo para minimizar a frequência de ataques epiléticos<sup>[23,24]</sup> e estudos mais recentes têm confirmado a sua eficácia em pacientes com depressão resistente à terapia por fármacos<sup>[25,26]</sup>.

Apesar do desenvolvimento dos dispositivos médicos nos últimos anos, tanto a nível dos elétrodos como dos sensores e eletrónica associada, por vezes não é suficiente estimular apenas os nervos. Com efeito, nos casos em que ocorre degenerescência ou lesão do tecido nervoso, a única alternativa é aplicar o estímulo diretamente no cérebro.

### 1.2.2 Implantes cerebrais

Algumas situações clínicas exigem a estimulação direta no cérebro com conjuntos de elétrodos denominados dispositivos neuroprotéticos. Quando, por exemplo, o nervo auditivo está danificado, e impossibilita a utilização do implante coclear, é possível recorrer ao implante auditivo no tronco cerebral. O princípio de funcionamento é em tudo semelhante ao do implante coclear, diferindo apenas no local de implantação<sup>[27,28]</sup>. Apesar de permitir ter a noção da existência ou ausência de sons, este tipo de implante não permite a receção nem o desenvolvimento de um discurso falado, sobretudo devido à dificuldade de o estímulo enviado pelos elétrodos ser interpretado pelo cérebro de modo a criar a perceção do som<sup>[29,30]</sup>. A mesma abordagem foi experimentada na estimulação direta do nervo ótico para patologias associadas à visão, mas, também neste caso, o paciente apenas conseguiu distinguir entre a presença ou ausência de luz em algumas zonas do campo visual<sup>[31]</sup>.

Os dispositivos neuroprotéticos podem ainda ser utilizados na recuperação da mobilidade, tanto em pacientes com o síndrome de “*locked in*”, como nos casos de degeneração da bainha de mielina e em seccionamento da medula espinal<sup>[32,33]</sup>. As experiências realizadas incluíram a leitura do estímulo diretamente no córtex cerebral ou externamente através da utilização de elétrodos, sob a forma de um capacete. Apesar da utilização destes últimos apresentar vantagens, tais como, a redução do risco de

## Capítulo 1

complicações associadas à cirurgia, a intensidade do sinal do ruído é muito difícil de eliminar. Contudo, ambos os sistemas são promissores, apesar da grande dificuldade ser, mais uma vez, a interpretação do sinal e a sua conversão no movimento desejado.

A Estimulação Cerebral Profunda (ECP) consiste na implantação de um *pacemaker* cerebral, um dispositivo que envia impulsos elétricos a zonas específicas do cérebro (Fig.1.6). Esta técnica terapêutica é considerada de rotina em algumas doenças que afetam o movimento, como é o caso da doença de Parkinson, apesar de não ser ainda conhecido o mecanismo de ação. Os resultados experimentais demonstram que a estimulação com frequências elevadas em pontos específicos, e consoante o paciente, permite minimizar os sintomas. O mesmo efeito foi observado em pacientes com dor crónica, sendo que neste caso a estimulação potencia um efeito analgésico<sup>[34-36]</sup>.



**Figura 1.6** – Representação esquemática do implante do eletrodo e *pacemaker* em estimulação cerebral profunda<sup>[adaptado de 37]</sup>.

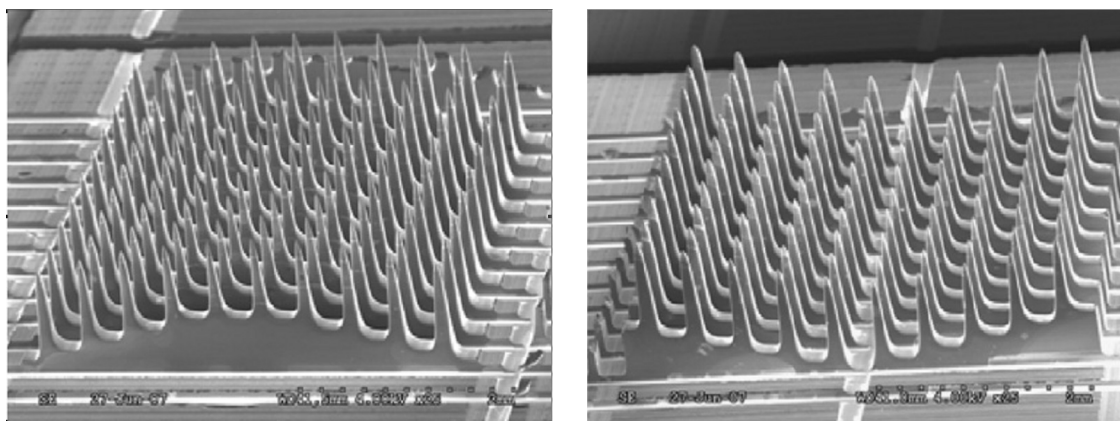
A epilepsia é a segunda doença neurológica crónica mais frequente, com cerca de 50 milhões de pessoas diagnosticadas no mundo inteiro. É caracterizada pela propensão para uma excitabilidade excessiva e descontrolada das redes neuronais, em pequenos focos ou na totalidade do sistema nervoso. Apesar de haver um grande desenvolvimento ao nível de fármacos para evitar os ataques epiléticos, com cada vez menos efeitos secundários, cerca de 1/3 dos pacientes torna-se resistente à farmacoterapia. Nestes casos, a estimulação cerebral profunda permite uma estabilização dos ataques, ao diminuir a sua frequência<sup>[38,39]</sup>.

No caso de depressões graves refractárias, resistentes a fármacos, ou da síndrome obsessiva-compulsiva, a estimulação cerebral profunda também permite a diminuição dos sintomas. No entanto, a sua eficácia real ainda não foi inequivocamente demonstrada, e a localização da inserção dos eléctrodos, bem como a frequência do estímulo, ainda não estão terapeuticamente definidos<sup>[39,40]</sup>.

Apesar do grande número de aplicações já disponíveis, e com indicação terapêutica, ainda está a ser estudada qual a eficácia da estimulação cerebral profunda noutras situações clínicas tais como a cefaleia, a doença de Huntington ou a doença de Alzheimer. Neste último caso, foram descritos estudos clínicos, em fase I, onde a estimulação cerebral profunda da zona do fórnix/hipocampo parece induzir a recuperação dos circuitos de memória afetados pela doença de Alzheimer<sup>[41]</sup>.

### 1.2.3 Materiais utilizados em eléctrodos

Os tradicionais eléctrodos constituídos por um único fio metálico não são eficazes para monitorizar a atividade de redes neuronais ao longo do tempo. Para este efeito foram desenvolvidas matrizes de fios metálicos ou de sistemas de silício micromaquinados capazes de atuar numa área maior. O advento da tecnologia de microfabricação de silício permitiu que a produção deste tipo de componentes, muitas vezes de geometrias complexas, fosse simplificada (Fig. 1.7).



**Figura 1.7** - Algumas geometrias de eléctrodos de silício: a) concava, b) convexa <sup>[adaptado de 42]</sup>.

Os materiais mais utilizados para o fabrico de matrizes de fios metálicos são a platina, o ouro, o tungsténio, o irídio ou o aço inoxidável<sup>[4]</sup>. A matriz é normalmente constituída por várias filas com 8 ou mais fios (50 – 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 5 a 8 mm de comprimento) espaçados entre si entre 200 a 300  $\mu\text{m}$ , montados num bloco de poli(metil metacrilato) ou outro polímero semelhante. A principal vantagem da utilização deste tipo de eléctrodos, em relação aos de silício, era a simplicidade da sua fabricação, antes do evento da microfabricação do silício. A principal desvantagem é a deformação sofrida no arranjo tridimensional dos eléctrodos durante a inserção da matriz devido à não uniformidade que o tecido cerebral oferece na resistência à inserção dos eléctrodos. Com efeito, esta etapa da intervenção cirurgica deve ser efectuada a uma velocidade lenta (100  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ ), normalmente com recurso a um micromanipulador, para reduzir a compressão do córtex cerebral. A implantação destes eléctrodos é finalizada com uma cementação de todo o sistema<sup>[43]</sup>.

Uma das consequências da miniaturização do “*hardware*” informático foi o desenvolvimento da microfabricação do silício que, atualmente, permite um controlo excepcional no tamanho, forma e espaçamento dos eléctrodos. Este tipo de dispositivo apresenta como principais vantagens o registo de maiores volumes de tecido neuronal, com melhoria da resolução espacial<sup>[44,45]</sup>. Quando comparados com os eléctrodos metálicos permitem um número maior de locais de registo para um volume menor de inserção e consequentemente, de trauma<sup>[46]</sup>.

Independentemente do tipo de material utilizado no fabrico de eléctrodos, estes são revestidos com um material isolante para que o estímulo e registo ocorram apenas na zona desejada. Este revestimento é normalmente de material polimérico, como é o caso do poli(p-xileno), do PTFE e de diversas poliimidas. Alguns destes materiais apresentam vários tipos de problemas, incluindo a fraca adesão ao eléctrodo, a baixa estabilidade química em testes de imersão em solução salina e a formação de fissuras<sup>[47,48]</sup>. Por estes motivos, a necessidade de desenvolver um revestimento com propriedades isolantes para os eléctrodos que seja, simultaneamente, biocompatível com o tecido nervoso, insolúvel e com a espessura apropriada para que possa revestir as matrizes de eléctrodos de forma eficiente e eficaz após a sua fabricação, implica que a investigação nesta área se encontre em expansão.

### ***1.3 Problemas associados aos dispositivos invasivos neurais***

#### ***1.3.1 Reação biológica à inserção de elétrodos***

A resposta biológica à inserção de elétrodos para estimulação cerebral profunda pode ser caracterizada em duas fases, nomeadamente as designadas por resposta aguda e resposta crónica. A resposta aguda pode durar até 7 dias após a inserção e a resposta crónica tem o seu início 2 a 4 semanas depois do procedimento cirúrgico e continua por vezes durante anos, até que o elétrodo se torne completamente não funcional<sup>[49]</sup>. A resposta imunológica inata do sistema nervoso central à inserção de elétrodos é designada por gliose.

A resposta imediata ou aguda é iniciada pela inserção dos elétrodos que produz a rutura da barreira hemato-encefálica (BBB<sup>1</sup>)<sup>[50]</sup> e da neurovasculatura<sup>[49]</sup>, matando células neuronais e da glia<sup>[51]</sup>. Como resultado deste trauma mecânico inicial pode ocorrer um aumento do volume do tecido cerebral<sup>[52,53]</sup> e o afastamento dos neurónios da superfície do elétrodo<sup>[54]</sup>, com a concomitante ativação das cascatas moleculares responsáveis por uma resposta que induz a cicatrização do tecido<sup>[55]</sup>. Uma vez que ocorre morte celular, a presença de tecido necrótico leva à ativação das células da microglia, que podem ser consideradas os macrófagos do cérebro. Algumas das células da microglia ligam-se à superfície do elétrodo por um processo que é mediado pela presença de componentes do soro resultante do processo mecânico de inserção do elétrodo<sup>[56]</sup>. Este processo foi observado, *in vivo*, apenas algumas horas após o procedimento cirúrgico<sup>[55]</sup>. As células da microglia iniciam o processo de fagocitose dos detritos celulares e tentam degradar o resto do implante<sup>[57,58]</sup>. Após o processo de fagocitose o excesso de fluídos segregados devido ao edema local é reabsorvido no espaço de 6 a 8 dias<sup>[59]</sup>.

Nos casos em que a resposta aguda subsiste a resposta crónica é desencadeada devido à presença persistente de material estranho e insolúvel<sup>[60,61,51]</sup>. Esta reação consiste numa complexa cascata de eventos caracterizados pela presença de células da microglia ativadas e algumas células precursoras neurais ligadas à superfície do implante<sup>[52]</sup>. Na reação crónica, e que persiste durante todo o tempo em que o implante se encontra presente, ocorre a ligação e aglomeração de células da microglia e de células precursoras

---

<sup>1</sup> do inglês Brain Blood Barrier

## Capítulo 1

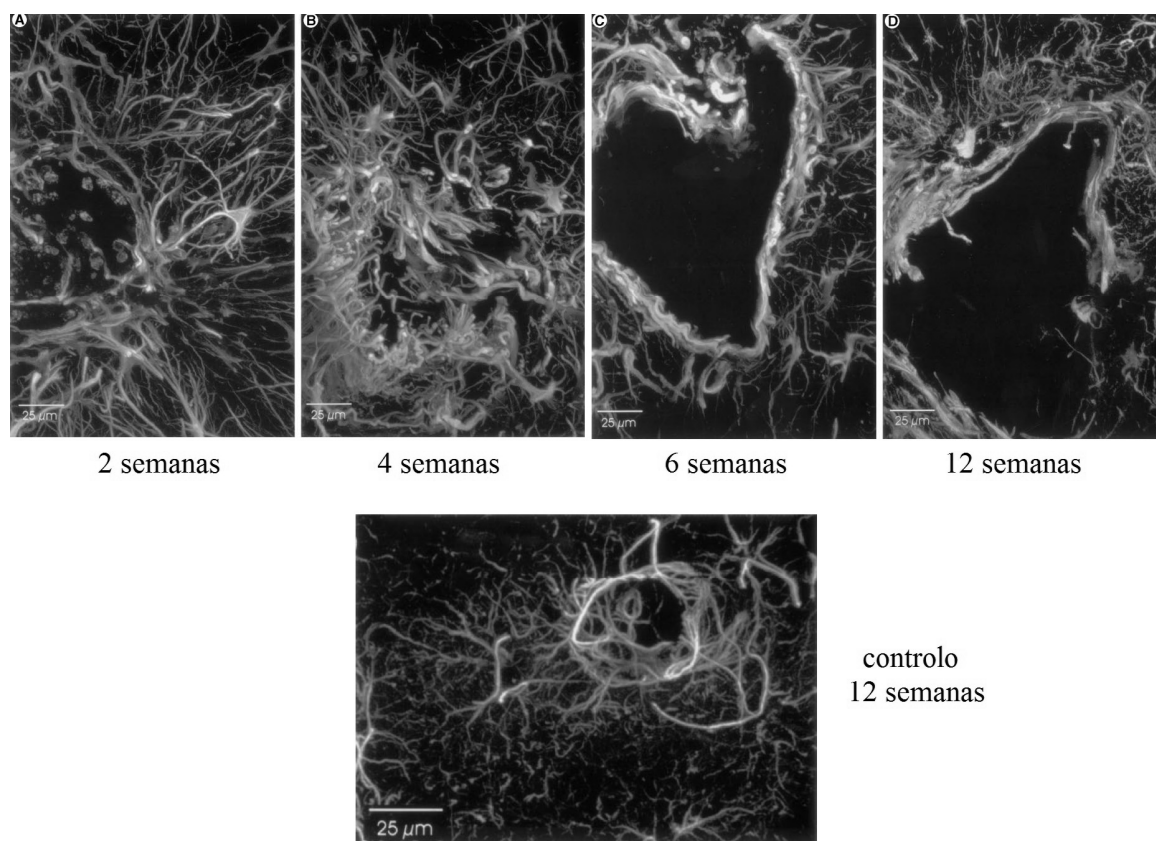
neurais na superfície dos elétrodos<sup>[59,62,63]</sup>. As células da microglia libertam enzimas e produzem espécies reativas de oxigénio<sup>[62,63]</sup> de uma forma semelhante aos macrófagos, os quais são responsáveis pela degradação de componentes estranhos noutras regiões do organismo<sup>[59]</sup>. As células da microglia presentes na região de implantação dos elétrodos estão rodeadas por astrócitos que formam uma bainha isolante<sup>[60,61,64]</sup>. A ativação dos astrócitos é mediada, entre outras ações, pela presença de proteínas do plasma sanguíneo, tais como trombina ou albumina, que se infiltram no tecido cerebral durante o processo mecânico de inserção dos elétrodos<sup>[65]</sup>. Também as células precursoras de oligodendrócitos podem diferenciar-se em astrócitos responsáveis pela encapsulação glial do implante<sup>[66-69]</sup>, uma vez que depois de ativados, os astrócitos proliferam e acabam por formar uma bainha isolante e densa junto ao local de inserção. No final, o resultado é a formação de uma cicatriz, designada por cicatriz glial, cuja estrutura, devido à sua elevada densidade, é considerada inibitória pois tanto mecanica como quimicamente é impenetrável à regeneração dos axónios<sup>[55,70]</sup>. Os estudos efetuados demonstram que a formação da cicatriz glial<sup>[61,71]</sup> juntamente com a ativação da microglia<sup>[54]</sup> são responsáveis pelo afastamento dos neurónios da superfície dos elétrodos, o que resulta no aumento da sua impedância e, conseqüentemente, na perda de sinal durante os registos.

As micrografias da Figura 1.8 mostram a formação da cicatriz glial, *in vivo*, ao longo do tempo<sup>[61]</sup>. Neste estudo, elétrodos de silício foram implantados no córtex cerebral de ratos e removidos ao fim de 2, 4, 6 e 12 semanas. Duas semanas após a implantação dos elétrodos foi possível observar uma região em volta do dispositivo, com cerca de 50-60 µm, caracterizada, em microscopia de fluorescência, pela presença de uma proteína marcadora de astrócitos (GFAP<sup>2</sup>), indicadora da proliferação destas células. A densidade de marcação aumentou ao fim de 4 semanas, à medida que os astrócitos desenvolveram a sua atividade e formaram a cicatriz da glia, ou cicatriz glial, perfeitamente visível ao fim de 6 e 12 semanas.

---

<sup>2</sup> Do inglês *glial fibrillary acidic protein*





**Figura 1.8** – Distribuição de astrócitos no córtex cerebral de rato após implantação de um elétrico de silício. Os astrócitos foram marcados por imunocitoquímica, usando um anticorpo anti-GFAP. As preparações foram observadas por microscopia confocal 2 (A), 4 (B), 6 (C) e 12 (D) semanas após implantação do elétrico. O controle foi efetuado pela inserção e remoção imediata do elétrico <sup>[adaptado de 61]</sup>.

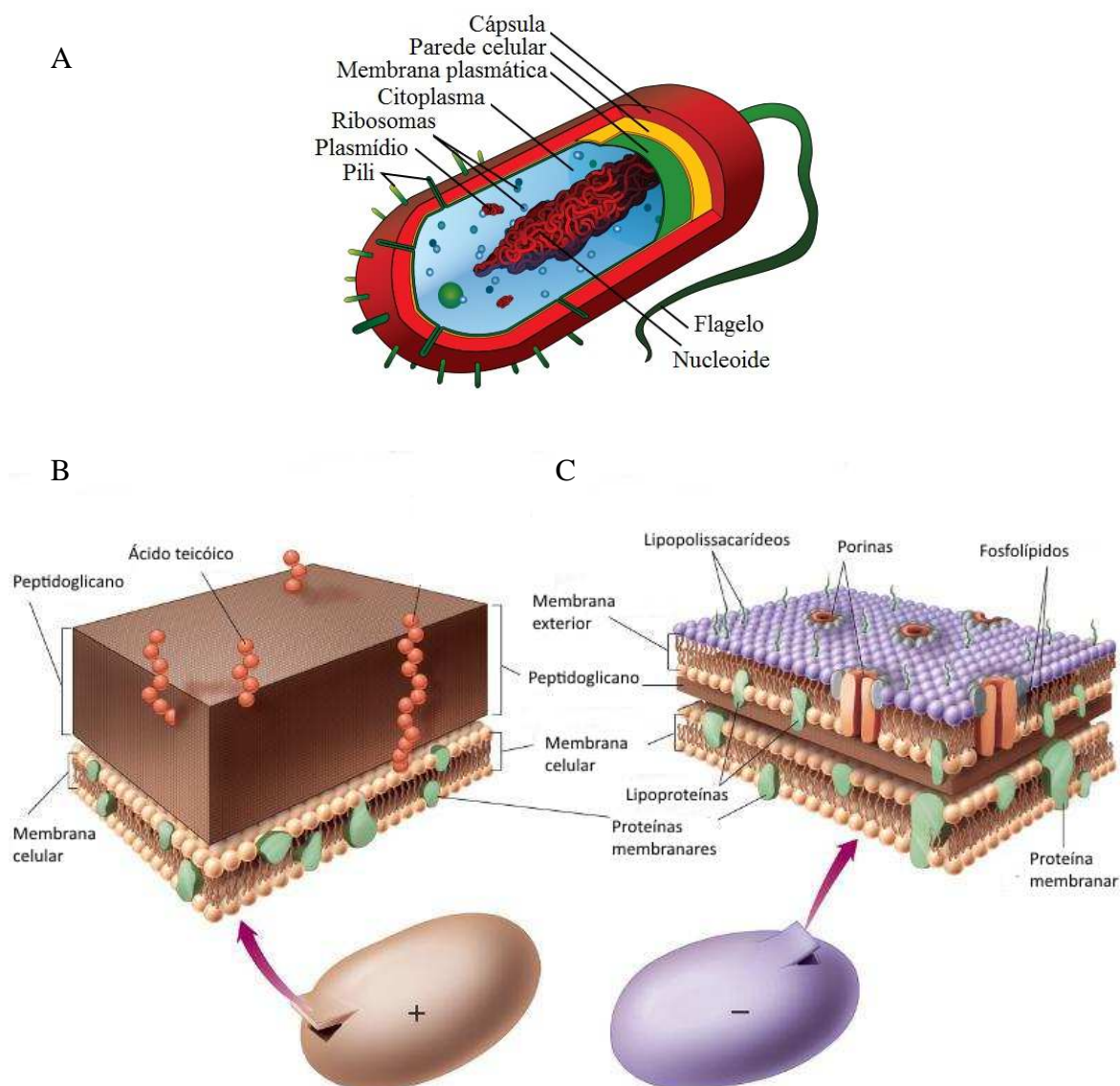
### 1.3.2 Infecções nosocomiais

Qualquer tipo de intervenção cirúrgica, apesar dos cuidados tomados e dos processos de esterilização e higiene, expõe o paciente a riscos acrescidos de infecção que, de acordo com os dados estatísticos, faz com que cerca de 10% dos utentes dos hospitais adquira uma infecção nosocomial. Estas infecções ocorrem devido ao ambiente hospitalar, e são responsáveis por tempos de tratamento mais prolongados e riscos acrescidos para a saúde, resultando em cerca de 40% dos casos em morte<sup>[72-74]</sup>. O Centro de Controlo e Prevenção de Doenças define as infecções nosocomiais em ambiente cirúrgico como “*uma infecção de 30 dias depois de uma operação ou até 1 ano se o implante é deixado no lugar e a infecção está relacionada com um procedimento cirúrgico*”<sup>[75]</sup>.

## Capítulo 1

No caso de intervenções cirúrgicas, tal como referido, o risco é acrescido uma vez que o seccionamento da pele abre uma porta de entrada a infeções oportunistas, que, conjuntamente com um estado debilitado do sistema imunitário, torna micro-organismos comuns em agentes potencialmente letais. Apesar de ser possível eliminar cerca de 1/3 dessas infeções por pequenas alterações das rotinas de higiene, uma outra vertente para a resolução deste problema tem sido o desenvolvimento de biomateriais anti-microbianos. Estes biomateriais fazem parte não só de próteses ou implantes, mas também em dispositivos de libertação controlada de fármacos<sup>[72]</sup>.

Bactérias são microrganismos procarióticos com alguns micrómetros de comprimento e formas diversas, que podem viver de forma simbiótica ou parasítica com plantas e animais. Quando a relação que estabelecem com os outros organismos é parasítica são designados como agentes patogénicos e podem ser responsáveis por danificar diretamente as células do hospedeiro, seja por esgotar alguns dos seus nutrientes, seja pela produção de toxinas. Alguns destes micro-organismos têm uma camada mais exterior (cápsula) frequentemente constituída por polissacarídeos, que é considerada como um fator virulento pois aumenta a sua capacidade patogénica. A sua parede celular é rígida o que lhes confere não só integridade estrutural como também proteção contra as variações de pressão osmótica. A estrutura desta parede irá determinar se é Gram positiva ou Gram negativa. Esta designação é a classificação de acordo com a capacidade de um corante permear a parede celular, resultando numa cor avermelhada da bactéria (Gram positiva). Se tal não acontecer a bactéria é designada de Gram-negativa. Para além da parede celular, ainda têm uma membrana lipídica (membrana plasmática) que atua como barreira para reter nutrientes, proteínas e outros componentes do citoplasma dentro da célula. Há algumas proteínas tubulares (pili) que se projetam para fora da membrana plasmática e que são responsáveis pela conjugação bacteriana, um processo que permite a partilha de código genético, além de auxiliarem na adesão à superfície. O ADN não se encontra delimitado por uma membrana nem está separado do citoplasma, mas está compactado numa estrutura helicoidal, o nucleóide. Estes micro-organismos possuem ainda outros pequenos fragmentos de ADN independentes, designados por plasmídeos. As células podem ainda possuir um flagelo, uma estrutura que permite a locomoção da bactéria<sup>[76]</sup> (Fig. 1.9).

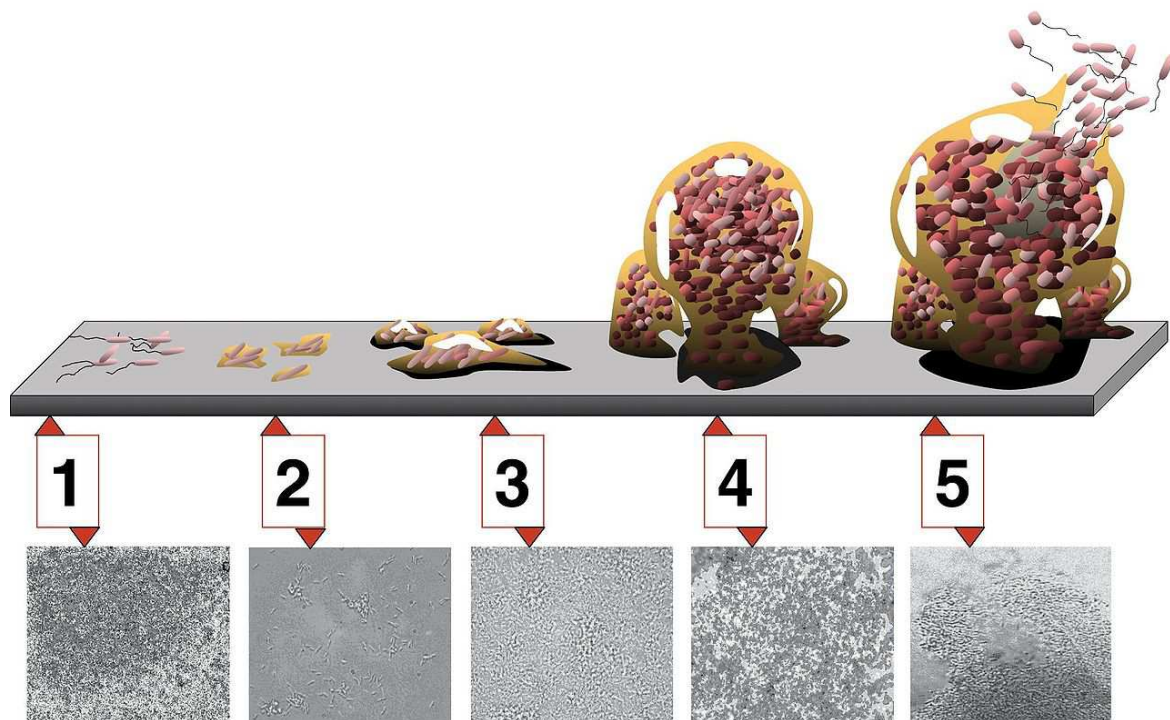


**Figura 1.9** – Representação esquemática de uma bactéria (A) <sup>[adaptado de 77]</sup> e do detalhe da diferença da constituição da parede celular entre uma bactéria Gram positiva (B) e Gram negativa (C) <sup>[adaptado de 78]</sup>.

O início de qualquer infecção ocorre pela adesão bacteriana, posterior colonização e formação de um biofilme. (Fig. 1.10). Quando a infecção atinge o estágio da formação do biofilme o tratamento a adotar é muito complicado e quase nunca eficaz, o que implica, na maioria dos casos, a remoção do implante afetado. Com efeito, a medicina tradicional não tem como atuar no tratamento da infecção e, muitas vezes, a única hipótese é a remoção do implante. De facto, o primeiro passo relacionado com a patogénese da infecção é a adesão bacteriana. Se esta não conseguir aderir a uma superfície, torna-se impossível a colonização. Há múltiplos processos, comuns a várias estirpes ou específicos de uma

## Capítulo 1

estirpe, pelo qual a adesão ocorre. Se a superfície do biomaterial impedir a adesão de bactérias, o risco de infecção é minimizado drasticamente, apesar de não ser um processo fácil de prever, pois depende não só das propriedades/características do material, como também da estirpe bacteriana em causa. No entanto, uma superfície que foi modificada para promover adesão celular quando inserida no corpo humano também poderá ser *per se* favorável à adesão de bactérias [72, 79].



**Figura 1.10** – Representação esquemática do processo de formação do biofilme: 1) adesão inicial; 2) adesão irreversível; 3) e 4) estágios de maturação com a formação de micro e macro colônias; 5) dispersão [adaptado de 80].

Independentemente do material impedir ou não a adesão bacteriana, a superfície do dispositivo pode ser concebida para apresentar propriedades que induzam a morte dos microrganismos patogênicos. Um dos primeiros materiais a ser utilizado com este fim foi a prata, sendo também atribuídas as mesmas propriedades ao cobre e ao zinco [81,82]. Apesar destes metais serem eficazes deixaram de ser usados como materiais maciços para próteses devido ao fraco conjunto de propriedades mecânicas que apresentam para serem utilizados nesta área. O mecanismo pelo qual se atribui a ação antibacteriana do material

maciço consiste na libertação de iões devido à ação do meio fisiológico, conhecido por ser um dos eletrólitos mais agressivos, quando em contacto com o corpo humano. A concentração das espécies iónicas libertadas deve, no entanto, ser rigorosamente controlada pois é necessário que assegurem que não são citotóxicas para as células eucarióticas, nem local nem sistemicamente. Acresce que não são apenas estes materiais metálicos que apresentam estas propriedades, pois alguns polímeros, tais como o quitosano e os seus derivados<sup>[72]</sup>, tem sido estudados para o mesmo fim.

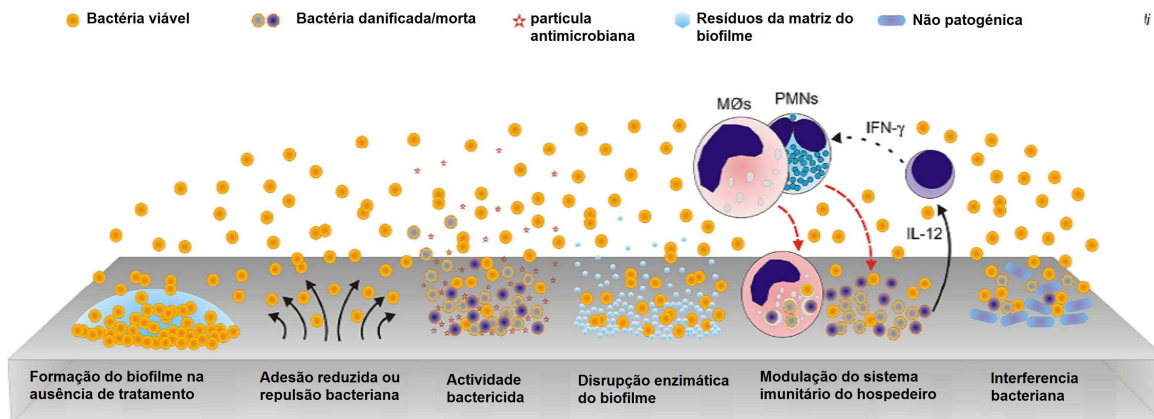
Uma das limitações dos materiais maciços é a de ser difícil conseguir obter simultaneamente as propriedades elétricas ou mecânicas desejadas e ainda permitir o efeito antimicrobiano e o desempenho biológico adequado. Assim, atualmente, muitos dos dispositivos médicos são projetados com o objetivo de que o material maciço tenha as propriedades mecânicas e elétricas necessárias, sem ser citotóxico, e revestir ou modificar a sua superfície para que possa ser aceite pelo organismo. Para tal, recorre-se a um revestimento bioativo, geralmente de base polimérica, que permita simultaneamente a biocompatibilidade e efeito antimicrobiano. Há diversas formas de obter esse efeito, seja pela presença de algum dos metais supracitados ou pela libertação controlada de fármacos específicos<sup>[83,84]</sup>. Outra alternativa à matriz polimérica passa pela utilização de sílica dopada com um metal com as desejadas propriedades antimicrobianas pela libertação controlada do material metálico. Os resultados preliminares *in vitro* da utilização de um sistema sílica/prata foram animadores, pois a libertação da prata para o meio permitiu simultaneamente um efeito antimicrobiano e nanotopografia superficial apropriada para a adesão de células<sup>[85]</sup>.

A nanotecnologia evoluiu muito nos últimos anos e permitiu o desenvolvimento de superfícies nanoestruturadas, que já demonstram alterar a conformação de proteínas e, conseqüentemente, ter um efeito na adesão de bactérias. Acresce o facto de que permite oferecer uma panóplia de novas propriedades/características por não se restringir apenas a efeitos na topografia, mas também na microestrutura. Com efeito, nano-partículas de óxidos metálicos e de materiais baseados em carbono também demonstraram efeitos antimicrobianos<sup>[84,86]</sup>.

Assim, de forma resumida, há várias abordagens para impedir a infeção bacteriana e desenvolvimento do biofilme. Impedir a adesão bacteriana implica impossibilitar a proliferação das bactérias e a conseqüente formação do biofilme. Mas, se a superfície permitir a adesão, é possível induzir uma atividade anti bacteriana através de vários processos pois o material pode libertar fármacos ou espécies letais para as bactérias,

## Capítulo 1

pode interferir com os processos enzimáticos da formação do biofilme, ativar localmente o sistema imunitário de forma a mais rapidamente eliminar as bactérias, ou mesmo induzir a adesão de bactérias inócuas, mas que vão competir e impedir a adesão de bactérias patogênicas (Fig. 1.11)<sup>[72]</sup>.



**Figura 1.11** – Esquema com as principais abordagens através das quais um material pode impedir a infecção bacteriana <sup>[adaptado de 72]</sup>.

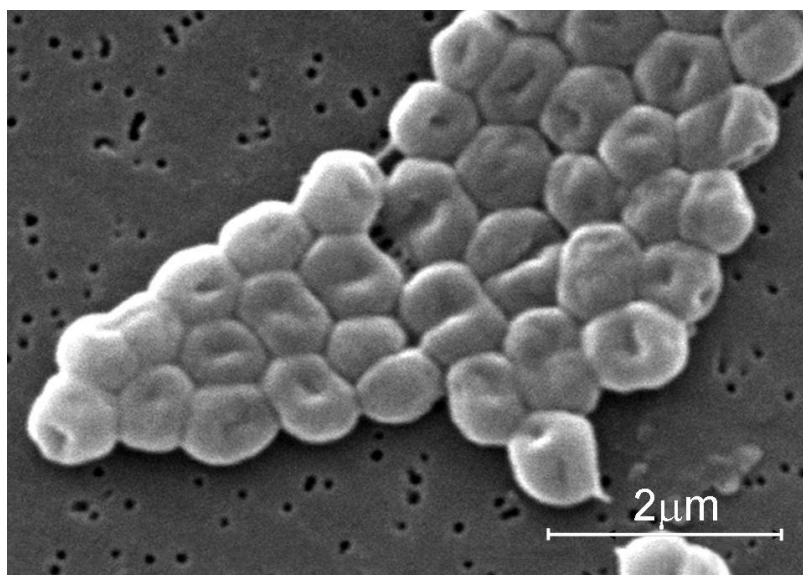
Apesar da investigação se centrar em várias estratégias para minimizar as infeções, há um fator crucial, que é o de identificar qual a estirpe da bactéria que é responsável pela infeção. Não é possível desenvolver uma superfície que minimize a adesão e proliferação de varias estirpes de bactérias e, simultaneamente, seja inócua para as células do corpo humano. Assim, no caso de implantes, o objectivo é que a superfície seja antimicrobiana para as estirpes mais comuns envolvidas em infeções potencialmente perigosas para a saúde do paciente <sup>[79]</sup>.

Estatisticamente, as bactérias *Acinetobacter lwoffii* (*A. lwoffii*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. Aeruginosa*) são as que estão envolvidas na maior percentagem de infeções nosocomiais mais comuns <sup>[87,88]</sup>.

*A. lwoffii* é uma bactéria gram-negativa aeróbica muito comum na flora natural da pele em indivíduos saudáveis. Este microrganismo sobrevive em condições de baixa humidade, até cerca de 10 dias, e é relativamente resistente à esterilização por irradiação. Em indivíduos saudáveis não é patogénica, mas em indivíduos com o sistema imunitário

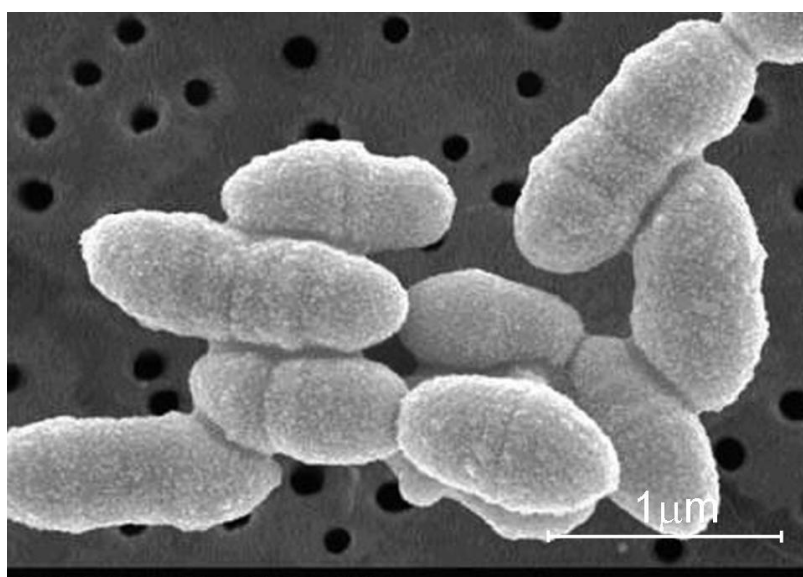


comprometido, que apresentem queimaduras graves, ou sujeitos a uma cirurgia, é considerada patogénica (Fig. 1.12)<sup>[89]</sup>.



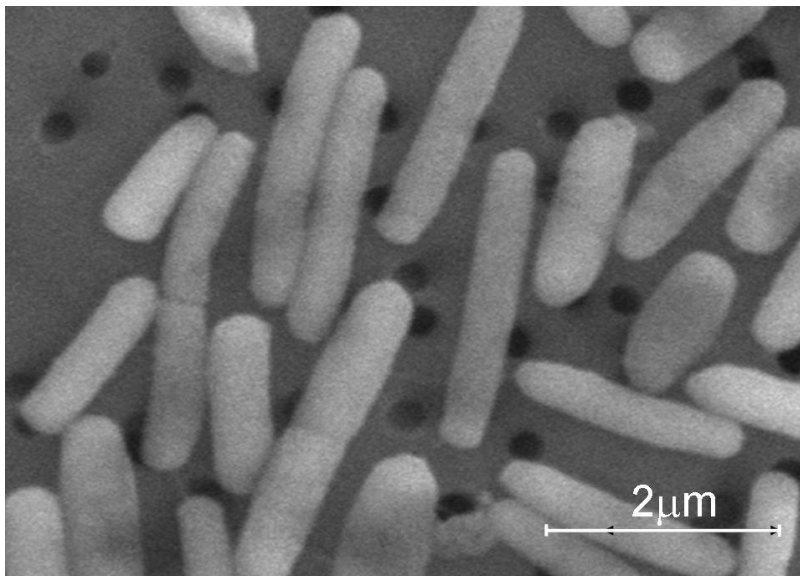
**Figura 1.12** – Micrografia de SEM de *Acinetobacter lwoffii* [adaptado de 90].

*E. faecalis* é uma bactéria gram-positiva anaeróbica facultativa, comensal, e está frequentemente presente no intestino humano e de animais. Adapta-se facilmente às condições presentes e desenvolveu resistência a muitos dos antibióticos utilizados<sup>[91]</sup>. As principais infecções que causa são endocardite e bacteriemia, infecção do trato urinário e meningite, entre outras (Fig. 1.13)<sup>[92]</sup>.



**Figura 1.13** – Micrografia de SEM de *Enterococcus faecalis* [adaptado de 93].

*P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa aeróbica muito comum na pele, e no ambiente, e é naturalmente resistente a muitos antibióticos. Tem a capacidade de rapidamente desenvolver novos mecanismos de resistência, levando a um problema terapêutico acrescido. Apesar disso, quase todos os casos clínicos associados a esta bactéria estão relacionados com indivíduos com o sistema imunitário comprometido, lesões nos tecidos ou queimaduras graves (Fig. 1.14)<sup>[94, 95]</sup>.



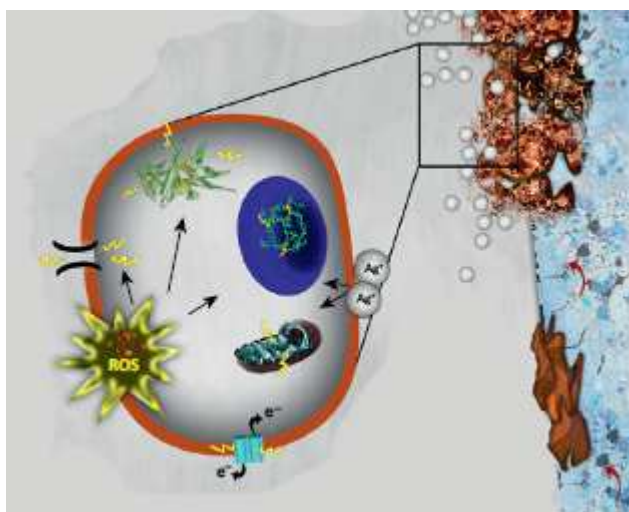
**Figura 1.14** – Micrografia de SEM de *Pseudomonas aeruginosa* [adaptado de 96].

Uma das abordagens que vem sendo efetuada para prevenir/evitar/erradicar as infecções causadas pela colonização e desenvolvimento de biofilmes em implantes biomédicos, permanentes ou não, é a de inserir materiais com propriedades consideradas antimicrobianas de que são exemplo a prata e o cobre. Acresce que estes elementos químicos, sobretudo se de dimensões nanométricas, são referenciados como antimicrobianos, especialmente quando testados contra *E. coli*<sup>[97,98]</sup>.

Há alguma controvérsia sobre qual a causa do efeito antimicrobiano, sobretudo da prata, dado que é o material mais estudado, pois quando na presença das nanopartículas os microrganismos estão também expostos aos iões dos próprios materiais. Aliás, quanto menor a dimensão da partícula em questão maior a facilidade de o processo de ionização ocorrer dado que a área exposta é maior. Os resultados provenientes de diferentes grupos



de investigação evidenciam o facto do mecanismo que confere as desejadas propriedades poderá não ser universal uma vez que também dependerá da estirpe bacteriana e da dimensão das nanopartículas<sup>[97,98]</sup>. Apesar de ainda não estar demonstrado qual a importância relativa do(s) mecanismo(s) que induzem a inibição do desenvolvimento microbiano, os estudos efetuados parecem indicar dois tipos de ação: alteração do potencial da membrana e da atividade da ATP sintetase, o que induz a diminuição do metabolismo, e a inibição da ligação de ribossomas ao RNA mensageiro, o que induz um colapso no processo biológico<sup>[99-100]</sup>. No entanto, estas ações poderão não ser as únicas tal como está patente na figura 1.15 que esquematiza alguns dos mecanismos pelos quais estes elementos químicos, exemplificado para o caso da prata, interagem com as células bacterianas e são, conseqüentemente, potenciais vias para a inibição de vários processos celulares.



**Figura 1.15** – Representação esquemática dos efeitos toxicológicos de nanopartículas em biofilmes bacterianos. A ampliação central ilustra os efeitos irreversíveis das nanopartículas e dos seus íons em várias localizações das bactérias tais como: parede celular, DNA e mitocôndrias <sup>[adaptado de<sup>101</sup>]</sup>.

## ***1.4 Modificação de elétrodos para estimulação do tecido nervoso***

A tentativa de melhorar os resultados da utilização de elétrodos na estimulação cerebral profunda pode ter diferentes abordagens: a que concerne o material e forma dos elétrodos; a que atua ao nível do processamento do sinal e da frequência/intensidade do estímulo elétrico a fornecer e, aquela que constitui o objetivo do presente trabalho, a melhoria da interface entre o elétrodo e o tecido biológico, nomeadamente o seu desempenho biológico, vulgarmente designado por biocompatibilidade.

Nos elétrodos há duas áreas distintas a considerar para que o estímulo elétrico seja entregue de forma pontual: a parte condutora e a parte isolante. A parte condutora exposta é pequena, enquanto a parte isolante terá maior área exposta, mas a biocompatibilidade de ambas é determinante para minimizar/eliminar reações adversas (Fig. 1.16) <sup>[102]</sup>.



**Figura 1.16** – Micrografia de SEM da ponta de um elétrodo metálico, isolado com um revestimento de Paralyne C® com 3µm de espessura <sup>[adaptado de 102]</sup>.

A estratégia de eliminar a resposta adversa pela vertente de modificar a forma dos elétrodos pode não ser a mais adequada, dado que a variação de tamanho, forma e geometria da ponta de elétrodos de silício não produziu diferenças significativas na magnitude da cicatriz da glia<sup>[64]</sup>. No entanto, nem esta abordagem nem a que estuda o

processamento e a intensidade do estímulo são o enfoque deste trabalho, razão pela qual será feita uma revisão sobre os trabalhos desenvolvidos por outros autores na modificação da superfície de eléctrodos, com o objetivo de melhorar a compatibilidade com o tecido neuronal.

Antes de iniciar a abordagem descrita deve ser lembrado que uma das superfícies mais utilizada nos centros de investigação de neurociências para a cultura e teste de células neuronais é a de lamelas de vidro com um revestimento de poli-D-lisina (PDL), apesar de outras matérias, tais como a safira, demonstrarem resultados equiparáveis aos do polipeptídeo <sup>[103]</sup>. No entanto, a PDL apresenta várias desvantagens para poder sequer ser considerada como um revestimento adequado para os eléctrodos, entre as quais pode ser salientada a solubilidade. Com efeito, a modificação com PDL não reticulado não é permanente dado que o polipeptídeo é solúvel em água. Assim, ao longo do tempo, a superfície que está exposta às células neuronais vai sofrendo alterações sendo bastante complicado aferir da influência das propriedades da superfície no desempenho celular para determinado intervalo de tempo. Para melhorar o comportamento *in vitro* das células do sistema nervoso central sobre PDL alguns autores estudaram a ativação do polipeptídeo com luz ultravioleta para produzir um padrão, tendo observado que a adesão dos neurónios era incrementada e ocorria preferencialmente nas zonas ativadas <sup>[104]</sup>.

Uma abordagem que simultaneamente modifica a superfície e a forma é a descrita em alguns estudos, onde a hipótese a testar foi a de utilizar nanotubos de carbono ou nanofios metálicos na extremidade de microeléctrodos utilizados na medição da corrente eléctrica gerada num determinado ponto no cérebro. A principal vantagem foi a de diminuir a área lesada durante a implantação do eléctrodo em zonas profundas, o que não só limitou as reacções adversas como permitiu menor degradação do sinal eléctrico <sup>[105]</sup>.

A abordagem de melhorar a compatibilidade, bem como entrega/recolha de estímulo eléctrico também tem recorrido à utilização de polímeros condutores. Acresce o facto de que estes materiais permitem a hipótese (ainda não confirmada) de que a reacção inflamatória seria mais reduzida, devido ao facto das propriedades mecânicas do material polimérico serem mais próximas das do tecido nervoso o que, em princípio, poderia originar menores tensões na interface tecido/eléctrodo. Acresce que este efeito induz a diminuição da espessura do tecido fibroso não condutor que rodeia o eléctrodo, tecido apontado como um dos responsáveis pela degradação do sinal eléctrico. O poli(3,4-etilenodioxitiofeno), PEDOT, é um dos polímeros estudados e que demonstrou ser não tóxico para os neurónios e que apresenta a característica de a sua reticulação ser ativada

## Capítulo 1

pela passagem de corrente elétrica <sup>[106]</sup>. Neste estudo o polímero foi também utilizado como revestimento híbrido pela utilização simultânea de células. Contudo, apesar de ser um conceito interessante para garantir um contacto mais estável entre neurónios e eléctrodos, demonstrou não ser passível de uma utilização a médio/longo prazo dado os neurónios encapsulados no polímero sofrerem apoptose num período entre 24 e 72 horas. Para minimizar este efeito, outros autores doparam o PEDOT com poli(sulfonato de estireno) (PSS), o que permitiu funcionalizar a superfície com o intuito de controlar a adesão e diferenciação de células neuronais primárias na superfície e, simultaneamente, manter boas propriedades eletroquímicas. Os resultados preliminares com culturas de células foram considerados animadores, o que levou outros investigadores a utilizar o mesmo polímero modificado mas com a adição do peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), tendo todo o sistema sido encapsulado em hidrogel de alginato. Apesar dos bons resultados reportados, tanto em testes *in vitro* como *in vivo*, a abordagem é algo complexa e, provavelmente, não passível de produção em larga escala <sup>[107,108]</sup>.

Com o intuito de otimizar a condutividade dos eléctrodos, o mesmo polímero, PEDOT, foi modificado com nano tubos de carbono (CNT), o que resultou numa boa estabilidade dos estímulos eléctricos fornecidos ao longo do tempo. Os autores deste estudo deduziram que os CNT, por estarem uniformemente distribuídos pelo PEDOT, serviram como material de reforço, formando um compósito com maior resistência mecânica e maior estabilidade. Nos ensaios preliminares que realizaram com cultura de neurónios observaram uma boa interação inicial <sup>[109-111]</sup>.

Para além do PEDOT, outros polímeros, tal como o polipirrol, PPy, e o politiofeno, PT, foram também testados tanto quimicamente puros como dopados com outros elementos. <sup>[33, 112-114]</sup>. Numa tentativa de melhorar o desempenho do polímero este foi dopado com o peptídeo sintético DCDPGYIGSR, de onde resultou melhor estabilidade fisiológica do eléctrodo e melhoria na adesão dos neurónios. Porém, apesar dos resultados serem promissores, não conseguiu evitar a gliose após a implantação do eléctrodo, que perdeu eficácia após 2 semanas <sup>[115]</sup>.

Outra abordagem utilizada foi a de dopar o polipirrol com CNT, de onde resultou um melhor desempenho em termos de condução eléctrica, melhor estabilidade mecânica e eletroquímica, quando comparados com o polímero original. Mais ainda, nos testes *in vitro* e *in vivo* o material desenvolvido demonstrou excelente biocompatibilidade <sup>[116]</sup>.

O polipirrol foi também dopado com sulfato de condroitina e posteriormente modificado com colagénio, o que deu origem a uma matriz fibrilar tridimensional na

superfície do material polimérico. O sistema manteve as propriedades elétricas do polímero condutor e resultados promissores nos testes com cultura de células *in vitro*. O processo de modificação da superfície desenvolvido permitiu utilizar outras moléculas, para além do colagénio, de forma a dar origem a uma superfície 3D com propriedades específicas e melhorar a adesão de neurónios e minimizar a reação das células da microglia<sup>[117]</sup>.

Uma outra alternativa consistiu em conjugar o ácido hialurónico com o polipirrol durante a etapa de polimerização e, assim, formar um filme fino estável com características hidrófilas e resistente à adesão de fibroblastos e astrócitos. O sistema demonstrou manter as propriedades elétricas do polímero original e ser estável em condições fisiológicas<sup>[118]</sup>.

O hidrogel do copolímero de poliuretana com polietilenoglicol foi outro tipo de revestimento polimérico estudado para revestir a superfície da parte condutora de elétrodos de polidimetilsiloxano (PDMS). Os resultados demonstraram que a superfície não era citotóxica e, aparentemente, desencadearam uma menor reação inflamatória por reduzir a densidade de proteínas adsorvidas na sua superfície. No entanto, os autores não reportaram qualquer tipo de resultado acerca da sua estabilidade em ambiente biológico<sup>[119]</sup>.

Outro hidrogel estudado foi o resultante da mistura de poli(álcool vinílico) e de poli(ácido acrílico) que, quando depositada sobre revestimentos de óxido de irídio obtidos por galvanoplastia, mantiveram uma boa condução elétrica. A superfície apresentou características hidrófilas e aumentou a estabilidade mecânica do revestimento de óxido de irídio<sup>[120]</sup>.

Para além da utilização de polímeros condutores, também foi colocada a hipótese de recorrer a polímeros biodegradáveis para a modificação de elétrodos neuronais. Esta abordagem permite, teoricamente, que o tecido ao redor do implante recupere, o que traduz na redução da cicatriz glial. Os polímeros derivados da tirosina podem ser concebidos com o objectivo de se degradarem em ambiente fisiológico e serem reabsorvidos pelo organismo para intervalos de tempo de algumas horas. Quando foi efectuado o ensaio *in vivo*, a degradação e a rápida reabsorção demonstrou diminuir a reação da microglia e minimizar os danos colaterais devidos à inserção do eléctrodo. Contudo, apesar de serem bons candidatos, ainda há poucos dados acerca da sua eficácia do ponto de vista eléctrico, e qual a influência que o material de base poderá ter a médio/longo prazo<sup>[121,122]</sup>.

## Capítulo 1

Não só os polímeros sintéticos foram utilizados para revestir a superfície de elétrodos, pois também foram efetuadas tentativas de funcionalização com biopolímeros, tal como o reportado com a proteína L1, através da imobilização covalente. Esta abordagem demonstrou permitir uma elevada densidade de neurónios aderidos, bem como a existência de prolongamentos e de sinapses entre eles<sup>[33,123]</sup>. Recentemente, a utilização de outro biopolímero, a seda, tem despertado interesse como revestimento de elétrodos com o intuito de diminuir a cicatriz glial<sup>[124]</sup>. Os resultados preliminares indicam que, estatisticamente, o elétrodo revestido com menor número de camadas de seda induz menor cicatriz, mas não é capaz de manter a sua forma durante os testes de inserção. No entanto, abre uma nova área de utilização de um biopolímero que apresenta menores problemas de compatibilidade biológica do que a reportada para os materiais não biológicos.

Estas últimas abordagens estão centradas numa visão global que utiliza moléculas bioativas tanto para promover uma resposta adequada das células do sistema nervoso central, como para libertação controlada de moléculas com ação farmacológica. Estas abordagens podem ser mais facilmente efetuadas se o material base a modificar for um polímero, razão pela qual a grande maioria da investigação que se debruça sobre este tema os utilize na sua pesquisa. Acresce o facto de que os materiais poliméricos apresentam propriedades mecânicas mais semelhantes às do tecido nervoso que qualquer outro tipo de material. No entanto, apesar de resultados promissores e de, continuamente, aparecerem estudos que apontam para a evolução e melhoria do desempenho biológico, estes sistemas não permitem resultados completamente fiáveis. Com efeito, apesar dos revestimentos poliméricos condutores serem promissores, quer estes quer os baseados em biopolímeros ainda não tem a estabilidade eletroquímica nem integridade mecânica necessária para manter um desempenho aceitável a longo prazo.

No que concerne o desenvolvimento de revestimentos de outros materiais que não polímeros, os filmes finos de carbono designados por “*diamond like carbon*” (DLC), depositados por plasma, já foram considerados para muitas aplicações devido à sua elevada resistência ao desgaste, auto lubrificação e propriedades tribológicas, mas ainda poucos estudos foram feitos na sua aplicação como revestimento de elétrodos neuronais. Contudo, deve ser referido que consoante sejam dopados com flúor, silício, azoto ou prata é possível obter melhor resposta por parte do sistema biológico, concomitantemente com algum desempenho antimicrobiano. Num estudo complementar foi demonstrado que a irradiação da superfície deste filmes com radiação ultra violeta permite afinar algumas das propriedades da superfície com o intuito de estimular preferencialmente a afinidade dos

neurónios em detrimento das outras células<sup>[125]</sup>. Também os nanotubos<sup>[126]</sup> e as nanofibras de carbono<sup>[127]</sup> foram avaliados para a cultura de células neuronais e são referenciados como tendo melhorado a adesão celular seletiva, à semelhança dos revestimentos DLC.

Como já referido, e no que concerne os materiais metálicos, o ouro e a platina são frequentemente utilizados em elétrodos, mas nem sempre apresentam os melhores resultados em termos de medição de estímulos com origem em neurónios. Em ambos foi demonstrado que uma superfície porosa permite melhorar a distribuição e medição do estímulo elétrico, pois permite diminuir a intensidade do ruído durante a medição, sem alterar significativamente a resposta do organismo pois o aumento da área superficial, devido à porosidade, induz uma maior área de contacto com os neurónios<sup>[86, 128-129]</sup>.

Quando o material base é silício várias aproximações foram efetuadas no que concerne a modificação da sua topografia superficial utilizando Si poroso<sup>[130]</sup> ou rugoso<sup>[131]</sup>. Quando comparados os resultados com os do silício nativo foi observada uma melhoria da adesão celular *in vitro*. No entanto, os estudos *in vivo* demonstraram que o silício não é nem biocompatível nem biologicamente estável quando inserido no sistema nervoso central<sup>[132]</sup>. Apesar de apenas causar uma ligeira degeneração dos neurónios e dos axónios, o silício causou um incremento da reação das células da glia levando ao desenvolvimento da cicatriz gial para períodos entre os 10 e os 90 dias, quando implantado em ratos, culminando numa elevada corrosão superficial visível ao fim de apenas 10 dias<sup>[132]</sup>.

Uma das vertentes abordadas para a modificação da superfície de implantes neuronais, sem recorrer à libertação controlada de fármacos ou à imobilização de moléculas bioativas que mimetizam o ambiente extracelular ou que induzam uma ligação mais favorável dos neurónios, é a da modificação de superfícies pela deposição de um revestimento. Quando o material de que é feito o elétrodo é silício, o nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) e o óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) apresentam-se como bons candidatos especialmente se for considerado que a adesão do revestimento ao substrato tem que ser maximizada. Com efeito, de nada serve desenvolver um revestimento com excelente comportamento em ambiente celular se o próprio processo de inserção no tecido neuronal provocar o seu descolamento do substrato. A utilização de nitretos, óxidos ou carbonetos de silício permitem uma compatibilidade química entre o substrato e o revestimento que é, à partida, uma garantia de adesão.

Neste contexto Kotzar e colaboradores efetuaram o estudo da citotoxicidade, *in vitro*, de uma série de materiais maciços à base de silício incluindo Si, silício dopado (n-

## Capítulo 1

Si), Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, carboneto de silício (SiC) e, como comparação, Ti<sup>[133]</sup>. Estes autores reportaram uma toxicidade mínima para todos estes materiais. Estes resultados alertam para o facto de na literatura, para a aplicação em sistemas celulares neuronais, os resultados reportados serem muitas vezes contraditórios, pelo que a comparação entre dados é um exercício bastante difícil e muitas vezes infrutífero. No entanto, e no que concerne a ação antibacteriana, há que realçar que o nitreto de silício demonstrou diminuir a atividade de algumas bactérias, como *P.aeruginosa* e *E.faecalis*, quando comparado com o titânio<sup>[127]</sup>. Apesar de não ser conhecido o mecanismo responsável pelo efeito antimicrobiano deste revestimento, os autores atribuem este efeito à hidrofilicidade da superfície bem como à sua nanotopografia, que apresenta grãos aciculares de forma hexagonal, o que contribui para atrasar a formação do biofilme, e assim diminuir a atividade<sup>[134, 135]</sup>.

O titânio é utilizado com alguma frequência quando se tratam de próteses estruturais, ou mesmo para servir de base para a fixação dos elétrodos. Por este motivo alguns autores consideraram o nitreto de titânio, depositado por pulverização catódica, como um revestimento para elétrodos, e constataram que são capazes de entregar o estímulo elétrico necessário. Ao colocar elétrodos com a parte condutora de nitreto de titânio e a parte isolante de nitreto de silício, conseguiram fazer a estimulação de neurónios de uma forma eficaz e com voltagens que não induzem reações eletroquímicas<sup>[136,137]</sup>.

Quando a escolha para a modificação da parte isolante dos elétrodos neuronais recai sobre um óxido são vários os que já foram estudados para este efeito. O estudo de Torimitsu e colaboradores comparou a adesão de células neuronais em superfícies alternadas de sílica e de vários outros óxidos, a saber: os de alumínio, índio, titânio, estanho e ítrio<sup>[138]</sup>. Estes investigadores reportaram uma adesão preferencial nas superfícies de óxido de alumínio e índio em relação à observada sobre as outras superfícies.

O óxido de irídio é também um dos materiais cerâmicos referenciados para a aplicação em estudo. O revestimento deste material com elevada percentagem de porosidade apresentou uma boa estabilidade mecânica e eletroquímica e resultados favoráveis nos testes *in vitro* em cultura de células<sup>[139,140]</sup>. Apesar de poderem ser produzidos por pulverização catódica, há dois processos de o obter, de onde resultam características diferentes. Um consiste na deposição a partir de um alvo de irídio em atmosfera reativa contendo oxigénio, o que origina um revestimento mais resistente ao estímulo elétrico. A outra abordagem consiste na deposição de filmes finos de irídio puro



que são posteriormente oxidados<sup>[141,142]</sup>. Outra técnica reportada na literatura para a produção deste revestimento é através de deposição física por feixe de elétrons (EBPVD<sup>3</sup>), cujas superfícies apresentam resultados, em termos de estabilidade mecânica e de compatibilidade neuronal, muito análogos aos produzidos por pulverização catódica<sup>[143]</sup>.

Devido aos resultados promissores do óxido de irídio, também surgiu a hipótese de fazer um revestimento condutor de óxido de titânio-irídio através de métodos de sol-gel. Os revestimentos possuíam um gradiente químico e quando testados em culturas de neurónios apresentaram resultados próximos aos do óxido de irídio monolítico<sup>[144]</sup>. Contudo, apesar de resultados promissores, se estes filmes forem sujeitos a estímulos exagerados podem sofrer degradação prematura<sup>[145]</sup>.

No que diz respeito à modificação de silício com SiO<sub>2</sub>, foram já desenvolvidos estudos em que este material foi depositado pelo método sol-gel. No entanto, as suas propriedades elétricas eram muito dependentes das condições de síntese e de tratamento do revestimento, o que se traduziu em superfícies com propriedades que, eletricamente, variaram de isolante a condutora. No entanto, os revestimentos desenvolvidos, com espessuras próximas dos 100nm, não foram testados quanto ao seu desempenho biológico, nem mesmo recorrendo aos testes considerados preliminares<sup>[146]</sup>.

Em revestimentos de SiO<sub>2</sub>, com 5 µm de espessura e depositados por PECVD sobre quartzo, foram induzidas várias topografias, todas de dimensões micrométricas. Ao cultivarem células de neuroblastoma de rato concluíram que a sílica apresenta uma excelente compatibilidade para com este tipo de células e que o tipo de padrão influenciava a diferenciação celular, pois o padrão designado em zig-zag apresentava os melhores resultados<sup>[147]</sup>.

Na literatura consultada não há referência a muitos trabalhos em que a sílica apareça como o material principal em revestimentos para elétrodos implantáveis no sistema nervoso central. Provavelmente tal facto pode ser consequência de este material ser duro e frágil. No entanto, estas propriedades caracterizam o material maciço e a pulverização catódica induz um conjunto de propriedades/características que podem, no seu conjunto, apresentar-se como apetecíveis para esta utilização.

Ainda assim, algum do trabalho desenvolvido no âmbito desta tese foi o de estudar revestimentos nanocompósitos híbridos polímero/sílica/prata na tentativa de

---

<sup>3</sup> do inglês *Electron Beam Physical Vapor Deposition*

## Capítulo 1

desenvolver superfícies que aliassem as propriedades adequadas dos materiais poliméricos e cerâmicos com propriedades antibacterianas<sup>[85]</sup>. A caracterização efetuada deu boas indicações para a utilização das superfícies como revestimentos de implantes de silício sendo necessário testar as superfícies selecionadas *in vitro*. No entanto, o sistema é referente aos estudos efetuados no início do trabalho aqui reportado, motivo pelo qual não foi incorporado no âmbito desta tese.

O desenvolvimento de revestimentos com novos materiais foi extensos nos últimos anos, mas torna-se imprescindível procurar por alternativas mais adequadas, porque apesar de um grande número de aplicações, os elétrodos nem sempre são eficazes, não necessariamente pelo conceito, mas por causarem reações adversas por parte do organismo<sup>[148]</sup>. A necessidade de mais investigação na área da modificação de implantes neuronais conduziu ao desenvolvimento do trabalho aqui apresentado. O objetivo é o de estudar a viabilidade de revestir o silício com filmes finos de sílica dopados com ouro (SiAu), prata (SiAg), cobre (SiCu), ouro e prata (SiAuAg), ouro e cobre (SiAuCu) e prata e cobre (SiAgCu), como uma alternativa para incrementar a sua compatibilidade e estabilidade em ambiente celular. É também objetivo deste estudo avaliar as propriedades antimicrobianas dos revestimentos desenvolvidos com o intuito de minimizar as infecções nosocomiais. Na literatura consultada não foi possível encontrar referências à utilização dos sistemas compostos pelo cerâmico e por dois metais para a aplicação pretendida neste estudo.

## Capítulo 2 – Materiais e Procedimentos

### Experimentais

Neste capítulo são apresentados os materiais utilizados e os procedimentos experimentais de deposição e de caracterização dos filmes finos, bem como o seu desempenho em testes antimicrobianos e de cultura de células eucarióticas. O resumo dos fundamentos teóricos de algumas técnicas bem como o material de apoio à interpretação de resultados encontram-se em anexo.

## *Capítulo 2*

## 2.1 Materiais

Todos os materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente e utilizados no seu estado de receção, exceto se descrito em contrário.

Os filmes finos foram depositados em cinco tipos de substratos: lâminas de vidro com 25mmx70mmx2mm, pastilhas de aço inoxidável 316L (AISI) com 10mmx10mmx1mm, pastilhas de silício (Si) monocristalino do tipo *p* com a orientação [111] e com 10mmx10mmx1mm e discos do mesmo tipo de Si com 3mm de diâmetro e 100µm de espessura.

As amostras de aço 316L foram adquiridas polidas numa das faces de modo a assegurar a reprodutibilidade no acabamento final deste material. A sua rugosidade superficial média,  $S_a$ , determinada por microscopia de força atómica (AFM), é de 38 nm.

As amostras de silício foram, após a sua receção, limpas em solução piranha durante 10 minutos à temperatura ambiente. As rugosidades médias das superfícies ( $S_a$ ) do Si eram: antes de qualquer tratamento 1,0 nm; após tratamento com solução piranha 1,2 nm, e, após tratamento químico e limpeza com plasma de 1,4 nm. Como substratos foram também utilizadas lâminas de vidro comerciais, de dimensões 25mmx75mm, com um valor inicial de  $S_a$  de 2nm.

Todas as amostras, antes de serem colocadas no porta-amostras, foram limpas por ultrassons em diferentes líquidos, segundo a sequência: acetona, álcool e água desionizada, tendo a limpeza demorado 10 minutos em cada líquido. Todas as amostras foram coladas ao porta-amostras com cola de prata e foi colocada uma gota de cola de nitreto de boro numa das pastilhas de silício com o objetivo de determinar a espessura do revestimento após eliminação da gota.

## 2.2 Técnica de Deposição de filmes finos: Pulverização

### **Catódica** *(Anexo 1, pg A1)*

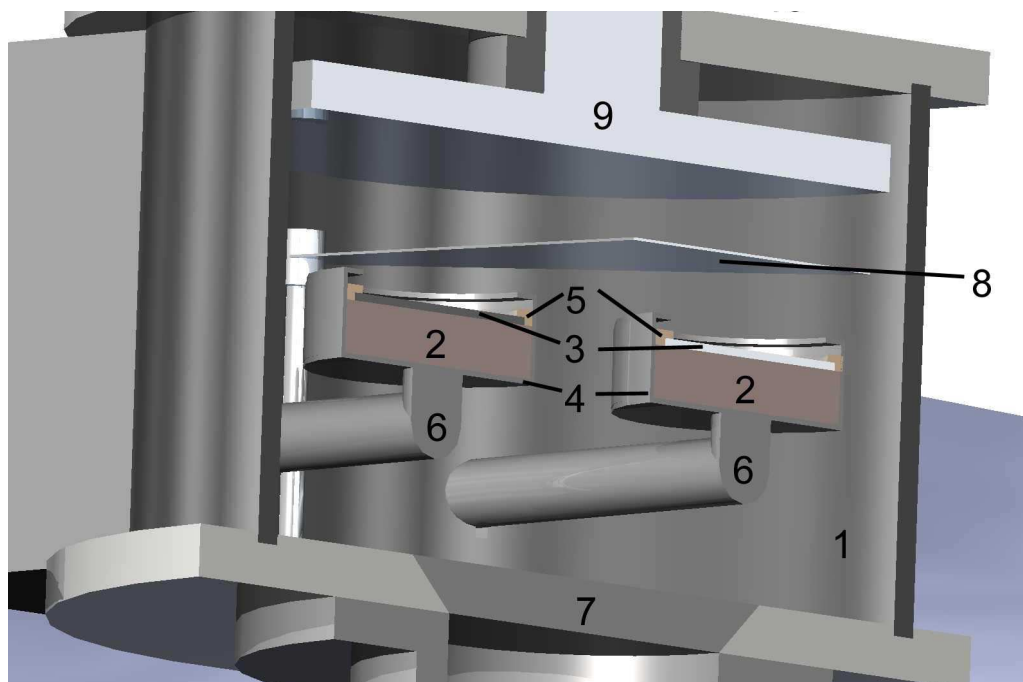
Neste trabalho foi usado um equipamento da marca Edwards Coating System, modelo E306A, que possui dois cátodos ligados a duas fontes de potência independentes (Fig. 2.1).

O vácuo na câmara de deposição foi conseguido através de duas bombas de vácuo: uma bomba primária rotativa que atinge valores de  $10^{-1}$  Pa e uma bomba

## Capítulo 2

turbomolecular que permite um vácuo último da ordem dos  $10^{-4}$  Pa. O gás de descarga utilizado foi argônio de pureza 99,9999 %.

O alvo de sílica ( $\text{SiO}_2$ ) (Cerac, Inc.  $\varnothing=100$  mm, espessura 3 mm e pureza 99,9 %) foi alimentado por uma fonte Eni Power Systems, modelo OEM12-05, em corrente de radiofrequência, e os alvos de ouro (Au), prata (Ag) ou cobre (Cu) (Goodfellow  $\varnothing=100$  mm, espessura 1 mm e pureza 99,9%) alimentados por fonte de potência da marca Huttinger, modelo RFG 1000 RF, também com recurso a corrente de radiofrequência.



**Figura 2.1-** Esquema da câmara de deposição: 1-Paredes da câmara de deposição; 2-Cátodo; 3-Alvo; 4-Proteção cátodo/alvo; 5-Anel de fixação do alvo; 6-Ligação ao gerador; 7-Válvula de vácuo acima da saída para a bomba de vácuo; 8-Anteparo; 9-Ânodo.

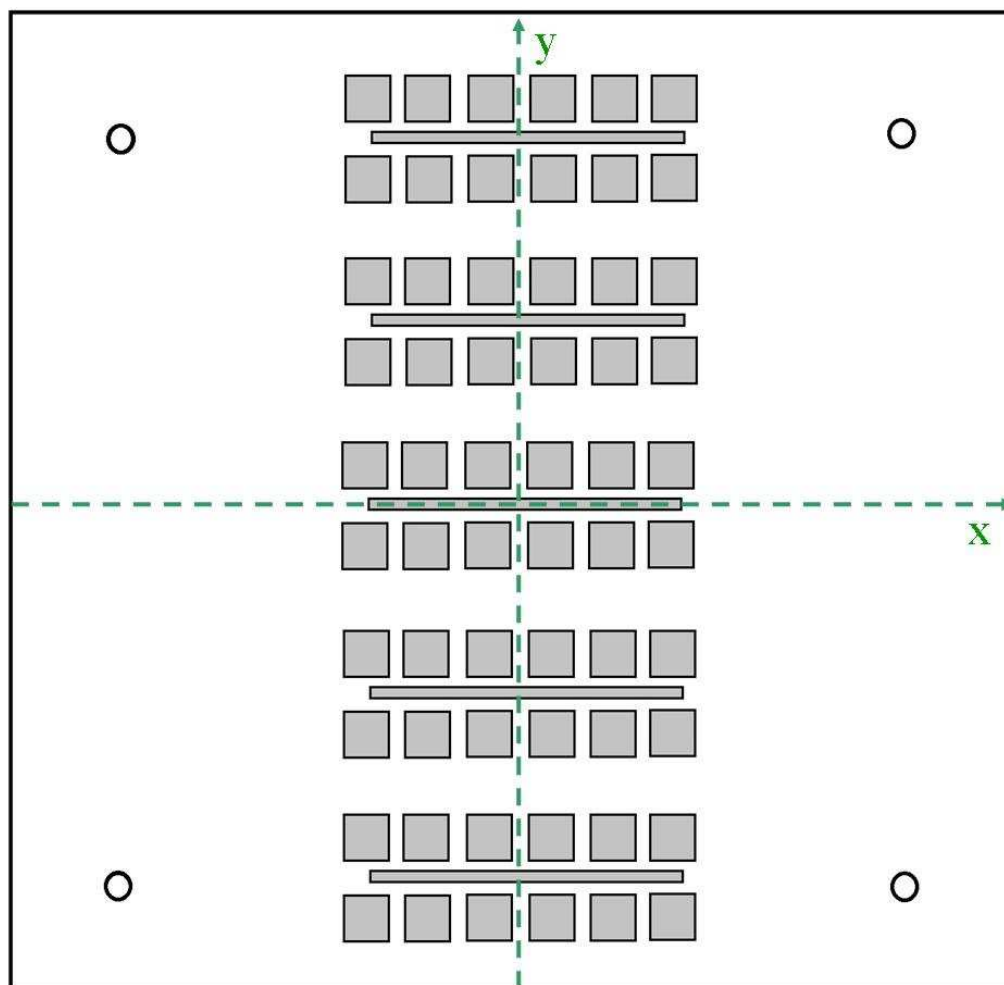
Antes de iniciar qualquer deposição foi efetuada, já na câmara de deposição, cuja pressão inicial foi sempre inferior a  $5 \times 10^{-4}$  Pa, a limpeza, por plasma, dos alvos e dos substratos, nas condições resumidas na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** - Condições de limpeza dos alvos e do substrato

	Pressão (Pa)	Tempo (s)	Potência (W)
Alvo cerâmico		600	250
Alvo metálico	0,7	600	100
Substrato		600	250

A necessidade de assegurar a reprodutibilidade das propriedades/características dos filmes finos obrigou à realização de estudos preliminares para o desenvolvimento da metodologia de deposição adequada. Esta deveria permitir a modificação de um número adequado de substratos atendendo à variedade de técnicas de caracterização, abióticas e bióticas. De todas as abordagens experimentais apenas uma se revelou como sendo adequada no cumprimento dos requisitos estabelecidos. Assim, para cada binómio alvo metálico/alvo sílica, os substratos foram colocados num único porta substratos, com distâncias variáveis em relação aos alvos mas com coordenadas (em x e y) perfeitamente definidas (Fig. 2.2). A análise da composição química elementar e a determinação da espessura dos filmes finos depositados nos estudos preliminares revelou que, para uma gama de valores de y ( $\Delta y = 30\text{mm}$ ), havia homogeneidade, para uma variação de posição em x de -35 a +35 mm ( $\Delta x = 70\text{mm}$ ) em relação ao eixo central.

Após os estudos preliminares foram fixadas as posições e selecionadas as densidades de potência a utilizar para a modificação dos substratos. Os revestimentos depositados apresentam espessuras entre 250 e 760 nm.



**Figura 2.2-** Esquema da disposição das mostras no porta amostras

Na tabela 2.2 estão apresentadas as condições de deposição utilizadas nas deposições de sílica dopada com um metal, bem como as designações dadas a cada superfície.



**Tabela 2.2** - Condições de deposição dos filmes de sílica dopados com um metal: ouro, prata ou cobre

Designação	Localização do substrato	Densidade potência alvo SiO <sub>2</sub> (W.mm <sup>-2</sup> )	Tempo (s)	Densidade potência alvo metálico (W.mm <sup>-2</sup> )
SiO <sub>2</sub>	SiO <sub>2</sub>	3,18	3600	0
SiAg1	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAg2	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,51x10 <sup>-2</sup>
SiAg3	meio	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAg4	meio	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAg5	meio	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAg6	meio	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAg7	meio	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAg8	Ag	0	300	3,18x10 <sup>-2</sup>
SiAu1	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAu2	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,76x10 <sup>-2</sup>
SiAu3	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,51x10 <sup>-2</sup>
SiAu4	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAu5	meio	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAu6	Au	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,51x10 <sup>-2</sup>
SiAu7	Au	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiAu8	Au	0	300	3,18x10 <sup>-2</sup>
SiCu1	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiCu2	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,51x10 <sup>-2</sup>
SiCu3	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiCu4	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,51x10 <sup>-2</sup>
SiCu5	SiO <sub>2</sub>	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,76x10 <sup>-2</sup>
SiCu6	Cu	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,51x10 <sup>-2</sup>
SiCu7	Cu	3,18x10 <sup>-2</sup>	3600	0,25x10 <sup>-2</sup>
SiCu8	Cu	0	300	3,18x10 <sup>-2</sup>

Para dopar a sílica com dois metais foi utilizado um alvo metálico maciço que foi dopado com pastilhas do segundo material metálico, por forma a variar a percentagem de área relativa de cada um dos metais exposta ao plasma. Na tabela 2.3 são apresentadas as condições de deposição utilizadas nas deposições de sílica dopada com dois metais, bem como as respetivas designações.

**Tabela 2.3** - Condições de deposição dos filmes de sílica dopados com dois metais: ouro e prata, prata e cobre, ouro e cobre.

Designação	Localização do substrato	área exposta de M1/M2 (%)	Tempo (s)	Densidade potência alvo metálico ( $W \cdot mm^{-2}$ )
SiAgAu1	SiO <sub>2</sub>	50% Ag	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiAgAu2	SiO <sub>2</sub>	50% Ag	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiAgAu3	SiO <sub>2</sub>	6% Ag <sup>1</sup>	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiAgAu4	SiO <sub>2</sub>	18% Ag <sup>1</sup>	3600	$0,64 \times 10^{-2}$
SiAgAu5	SiO <sub>2</sub>	12% Ag <sup>1</sup>	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiAgAu6	Au	25% Ag	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiAgAu7	Au	75% Ag	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiAgAu8	Au	50% Ag	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiAgAu9	Au	25% Ag	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiAgAu10	Au	50% Ag	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiCuAg1	SiO <sub>2</sub>	50% Cu	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiCuAg2	SiO <sub>2</sub>	50% Cu	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiCuAg3	meio	50% Cu	3600	$0,13 \times 10^{-2}$
SiCuAg4	meio	50% Cu	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiCuAg5	Ag	75% Cu	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiCuAg6	Ag	75% Cu	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiCuAg7	Ag	50% Cu	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiCuAg8	Ag	50% Cu	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiCuAg9	Ag	25% Cu	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiCuAg10	Ag	25% Cu	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiCuAu1	SiO <sub>2</sub>	50% Cu	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiCuAu2	SiO <sub>2</sub>	50% Cu	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiCuAu3	meio	50% Cu	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiCuAu4	meio	50% Cu	3600	$0,13 \times 10^{-2}$
SiCuAu5	Au	50% Cu	3600	$0,25 \times 10^{-2}$
SiCuAu6	Au	75% Cu	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiCuAu7	Au	50% Cu	3600	$0,51 \times 10^{-2}$
SiCuAu8	Au	25% Cu	3600	$0,51 \times 10^{-2}$

<sup>1</sup> nestes casos as pastilhas foram colocadas sobre o alvo de sílica e não sobre o alvo metálico.

## 2.3 Técnicas de caracterização

### 2.3.1 Microanálise por sonda eletrônica (EPMA)<sup>4</sup> (Anexo2, pg A4)

O equipamento de EPMA utilizado no presente estudo, para avaliar a composição química elementar, foi um modelo da marca CAMECA, modelo *Camebax SX 50* (Fig. 2.3).

As condições de análise utilizadas na quantificação de cada um dos elementos químicos constituintes dos filmes finos estão sumariadas na tabela 2.4. Para evitar o efeito cumulativo, na quantificação do silício, foram usados nesta caracterização os filmes finos depositados sobre aço 316L.



**Figura 2.3** - Equipamento de EPMA utilizado.

**Tabela 2.4** - Condições utilizadas na análise quantitativa dos filmes finos operatórias da microsonda

Elementos	Cristal	Padrão	Tensão de Aceleração (kV)	Intensidade de Corrente (nA)
O	PC1	SiO <sub>2</sub>	5	60
Si	TAP	SiO <sub>2</sub>	5	60
Cu	TAP	Cu	5	60
Ag	PET	Ag	5	60
Au	PET	Au	5	60

<sup>4</sup> do inglês “Electron Probe Micro Analysis”

No presente estudo, a análise quantitativa elementar foi determinada utilizando a correção segundo o modelo de Pouchou & Pichoir, que tem em consideração a presença de elementos leves, uma vez que o equipamento permite a análise quantitativa de todos os elementos da tabela periódica a partir do boro.

### 2.3.2 Difração de Raios X (Anexo2 pg A6)

Os filmes finos foram caracterizados num difratômetro Philips, modelo X'Pert com um goniômetro PW 3020/00, usando uma tensão de aceleração de 40 kV e uma intensidade de corrente de 35 mA, equipado com detetor unidirecional, em arco círculo de 120°, com uma resolução de 0,01° e geometria Bragg-Brentano. Este equipamento possui anticátodo de Cobre com ( $K\alpha_1=0,15406$  nm e  $K\alpha_2=0,15444$  nm) e um colimador monocapilar cilíndrico com um diâmetro de feixe de saída de 100  $\mu$ m. Os ensaios foram efetuados em modo contínuo com um detetor PIXcel, com um intervalo de difração  $2\theta$  compreendido entre 20° e 90° com um passo de 0,025° e tempo de aquisição de 0,5 s por passo.

Os dados foram tratados em computador no programa PC-MPDW (Philips), tendo-se procedido à identificação das fases presentes nos filmes por comparação da posição dos picos presentes nos difractogramas com os valores tabelados nas fichas ICDD<sup>5</sup> (Anexo 4, pg A22).

### 2.3.3 Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM<sup>6</sup>) (Anexo2 pg A9 e A10)

A determinação do tipo de morfologia, bem como a espessura dos filmes finos depositados por pulverização catódica, foi efetuada recorrendo à microscopia de eletrônica de varrimento.

No presente estudo, foi utilizado um equipamento FEI Quanta 400FEG, com uma tensão aplicada de 15kV. A morfologia da secção transversal do revestimento foi observada no microscópio após fratura do conjunto filme/substrato.

---

<sup>5</sup> - do inglês International Center for Diffraction Data

<sup>6</sup> - do inglês Scanning Electron Microscopy

### 2.3.4 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)<sup>7</sup> (Anexo2 pg A9 e A11)

Antes das deposições, os substratos de silício foram desbastados até atingirem uma espessura entre 100 e 150  $\mu\text{m}$  e, através de um equipamento de corte por ultrassons Fischione Model 170, foram cortados discos com 3mm de diâmetro. Após deposição, as amostras foram desbastadas num “*dimple grinder*” da marca Gatan até ser visível a formação de um orifício. O acabamento final da amostra foi efetuado por desbaste iônico, durante 45 minutos, num equipamento Gatan Dual Ion Mill 600. Para evitar artefactos, causados por aquecimento, durante o polimento final a amostra esteve sempre arrefecida por azoto líquido.

As amostras foram observadas num microscópio FEI Tecnai G<sup>2</sup> com 200KV de tensão de aceleração.

### 2.3.5 Propriedades mecânicas (Anexo2 pg A13)

O equipamento utilizado para a avaliação das propriedades mecânicas, nomeadamente dureza (H) e módulo de elasticidade (E), foi um nanoindentador da marca MicroMaterials, modelo NanoTest (Fig. 2.4) que permite a aquisição, o registo e o tratamento de dados. Este equipamento possui um sistema de amortecimento de vibrações que protege a cabeça de medição e a unidade de posicionamento.



**Figura 2.4-** Equipamento utilizado nos ensaios de nanoindentação.

<sup>7</sup> - do inglês Transmission Electron Microscopy

## Capítulo 2

### a) Dureza

A carga, electromagneticamente aplicada, tem um valor inicial de 0,04 mN e é aumentada gradualmente até um valor máximo previamente escolhido, que no caso deste equipamento não pode ultrapassar os 500 mN. Para cada carga, progressivamente aplicada, é medida a profundidade de indentação através de um sensor de deslocamento capacitivo, que permite uma resolução de 0,1nm.

Apesar de os filmes terem sido depositados sobre aço 316L e silício, que possuem durezas substancialmente diferentes, presume-se que os valores da dureza irão convergir para o mesmo valor, ao utilizar cargas cada vez mais pequenas. Por essa razão, em ambas as amostras, foram feitos ensaios a cargas máximas de 40, 20, 15, 10, 5, 1,5, 0,75 e 0,30 mN. Em todos os casos o tempo de carga foi de 30 s, com 5 s de manutenção à carga máxima. O período de descarga foi de cerca de 30 s. A cerca de 10% da carga máxima, durante a descarga, foi realizado um período de manutenção de carga para correção da deriva térmica. Foram realizadas cerca de 20 indentações por ensaio, com um indentador Berkovich. O tipo de função de área utilizada foi  $A=A+B\cdot h_c+C\cdot h_c^2$  com A, B e C determinados após testes de calibração com uma amostra padrão de sílica com dureza de 8,8 GPa e módulo de elasticidade de 72 GPa.

### b) Módulo de elasticidade

No cálculo do módulo de elasticidade, e para o material do indentador utilizado (diamante), foram considerados os seguintes valores: módulo de elasticidade  $E_i=1050$  GPa, coeficiente de Poisson  $\nu_i=0,07$  e complacência  $C_0=0,07\text{nm/mN}$ . O coeficiente de Poisson considerado para os filmes finos estudados foi de 0,25.

### 2.3.6 Adesão

O teste de indentação deslizante normalizado (*scratch test*) não pode utilizado nos conjuntos substrato/revestimento desenvolvidos neste trabalho devido à fragilidade do silício. No entanto, a necessidade de avaliar a adesão dos revestimentos desenvolvidos tornou necessário recorrer a um outro tipo de teste que se aproximasse o mais possível da situação real de inserção do silício revestido no cérebro. Por este motivo, foi utilizada uma solução de agar-agar ( $0,5\text{g}/100\text{cm}^3$ ) que simula, do ponto de vista mecânico, a resistência

que o cérebro oferece à inserção dos elétrodos<sup>[149,150]</sup>. Para efetuar estes testes foram efetuados os revestimentos sobre amostras de silício com 3 mm de largura e 7 mm de comprimento. Para simular a inserção foi utilizado um equipamento mecânico, desenvolvido no GNM-CEMUC, capaz de inserir e retirar a amostra, ciclicamente, 10 vezes seguidas. No final dos testes a superfície do revestimento foi analisada por microscopia ótica e comparada com a apresentada antes do teste.

### 2.3.7 Microscopia de Força Atômica (AFM<sup>8</sup>) (Anexo2 pg A16)

O equipamento utilizado na caracterização por AFM foi o modelo DiInnova, da marca Veeco. As pontas de silício, com revestimento refletor de alumínio (Bruker), possuíam uma frequência de ressonância ( $f_0$ ) de 320 kHz e constante de mola,  $k$ , de 40  $\text{Nm}^{-1}$ . A caracterização foi sempre efetuada em modo de contacto intermitente ou *tapping*.

Todas as imagens (512 análises/linha x 512 linhas) resultam de caracterizações efetuadas à temperatura de 20°C e as imagens, bem como os valores de rugosidade superficial, são representativos de pelo menos três medições realizadas em diferentes locais da superfície em análise.

### 2.3.8 Medição de Ângulos de contacto (Anexo2 pg A17)

Neste trabalho foi utilizada a técnica da medição direta do ângulo de contacto estático, entre as superfícies e uma gota de 10  $\mu\text{l}$  de água destilada, com um aparelho da marca Dataphysics, modelo OCA 20. Cada avaliação consistiu no mínimo sete medições em cada amostra, e o valor médio calculado é apresentado como sendo o valor do ângulo de contacto ( $\theta$ ) para a superfície em estudo.

O valor do ângulo de contacto estático permite a determinação de outros parâmetros relacionados com a hidrofiliicidade/hidrofobicidade de uma superfície, mas a que mais é utilizada para relacionar este valor com as propriedades/características do material necessárias a um bom desempenho como dispositivo biomédico é a tensão de adesão da água,  $\tau^0$ , que é calculado como o produto da tensão da água ( $\gamma^0 = 72,8 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) pelo valor do cosseno do ângulo de contacto que este líquido faz com a superfície.

---

<sup>8</sup> do inglês Atomic Force Microscope

### 2.3.9 Potencial Zeta (Anexo2 pg A18)

Nestes estudos foi utilizado um equipamento SurPASS, da Anton Paar GmbH e as avaliações efetuadas com a célula de medição designada por célula com abertura ajustável (“Adjustable Gap Cell”). O eletrólito utilizado nas medições foi KCl 1 mM, a pH=7,4. Além dos estudos do valor de potencial zeta ( $\zeta$ ) para o pH fisiológico, foi determinado o ponto isoelétrico das superfícies fazendo variar o pH do eletrólito por titulação direta no equipamento com soluções de HCl e NaOH 0,1M.

### 2.3.10 Testes microbiológicos

A análise microbiológica avaliou a capacidade das superfícies modificadas em inibir o crescimento de três estirpes bacterianas: *Acinetobacter lwoffii* (*A. lwoffii* DSM 2403), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis* LMG 7937) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa* LMG 1242).

O meio de cultura utilizado foi Luria Bertani (LB) sólido e foram preparados 0,5 dm<sup>3</sup> com água desmineralizada. Em seguida, o meio foi esterilizado por autoclavagem (121°C, 15 min), espalhado em caixas de Petri ( $\varnothing=90$  mm) e deixado a solidificar, durante 24 horas, à temperatura ambiente.

Uma alíquota de cada uma das estirpes, preservadas a -80° C, foi colocada em meio LB líquido e incubada a 37°C, durante 24 h. Quando crescidas, as culturas foram utilizadas para preparar uma suspensão, em 2 cm<sup>3</sup> de água estéril, com a densidade ótica a 600nm (DO<sub>600</sub>) de 0,5. Em cada caixa de Petri foram inoculados 0,1 cm<sup>3</sup> da suspensão, utilizando um espalhador para distribuir homogeneamente as bactérias. Sobre o meio de cultivo inoculado foram colocadas, em duplicado, as amostras em estudo com a superfície modificada em contacto com a cultura. As culturas foram incubadas a 37°C, durante 24h, observadas e fotografadas. A análise de resultados consistiu na medição dos halos de inibição do crescimento das estirpes bacterianas.

A observação das bactérias por microscopia eletrônica de varrimento foi efetuada após fixação química com glutaraldeído 5% (v/v) e desidratação em etanol. Após imersão em glutaraldeído durante 10 minutos, as amostras foram imersas por igual período de tempo em soluções de etanol: água, com concentrações sequenciais (v/v) de 25:75, 50:50,



75:25 e 100:0.

Para avaliar o efeito tóxico das espécies químicas libertadas dos filmes finos, quando inseridos em meio líquido, as amostras foram imersas em 0,5 cm<sup>3</sup> de soro fisiológico (NaCl 0,9% (m/v)) e deixadas em agitação, a 37°C, durante 24 horas. Durante este tempo foram preparadas caixas de Petri com meio de cultura LB, tal como descrito anteriormente, e foi também preparada uma suspensão de *A. lwoffii*, conforme já descrito, e com DO<sub>600</sub> de 0,317. Após as 24 horas, as amostras foram retiradas da incubação em soro fisiológico e cada sobrenadante adicionado às suspensões microbianas preparadas. As suspensões bacterianas foram colocadas 0, 1 e 4 horas em contacto com os sobrenadantes, e em seguida foram inoculadas (0,1 cm<sup>3</sup>) e homogeneamente espalhadas, em meio LB. As culturas foram analisadas quanto ao crescimento (presença de colónias) após incubação a 37°C durante 24h.

### 2.3.11 Testes Celulares

#### a) Isolamento e cultura de neurónios do córtex frontal

Para o isolamento dos neurónios foram sacrificadas fêmeas de rato (estirpe Wistar) grávidas, com 17/18 dias de gestação, por deslocação cervical, tendo-se removido os embriões e, em seguida, foram dissecados os cérebros. Os cérebros foram colocados numa caixa de Petri contendo solução de Hank (HBSS<sup>9</sup>: KCl 5,36 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mM, NaCl 137 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,16 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,34 mM, glicose 5 mM, piruvato de sódio 1mM, HEPES 10mM e vermelho de fenol 0,001%) e foi depois dissecada toda a região cortical. O tecido foi colocado num volume final de 7 cm<sup>3</sup> e a esta suspensão foram adicionados 3 cm<sup>3</sup> de uma solução de tripsina (2 mg.cm<sup>-3</sup> em HBSS) durante 15 minutos, a 37°C. Após sedimentação o sobrenadante foi aspirado e o tecido foi lavado 4-5 vezes com 4-6cm<sup>3</sup> de HBSS, para terminar a ação da tripsina. Após agitação suave e repouso, de forma a permitir a sedimentação dos tecidos, o sobrenadante foi de novo aspirado e foram adicionados 5 cm<sup>3</sup> de HBSS ao sedimento. As células foram dissociadas pipetando a suspensão repetidamente com uma pipeta de vidro de 5 ml e os agregados celulares foram removidos por filtração através de um filtro com diâmetro de poro de 70 µm. A contagem

---

<sup>9</sup> do inglês Hank's Balanced Salt Solution

## Capítulo 2

de células na suspensão final foi feita num hemocitómetro para determinar a densidade celular, e as células foram posteriormente diluídas, e plaqueadas, em meio de plaqueamento neuronal (MEM suplementado com 10% soro de cavalo, 0,6% glicose and 1 mM ácido pirúvico) de modo a obter uma concentração de  $94,7 \times 10^3$  células.cm<sup>-3</sup>, numa placa “*multiwell*” com 24 poços, num volume final de 1 cm<sup>3</sup>/poço, durante 2-3 horas. Findo este período, o meio foi substituído por 1 cm<sup>3</sup> de Meio Neurobasal (MNB) suplementado com SM1 (1:50), 0,5 mM glutamina e 0,12 mg/mL gentamicina, mas na ausência de glutamato. Após 3 dias de cultura, a divisão das células da glia foi inibida com a adição de 10 µM 5-FdU-NOAC (5-FDU) ao meio. A cultura foi mantida numa incubadora humidificada na presença de 5% CO<sub>2</sub>/95% ar, a 37°C e durante o período indicado na legenda das figuras.

Após ter sido realizada uma pré-seleção, descrita no Anexo 3 (pp A20), as superfícies usadas neste estudo foram deixadas imersas em soro fisiológico durante 24 h, a 37°C, antes da esterilização com uma solução de etanol 75% (v/v) durante 30 minutos e condicionamento com MNB. As culturas usadas para estas experiências foram preparadas de acordo com o descrito anteriormente. No final do tempo de incubação as amostras foram processadas para observação em microscopia eletrónica de varrimento de acordo com o procedimento descrito para as estirpes bacterianas. O protocolo utilizado para a marcação com anticorpos para a observação em microscopia de fluorescência está descrito na secção 2.12.2.

### *b)Protocolo de imunocitoquímica*

Antes da marcação com os anticorpos as superfícies foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato (PBS<sup>10</sup>; NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM), e fixadas durante 15 minutos à temperatura ambiente com uma solução de 4% de p-formaldeído (p/v) e 4% (p/v) de sacarose em PBS. Após a fixação, as células foram lavadas mais duas vezes em PBS durante 5 minutos. As células foram permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 0,25% em PBS durante 5 minutos, e lavadas durante 5 minutos com PBS. Após permeabilização, a marcação não específica foi minimizada através da incubação das células com PBS contendo albumina sérica de

---

<sup>10</sup> do inglês ‘Phosphate-Buffered Solution’

bovino (BSA<sup>11</sup>) 10% (p/v) durante 30 min, a 37°C. De seguida, e após breve lavagem com PBS, as células foram incubadas com um anticorpo antitubulina (1:1000) numa solução de PBS suplementada com BSA 3% (p/v), a 4°C durante a noite. No dia seguinte, as células foram lavadas 6 vezes com PBS durante 2 minutos antes e depois da incubação com o anticorpo secundário acoplado ao fluoróforo Alexa<sup>®</sup> 488 durante 45 minutos, a 37°C. Os núcleos foram marcados com Hoechst 33342 (0,5 µg.cm<sup>-3</sup> em PBS) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Em alguns dos estudos realizados as células foram marcadas também com um marcador específico de uma proteína presente apenas nas células da glia (astrócitos), a GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Nestes casos após 3 dias de cultura não foi adicionado 5-FDU para permitir a divisão das células da glia.

As amostras foram depois lavadas com PBS e posteriormente foram colocadas sobre uma gota de meio de montagem para fluorescência (DAKO) (previamente colocada numa lâmina de vidro), com a face revestida em contacto com o meio de montagem. Após secagem as faces laterais da amostra foram seladas à lâmina de vidro com verniz e as preparações foram mantidas a 4°C até observação em microscopia de fluorescência.

---

<sup>11</sup> do inglês 'Bovine Serum Albumin'

## *Capítulo 2*

## Capítulo 3 – Análise e Discussão de Resultados

Neste capítulo são, numa primeira parte, apresentados e analisados os resultados que caracterizam abioticamente os filmes finos, não só em volume mas também com ênfase na superfície mais exterior. Na segunda parte o desempenho das superfícies modificadas, selecionadas após a primeira etapa, são aferidas em testes bióticos; inicialmente com células procarióticas, para avaliar o seu desempenho antimicrobiano contra infecções nosocomiais e, finalmente, com células do sistema nervoso central para, em comparação com o material não modificado, avaliar o seu desempenho celular considerando a aplicação final.



### 3.1 Composição Química

A designação e a composição química, determinada por EPMA, dos filmes finos estão resumidos, na Tabela 3.1, para os filmes de sílica dopados apenas com um metal, e na Tabela 3.2, para os filmes de sílica dopados com dois metais.

**Tabela 3.1** – Designação e composição química dos filmes finos de sílica dopados com um metal.

Designação	Composição química (% at.)			O/Si
	O	Si	Metal	
SiO <sub>2</sub>	68,9	30,1	---	2,3
SiAg1	66,9	32,4	0,7	2,1
SiAg2	64,2	33,2	2,6	1,9
SiAg3	61,8	30,1	8,1	2,1
SiAg4	52,5	33,8	13,7	1,6
SiAg5	53,7	27,1	19,2	2,0
SiAg6	42,1	20,5	37,4	2,1
SiAg7	28,0	13,4	58,7	2,1
SiAg8	---	---	100,0	---
SiAu1	68,8	30,6	0,6	2,2
SiAu2	62,8	28,7	8,5	2,2
SiAu3	59,6	28,6	11,8	2,1
SiAu4	53,9	28,7	17,4	1,9
SiAu5	40,0	19,9	40,1	2,0
SiAu6	25,1	11,7	63,2	2,1
SiAu7	16,8	6,8	76,4	2,5
SiAu8	---	---	100,0	---
SiCu1	66,9	32,5	0,6	2,1
SiCu2	63,6	32,1	4,3	2,0
SiCu3	64,8	29,8	5,4	2,2
SiCu4	63,4	28,8	7,8	2,2
SiCu5	61,9	27,8	10,4	2,2
SiCu6	43,7	9,3	47,0	4,7
SiCu7	37,3	8,3	54,4	4,5
SiCu8	---	---	100,0	---

A sílica, como revestimento, tem sido estudada para várias aplicações, desde encapsulamento de lixo nuclear a filmes finos para aplicações em microeletrônica. Porém, devido às condições de deposição, seja dopada com outros elementos ou não, a estequiometria O/Si pode variar ligeiramente. Quando depositada por pulverização catódica em modo reativo, através de um alvo de silício e uma atmosfera rica em oxigênio, a estequiometria varia não só com a pressão parcial do oxigênio, mas também com a temperatura da deposição, de acordo com o trabalho de diversos autores <sup>[151,152]</sup>.

No presente estudo, onde a deposição é efetuada em modo não reativo e para o caso da sílica dopada apenas com um metal, a estequiometria do revestimento cerâmico mantém-se próxima da do material maciço, ou seja, 2 átomos de oxigênio para 1 de silício. No entanto, há algumas exceções, notoriamente mais visíveis no caso do sistema de sílica dopada com cobre. Apesar de algum excesso de oxigênio ter sido já reportado <sup>[153,154]</sup>, não seria expectável que a relação O/Si fosse muito superior a 2. No entanto, para concentrações de cobre superiores a 40% at. há cerca de 2 vezes mais oxigênio do que o necessário para formar SiO<sub>2</sub>, o que indicia a possibilidade de formação de óxidos de cobre. De facto, a entalpia de formação da sílica ( $\Delta H_f^0 \text{ SiO}_2 = -910,9 \text{ kJ/mol}$ ) é muito superior à dos óxidos de cobre ( $\Delta H_f^0 \text{ Cu}_2\text{O} = -166,7 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta H_f^0 \text{ CuO} = -155,2 \text{ kJ/mol}$ ) <sup>[155,156]</sup>, o que de um ponto de vista termodinâmico não justifica a formação destes últimos. No entanto, é necessário considerar que a pulverização catódica permite a obtenção de fases metaestáveis e de compostos não previstos pela termodinâmica química.

Com efeito, estudos efetuados sobre a codeposição de filmes finos, em atmosfera inerte, a partir de alvos de sílica e de cobre mostraram a presença de Cu<sub>2</sub>O nos filmes finos após deposição <sup>[157]</sup>. Outros estudos em que se depositou cobre puro, por pulverização catódica em atmosfera de argón, sobre substratos de sílica, revelaram a formação de CuO para tempos de deposição tão curtos como 5 segundos <sup>[158]</sup>. Acresce o facto de que ficou demonstrado que a pulverização catódica de filmes finos de sílica em atmosfera de argón apresentam uma relação O/Si, dos átomos ejetados a partir do alvo de SiO<sub>2</sub>, que pode variar entre 5 e 25, dependendo do ângulo de incidência dos iões Ar<sup>+</sup> <sup>[159]</sup>. Tal implica uma atmosfera rica em oxigênio e portanto propícia à formação de óxidos de metais concomitantemente com os de sílica.

Um outro fator preponderante para a composição química dos filmes depositados é a distância dos alvos aos substratos, dado que é variável para a mesma deposição. Em pulverização catódica os substratos estão colocados diretamente sobre um alvo com o objetivo ideal de ter uma elevada velocidade de deposição e a minimização da perda de



material ejetado. Na realidade, a quantidade de material perdido, e que acaba depositado nas paredes da câmara de deposição, é elevada e depende de fatores tão importantes como a geometria da câmara, a pressão de deposição, a massa atômica e a distribuição angular das espécies ejetadas, bem como da posição relativa dos substratos em relação ao alvo<sup>[160]</sup>. Assim e para um determinado alvo, numa mesma câmara a uma mesma pressão de deposição apenas o parâmetro da distância entre substratos e alvo terá influência. Os mesmos autores determinaram o percurso médio livre de vários elementos químicos, com densidades eletrônicas distintas. Quando se compara, para a mesma pressão, o valor deste parâmetro para o carbono e o alumínio, o do elemento menos denso é cerca do dobro do valor calculado para o outro (C=18 a 26cm; Al=9 a 14 cm). Estes dados evidenciam que há uma conjugação de fatores que propiciam a formação dos óxidos de cobre: entalpias de formação negativas, maior concentração de oxigénio do que de silício e menor perda de energia, por parte das espécies de oxigénio ejetadas, devido a colisões.

Nas deposições de SiO<sub>2</sub> com prata ou ouro, não seria expectável a formação de óxidos destes metais nobres. Com efeito, e mesmo considerando que a pulverização catódica pode originar a formação de compostos não previstos termodinamicamente, os valores das entalpias de formação dos respetivos óxidos são baixos ( $\Delta H_f^0 \text{Ag}_2\text{O} = -31,1 \text{ kJ/mol}$ ) ou não registados na literatura<sup>[161]</sup>. De facto, alguns autores fizeram um estudo comparativo da deposição, em modo reativo com oxigénio, de prata, titânio e estanho, metais que têm diferentes entalpias de formação dos respetivos óxidos ( $\Delta H_f^0 \text{SnO}_2 = -581 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta H_f^0 \text{TiO}_2 = -945 \text{ kJ/mol}$ ). Todos os parâmetros de deposição foram mantidos constantes, à exceção da pressão parcial de oxigénio, que apenas tinha influência na incorporação deste elemento para pressões parciais baixas, a partir das quais a concentração do elemento se mantinha constante. No caso do estanho e do titânio, a pressão para a qual a referida concentração foi atingida era próxima da necessária para a estequiometria de SnO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub>; no caso da prata esse equilíbrio foi atingido quando o quociente da concentração atômica do oxigénio sobre a prata era próxima de 0,3, logo inferior à estequiometria do Ag<sub>2</sub>O<sup>[162]</sup>. Este estudo demonstrou a dificuldade da formação do óxido de prata, em pulverização catódica, mesmo quando os parâmetros utilizados poderiam forçar a sua formação.

Outros autores também recorreram à codeposição de prata e sílica para produzir revestimentos nanoestruturados, onde a prata, de dimensões nanométricas, se encontrava dispersa numa matriz de sílica. Apesar de não fazerem referência à estequiometria da sílica, presume-se que tenha sido mantida, tal como se verificou no presente estudo, e

também à semelhança do que se pressupõe no presente estudo, não observaram a formação de óxidos de prata mas sim a de prata metálica <sup>[163]</sup>.

Ao contrário da deposição de sílica em modo reativo, onde se pode considerar que o oxigénio está homogeneamente distribuído no plasma, nas condições de deposição utilizadas neste estudo vai haver um gradiente de espécies químicas, em função da distância a cada alvo, de acordo com o anteriormente referido. Esta observação foi confirmada por outros autores que utilizaram propositadamente este tipo de abordagem na disposição de substratos para estudarem a influência da concentração, do formato e das dimensões da prata na matriz de sílica, e relacionar as variações induzidas com a absorção ótica <sup>[164]</sup>, pois as condições de deposição da prata pura influenciam a sua microestrutura, o que se reflete no seu espectro de absorção <sup>[165]</sup>.

No sistema sílica-ouro também se observou que não havia desvios significativos no rácio O/Si quando comparado com o do material cerâmico maciço, o que está de acordo com o trabalho descrito por outros autores <sup>[166,167]</sup>. De facto, enquanto a oxidação da prata durante a pulverização catódica é difícil, mesmo em condições de deposição favoráveis à sua formação, não há qualquer referência, na literatura consultada, à oxidação do ouro durante a sua deposição pelo mesmo processo <sup>[161]</sup>. No entanto, a deposição de filmes nanoestruturados de ouro numa matriz de sílica ou de titânia é um processo com interesse em diferentes áreas, tais como, a de modelar as propriedades óticas para utilização em sensores ou fibras óticas, bem como na produção de catalisadores mais eficientes <sup>[167,168]</sup>.

Para além da abordagem geral utilizada neste estudo, de fazer variar a distância relativa entre alvos e substratos, outros autores recorreram a abordagens distintas para codepositar sílica e metais. Uma das metodologias mais vezes descritas é a de colocar pastilhas do material metálico, por exemplo prata, sobre o alvo de sílica para obter diferentes concentrações <sup>[164]</sup>. Contudo, também não foram observados desvios significativos na estequiometria da sílica dos revestimentos.

Considerando apenas a estequiometria da composição química, os sistemas de sílica dopada com dois metais apresentam um comportamento que é o somatório da contribuição de cada sistema de sílica dopada apenas com um metal. Com efeito, para as concentrações mais baixas dos elementos metálicos, até um somatório de 30% at., a estequiometria da sílica mantém-se constante.

**Tabela 3.2** – Designação e composição química dos filmes finos de sílica dopados com dois metais.

Designação	Composição química (%at.)				
	O	Si	Cu	Ag	Au
SiAgAu1	65,8	32,0	---	0,5	1,7
SiAgAu2	64,3	30,9	---	0,4	4,4
SiAgAu3	63,4	30,7	---	3,0	2,9
SiAgAu4	53,4	25,8	---	9,6	11,2
SiAgAu5	43,4	20,2	---	16,9	19,5
SiAgAu6	11,8	3,1	---	7,3	77,8
SiAgAu7	10,9	3,0	---	16,5	69,6
SiAgAu8	8,8	2,5	---	10,8	77,9
SiAgAu9	7,6	1,6	---	7,2	83,6
SiAgAu10	4,7	0	---	16,7	78,6
SiCuAg1	66,3	32,0	1,0	0,7	---
SiCuAg2	63,8	30,6	2,5	3,1	---
SiCuAg3	58,7	28,8	5,2	7,3	---
SiCuAg4	52,1	19,1	11,0	17,8	---
SiCuAg5	30,4	2,5	51,0	16,1	---
SiCuAg6	20,1	1,0	60,4	18,5	---
SiCuAg7	14,8	3,1	27,6	54,5	---
SiCuAg8	16,4	0,2	32,2	51,2	---
SiCuAg9	10,4	1,3	13,1	75,2	---
SiCuAg10	10,3	0,3	14,8	74,6	---
SiCuAu1	64,7	29,7	3,0	---	2,6
SiCuAu2	60,7	29,8	4,1	---	5,4
SiCuAu3	56,7	27,0	7,6	---	8,7
SiCuAu4	49,4	19,7	14,2	---	16,8
SiCuAu5	19,9	1,7	36,8	---	41,6
SiCuAu6	12,9	0,6	67,2	---	19,3
SiCuAu7	10,5	0,9	41,6	---	47,0
SiCuAu8	5,6	0,4	14,5	---	79,5

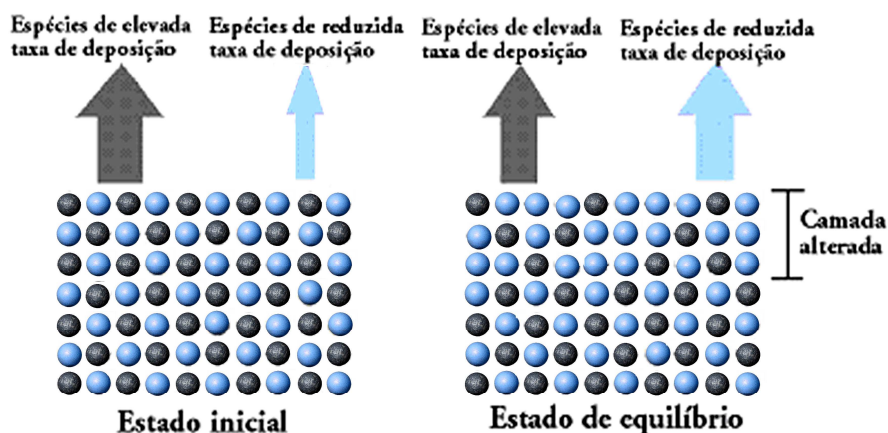
No sistema com prata e ouro, para concentrações de elementos metálicos superiores a 84% at., há mais oxigénio do que o necessário para formar  $\text{SiO}_2$ . Como observado anteriormente no caso da sílica dopada com ouro ou prata, nenhum dos dois elementos é propício à formação dos seus óxidos. No entanto, e apesar da oxidação da prata não ocorrer completamente mesmo nas condições mais favoráveis, é sempre possível

### Capítulo 3

a formação de uma pequena concentração do(s) seu(s) óxido(s) <sup>[162]</sup>. Alguns autores também constataram que em revestimentos de sílica e de óxido de molibdénio também há aprisionamento de átomos de oxigénio. Durante o processo de deposição, iões de oxigénio ( $O^-$ ) são ejetados do alvo e acelerados em direção ao substrato com energias proporcionais à diferença de potencial. Função da pressão utilizada estas espécies podem ser neutralizadas, por colisões no plasma, ou ficar fisicamente aprisionadas dentro do filme em crescimento devido à sua elevada energia cinética <sup>[154, 169,170]</sup>. Assim, é possível que o excesso de oxigénio, presente para as concentrações mais elevadas dos elementos metálicos, se deva a uma pequena percentagem de oxidação da prata, concomitantemente ou não, com o aprisionamento de oxigénio no interior do revestimento.

Nos sistemas SiCuAg e SiCuAu, o aumento da concentração de oxigénio relativamente à de silício é muito superior ao observado no sistema SiAgAu, o que pode ser devido a um processo semelhante ao analisado no sistema de sílica dopada apenas com cobre, isto é, devido à formação de óxidos de cobre. A distância do alvo de sílica ao substrato vai realçar a disparidade da distância média livre do silício em relação ao oxigénio, de onde resulta um gradiente de espécies químicas, nomeadamente um excesso de oxigénio em relação ao silício quando o substrato se encontra sobre o alvo metálico. Assim, apesar de haver a presença no plasma de átomos de outros elementos metálicos que não o cobre, este continua a apresentar a maior afinidade para com o oxigénio o que potencia a formação de CuO e Cu<sub>2</sub>O.

Na deposição de ligas metálicas é normal que a estequiometria do alvo se reflita no revestimento, independentemente dos vários elementos que constituem a liga apresentarem rendimentos de pulverização distintos. Os elementos com taxas de ejeção mais elevada vão ser os primeiros a ser ejetados do alvo, deixando uma área exposta com maior concentração dos elementos com taxa de ejeção mais reduzida. Estes vão em seguida ser preferencialmente ejetados devido à sua maior densidade superficial; estas etapas são repetidas o que se traduz, no final, num equilíbrio onde a composição química do alvo e revestimento são semelhantes (Fig. 3.1).



**Figura 3.1-** Esquema ilustrativo do estado de equilíbrio na deposição por pulverização catódica de ligas metálicas

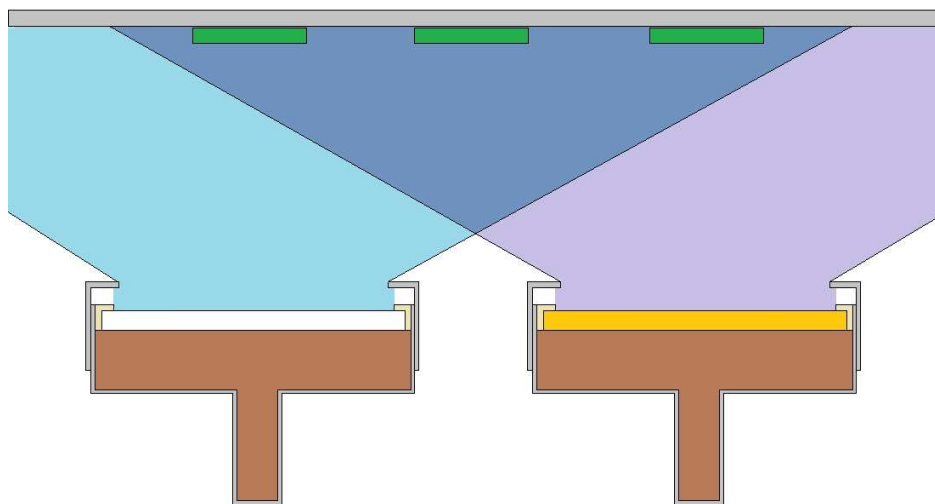
No caso dos sistemas de codeposição de sílica com cobre e ouro ou cobre e prata utilizados neste trabalho, não foram utilizadas ligas metálicas, mas sim alvos compostos. A base era um alvo metálico maciço, sobre o qual foram colocados triângulos, dispostos de forma simétrica, para que a área exposta de um em relação ao outro variasse de 25 a 75%. Devido à utilização desta configuração o que se vai refletir na composição química, para uma área de exposição fixa, são as diferenças na taxa de ejeção dos metais para cada densidade de potência utilizada.

Em síntese, e no que concerne a composição química, para os filmes finos de sílica codepositados com um ou dois metais foi possível obter revestimentos com estequiometria semelhante à da sílica maciça, desde que o teor do(s) elemento(s) metálico(s) seja inferior a, aproximadamente, 30% at.. Para concentrações superiores daqueles elementos, suspeita-se que o oxigênio fique aprisionado dentro do revestimento, devido ao próprio processo de deposição. Adicionalmente, nos casos em que há cobre, há fortes indícios de que ocorra a sua oxidação, concomitantemente com a do silício, o que explica a ocorrência de maiores desvios da relação O/Si em comparação com a sílica maciça. Contudo, nestes casos, também se suspeita que o efeito se deva não só a questões de equilíbrio termodinâmico, dentro dos limites permitidos pela pulverização catódica, mas também devido às condições utilizadas e à disposição dos substratos.

### 3.2 Morfologia/Topografia

A literatura indica a morfologia/topografia das superfícies como um dos parâmetros importantes quando se avalia a interação de biomateriais com células. Características como a presença ou ausência de porosidade e fissuras, associadas à dimensão da rugosidade superficial, se nano se micrométrica, podem revelar-se fulcrais no desempenho *in vitro* e *in vivo*.

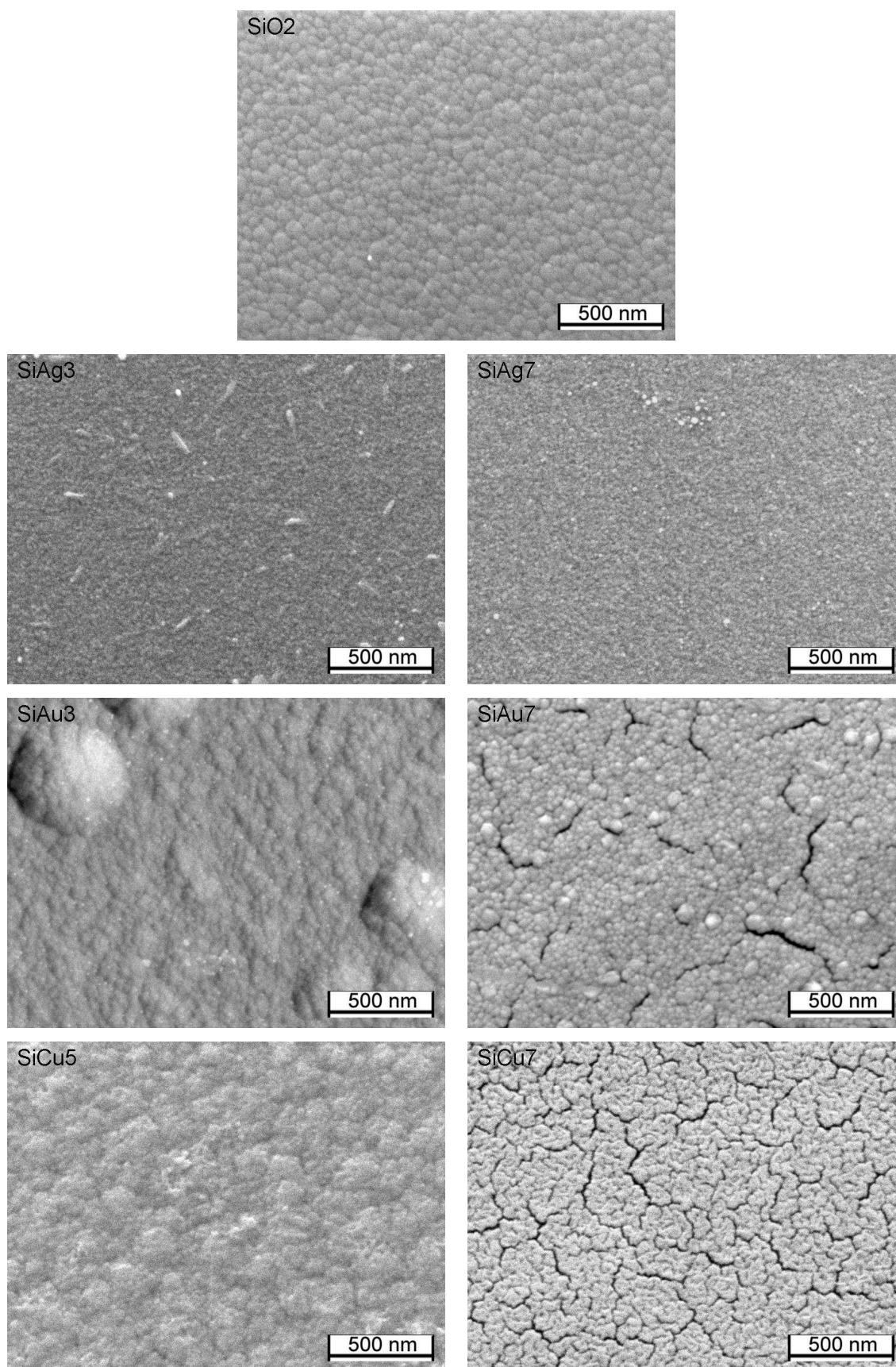
Alguns autores já avaliaram, noutro tipo de revestimentos, qual a influência da posição e orientação dos substratos relativamente aos alvos. Ao disporem as amostras com uma geometria radial em relação ao centro do alvo, observaram que a posição diretamente sobre o centro do alvo, sobre a zona de erosão preferencial, ou em posições mais afastadas deu origem a revestimentos distintos, não só a nível de composição química, mas também de morfologia<sup>[171]</sup>. No presente estudo, e apesar dos substratos estarem colocados com uma geometria paralela entre si, só em duas das posições é que os substratos estão perpendiculares em relação ao material ejetado do(s) alvo(s), ou seja quando os substratos estão diretamente sobre cada um dos cátodos. Para as restantes situação, virtualmente, é como se a amostra estivesse inclinada em relação a pelo menos um dos alvos (Fig. 3.2). Alguns autores<sup>[172]</sup> estudaram qual a variação da rugosidade, estrutura e morfologia que pode resultar de variar o ângulo de uma amostra em relação ao substrato. Com efeito, e para filmes de óxido de zinco dopado com alumínio, mantendo todos os parâmetros de deposição constantes, a inclinação levou à alteração da rugosidade média de 25 para 60 nm e da espessura de 1,4 para 1,9  $\mu\text{m}$ , com o máximo registado para inclinações de 30°, e o mínimo para os valores de 0° e 60°. A morfologia de topo não variou muito com o ângulo, consistindo numa superfície homogénea onde são observados os topos de colunas enquanto a da secção transversal demonstrava um crescimento colunar com porosidade. A inclinação das colunas variou ligeiramente com a inclinação dos substratos, mas a porosidade, principalmente na zona da interface, diminuía com o aumento do grau da inclinação, atingindo o máximo de compacidade a 30°, diminuindo para valores superiores.



**Figura 3.2-** Esquema ilustrativo da distribuição das espécies ejetadas a partir de dois alvos.

A morfologia superficial dos filmes finos de sílica, com e sem codeposição de um elemento metálico (Fig. 3.3), não evidenciou, de um modo geral, grandes alterações com a incorporação do metal. De acordo com o já referido, os filmes com menor teor do elemento metálico correspondem aos posicionados mais diretamente sobre o alvo de sílica, e os de teor superior sobre o alvo metálico. Apesar de a densidade de deposição do alvo de sílica ter sido mantida constante e a dos alvos metálicos ter variado, a aparente inclinação dos substratos em relação ao material pulverizado não produziu alterações significativas na morfologia superficial não obstante ter originado composições químicas distintas.

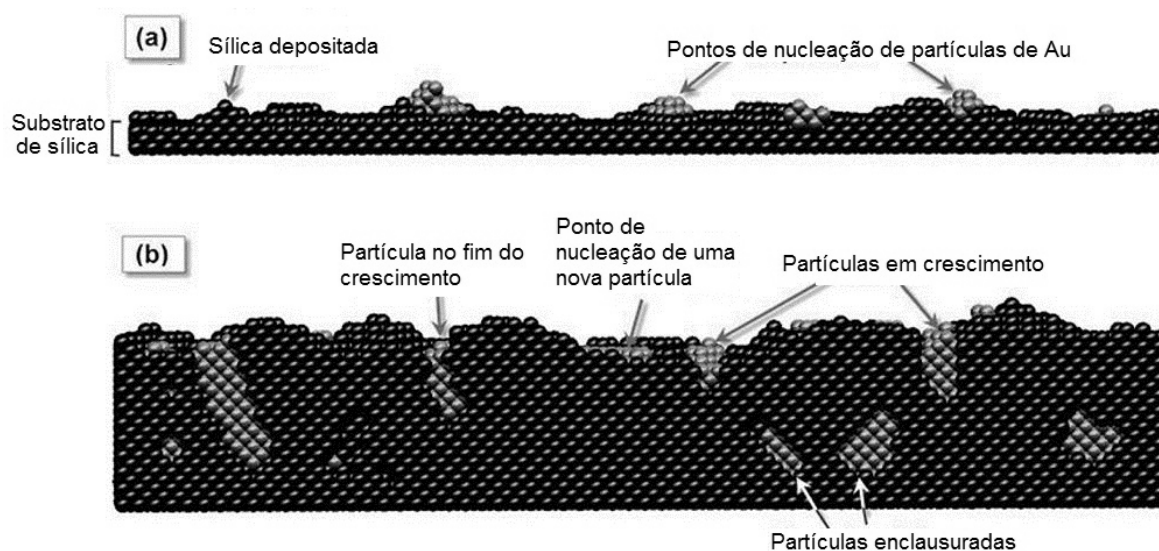
No entanto, e para os teores mais baixos de ouro, é visível que, em relação ao filme fino cerâmico, os contornos das partículas são menos nítidos. Uma vez que o ouro não reage com o oxigênio nem com o silício, é possível que os seus adátomos procurem ligar-se apenas entre si, e assim preencher os interstícios das partículas.



**Figura 3.3-** Micrografias representativas da superfície dos filmes finos de sílica com e sem dopagem com um metal.

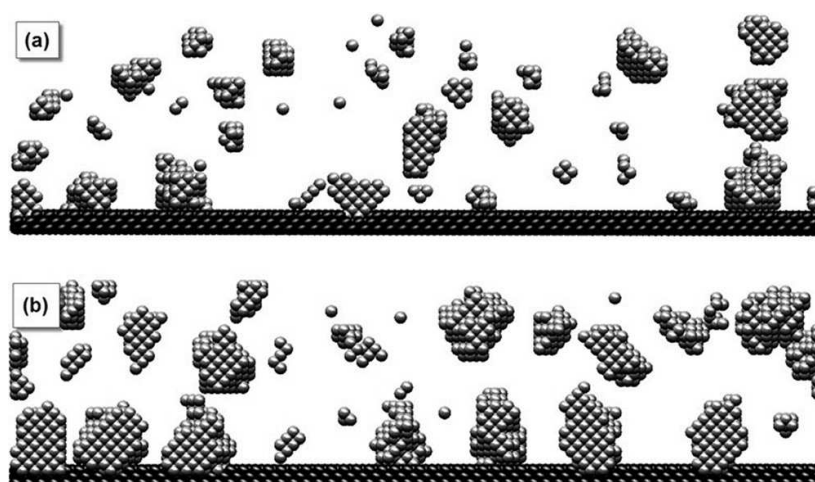


De facto, alguns autores determinaram qual a energia de ligação entre o ouro e a sílica, e estimaram que era cerca de quatro vezes inferior à energia de ligação entre dois átomos de ouro. Com efeito, o ouro, por possuir uma energia de superfície superior à da sílica, não molha a superfície do cerâmico. De acordo com as simulações propostas por modelos matemáticos, quando se considera que as espécies que chegam ao substrato possuem pouca energia, a nucleação e o crescimento do elemento metálico ocorrem de acordo com o esquematizado na figura 3.3. A nucleação de pequenas ilhotas de ouro obriga a que os adátomos das espécies ejetadas do alvo de sílica, ao chegarem ao substrato, se situem na periferia dos agregados metálicos o que induz um crescimento colunar (Fig. 3.4.)<sup>[173, 174]</sup>.



**Figura 3.4-** Estágios diferentes no crescimento do revestimento de sílica e ouro: a) no estágio inicial há diversos pontos de nucleação; b) num estágio mais tardio, algumas das partículas já finalizaram o seu crescimento, enquanto ocorrem novas nucleações <sup>[adaptado de 173]</sup>.

Se as espécies ejetadas tiverem bastante energia quando chegam ao substrato, o que se traduz numa maior mobilidade dos adátomos, as condições são as ideais para que o ouro minimize a sua energia livre de superfície, o que permite uma geometria mais esférica e menos colunar. De acordo com os modelos matemáticos já citados, o aumento da concentração de ouro traduz-se no aumento da dimensão dos agregados (Fig.3.5).



**Figura 3.5-** Simulação da estrutura final dos revestimentos resultantes da codeposição de sílica e ouro para: a) 5% at. de ouro; b) 10% at. de ouro (apenas está representada a fração correspondente ao ouro)<sup>[adaptado de 173]</sup>.

Assim, a morfologia dos revestimentos vai depender da energia com que as espécies chegam ao alvo, o que se irá refletir predominantemente na secção transversal, mas não tanto na observação superficial onde apenas se espera um aumento da dimensão dos agregados de ouro. Com efeito, nas micrografias de SEM os pontos mais claros, correspondentes ao ouro, aumentam de dimensão com o aumento da concentração de elemento químico, tal como seria de esperar.

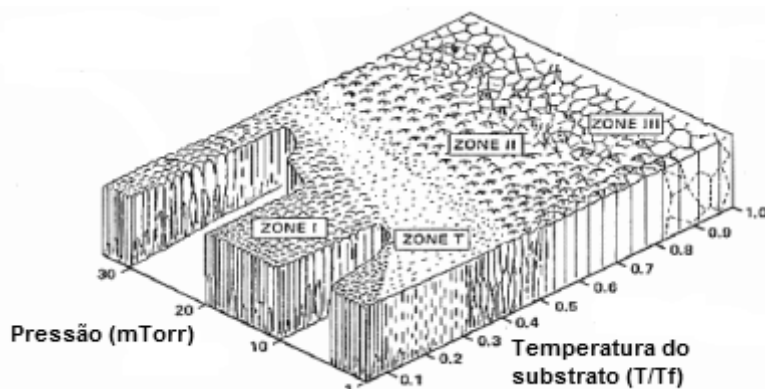
Ao contrário do ouro, a prata tem algum potencial para oxidar, apesar da ligação Si-O ser termodinamicamente mais favorável, como observado anteriormente. Porém, apesar desse potencial, o que se verifica é que o sistema se comporta de forma semelhante ao ouro, onde o tamanho de partícula aumenta com o aumento da concentração da prata.

O cobre, tal como a prata, reage com o oxigénio mas em concentrações superiores, como verificado na composição química. Na vista de topo os 3 sistemas assumem um comportamento semelhante, onde as partículas aumentam de dimensão com o aumento da concentração do elemento metálico. De facto, a literatura refere que, há semelhança do ouro, a adesão do cobre à sílica é reduzida essencialmente devido à difícil molhabilidade entre os dois materiais<sup>[165, 168, 175, 176]</sup>, pelo que a morfologia de filmes finos do sistema SiCu, mas depositados por outros autores é semelhante à observada neste trabalho<sup>[177]</sup>.

O facto de a tensão de superfície dos metais estudados neste trabalho ser bastante diferente entre si, com o cobre e o ouro a apresentarem valores mais elevados que a prata

( $\text{Cu}=1355 \text{ mJ.m}^{-2}$ ,  $\text{Au}=1138 \text{ mJ.m}^{-2}$  e  $\text{Ag}=910 \text{ mJ.m}^{-2}$ )<sup>[178]</sup>, pode ser um dos fatores responsáveis pela morfologia superficial dos filmes finos do sistema SiAg e SiCu, para os teores mais elevados dos materiais metálicos. Com efeito, a ausência de molhabilidade entre os materiais metálicos, Cu e Au, e a sílica, cuja tensão superficial é de cerca de  $73 \text{ mJ.m}^{-2}$  <sup>[179]</sup>, implica que as forças coesivas para o mesmo material se sobrepõem às forças adesivas entre materiais díspares o que, para teores elevados dos metais, induz a “segregação” da fase metálica relativamente à cerâmica resultando no aparecimento de fissuras perfeitamente visíveis na morfologia superficial e que ocorrem em maior densidade no sistema SiCu, dado que é o metal com maior tensão superficial.

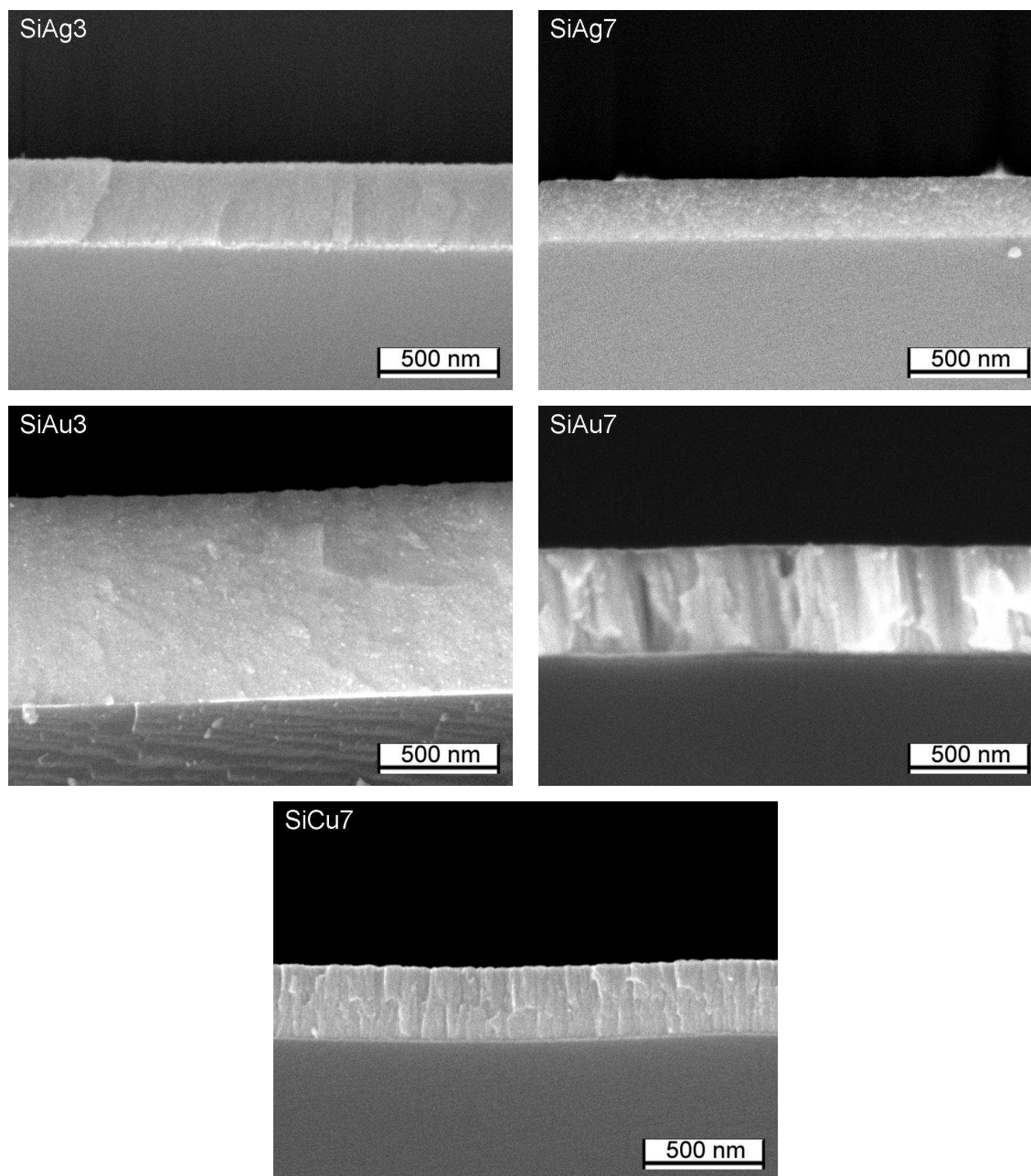
Quando o estudo incide sobre o modo como evoluem os revestimentos durante a deposição, o diagrama de Thornton (Fig.3.6), publicado em 1974 e que permite identificar o tipo de crescimento em função da pressão e temperatura do substrato, ainda é usado como base para identificar o tipo de crescimento dos revestimentos, sobretudo pela análise da morfologia da secção transversal.



**Figura 3.6-** Diagrama de Thornton. Zona 1: Estrutura porosa constituída por cristalitas alongadas separadas por espaços vazios. Zona T: Estrutura de transição constituída por grãos fibrosos densamente empilhados. Zona 2: Constituída por grãos colunares. Zona 3: Estrutura constituída por grãos recristalizados <sup>[adaptado de</sup>

180]

Nos filmes finos de sílica com baixas concentrações de prata, ouro ou cobre, a secção transversal dos revestimentos (Fig. 3.7) revela uma morfologia do tipo T de acordo com o diagrama de Thornton. Contudo, nos revestimentos com concentrações mais elevadas de ouro e cobre, a estrutura é do tipo colunar.



**Figura 3.7** - Micrografias representativas da morfologia da secção transversal dos filmes finos de sílica dopados com um metal.

No sistema de sílica com prata pode haver uma pequena competição entre os átomos de silício e prata por criarem uma ligação com o oxigénio, como alguns autores presenciaram ao depositar prata com oxigénio em modo reativo <sup>[161]</sup>, o que pode dar

origem a uma maior densidade de nucleação, o que normalmente implica uma maior uniformidade na morfologia tanto transversal como superficial.

No caso do sistema com ouro, e tal como descrito anteriormente, este metal não é miscível na sílica e em determinadas condições poderá ficar sob a forma de pequenas esferas embebidas na matriz do cerâmico, o que parece ocorrer para as menores concentrações dos filmes finos depositados neste trabalho. Contudo, quando a concentração de ouro é maior, o crescimento do filme dá origem a uma morfologia do tipo colunar. Este facto pode ser consequência da falta de molhabilidade entre os dois materiais de acordo com o anteriormente referido. Com efeito, a diferença de tensão superficial ao potenciar a força coesiva entre átomos do mesmo material impede a normal coalescência que ocorre durante o crescimento de aglomerados num processo de pulverização catódica. Alguns autores também constataram que quando colocavam os substratos inclinados em relação ao alvo tal disposição induzia alterações na morfologia que passava a ser do tipo colunar, inclusive apresentando alguma inclinação das colunas, bem como variação na dimensão e frequência da porosidade<sup>[172]</sup>. No presente trabalho, e devido à disposição dos substratos em relação aos alvos, esta inclinação é mimetizada, pelo que é possível que a morfologia colunar também se deva a este efeito. Para além do crescimento ser colunar, também é visível alguma porosidade contínua ao longo da espessura do filme, sobretudo na secção do filme SiAu7, o que indica que as fissuras que se observaram na morfologia superficial ocorrem ao longo da espessura do filme fino, o que inviabiliza os revestimentos com teores elevados de cobre e ouro para a aplicação pretendida neste trabalho.

Os filmes finos de sílica dopada com cobre têm um comportamento diferente do dos restantes. Apesar das entalpias de formação da sílica e do óxido de cobre serem distintas, o que se observou no estudo da composição química é que o cobre vai muito provavelmente sofrer oxidação, e o óxido, caso se forme, poderá não apresentar ordem estrutural pois, à semelhança dos filmes finos de sílica, mesmo os com maior concentração de cobre são transparentes. Assim, o crescimento do revestimento dá-se de forma quase homogénea, onde, aparentemente, não há prioridade na formação do óxido de cobre ou óxido de silício. Contudo, tanto em vista de topo como em secção transversal, este sistema tem mais semelhanças com o SiAu, do que com o SiAg. De facto, como referido anteriormente, o cobre apresenta forças adesivas muito reduzidas em relação à sílica, mas não se encontrou qualquer referência, na literatura consultada, desta relação no concerne o sistema óxido de cobre e sílica. Contudo, devido às semelhanças entre SiCu e SiAu, surge a hipótese de não só o cobre mas também os seus óxidos serem imiscíveis na sílica.

### Capítulo 3

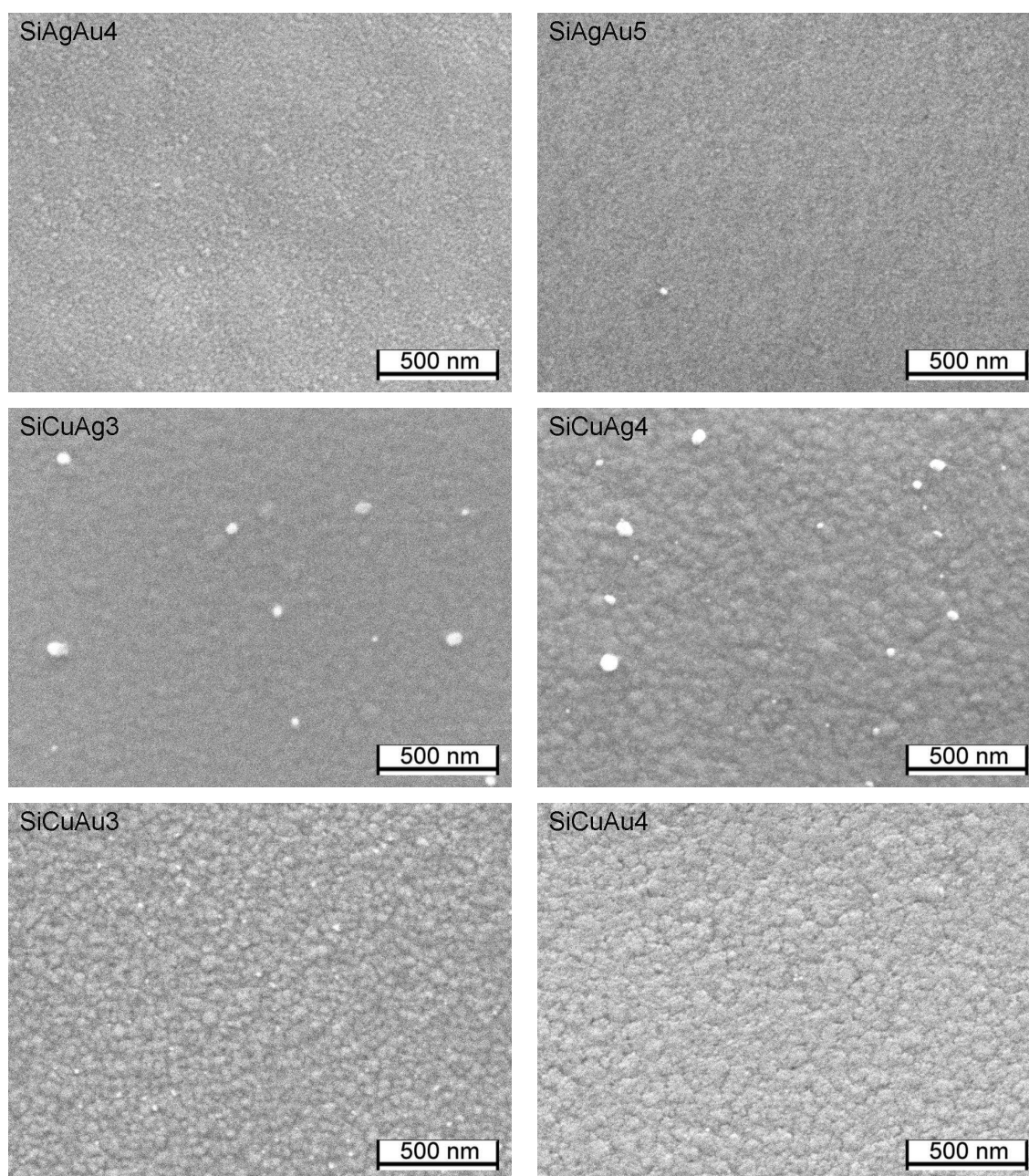
Acresce o facto de que, para todos os sistemas, tem que ser considerado que quando a energia de interação entre os átomos do filme (coesão) é substancialmente superior à energia de interação entre os átomos do filme fino e do substrato (adesão), o revestimento cresce por camadas, isto é, uma nova camada de revestimento só se começa a depositar depois da anterior estar completamente formada, o que origina morfologias do tipo T ou secções transversais sem morfologia aparente (“*featureless*”). Quando a energia adesiva for superior à coesiva então o filme cresce segundo “ilhas”<sup>[181]</sup> o que parece acontecer para os filmes finos dopados com ouro ou cobre sobretudo para os teores mais elevados destes elementos.

As superfícies da sílica dopada com dois metais (Fig. 3.8) apresentam elementos superficiais com contornos esféricos, à semelhança dos sistemas da sílica dopada apenas com um metal.

As superfícies do sistema SiAgAu aparentam ser muito homogéneas, com partículas da ordem de alguns nanómetros. De facto, o ouro e a prata apresentam solubilidade total, o que pode indiciar um comportamento semelhante ao observado quando da deposição do sistema SiAg. Acresce o facto de, devido à diferença de massas atómicas, a energia com que os adátomos de ouro e de prata chegam ao substrato seja diferente, o que pode implicar uma maior densidade de nucleação do que a observada apenas para o sistema SiAg o que normalmente é indutor de morfologias superficiais mais homogéneas.

Nas amostras de sílica dopada com cobre e prata há a presença de umas zonas mais claras do que as restantes, que podem corresponder à oxidação dos elementos metálicos<sup>[182]</sup>. Neste sistema, ambos os elementos são propensos à oxidação, apesar de apenas o cobre ter, termodinamicamente, uma maior tendência para reagir com o oxigénio durante a codeposição com a sílica. Se for considerado que ambos os elementos metálicos apresentam solubilidade reduzida um em relação ao outro, então pode inferir-se que a matriz seja semelhante à dos revestimentos de cobre com sílica, mas com partículas de prata dispersas, à semelhança dos revestimentos SiAg.

O ouro e o cobre, apesar de apresentarem solubilidade total para temperaturas superiores a 970°C, o respetivo diagrama de equilíbrio apresenta a possibilidade da formação de três compostos distintos, CuAu<sub>3</sub>, CuAu e Cu<sub>3</sub>Au. Isto significa que as concentrações relativas de cobre e de ouro vão ditar se o revestimento apresenta uma morfologia semelhante à do sistema SiAgAu ou à do sistema SiCuAg.

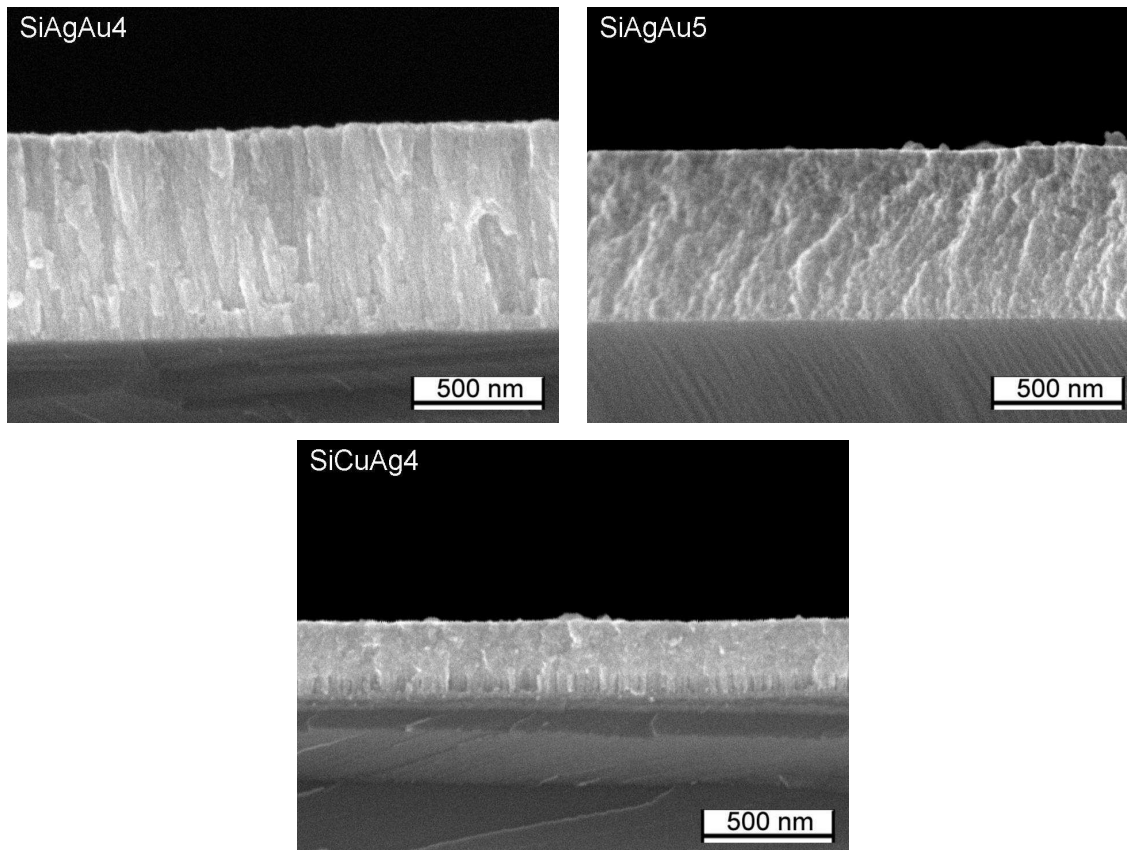


**Figura 3.8-** Micrografias representativas da morfologia da superfície dos filmes finos de sílica dopada com dois metais.

Apesar de, no sistema SiAgAu, não haver diferenças relevantes na morfologia superficial para as diferentes concentrações de ouro e prata, a sua secção transversal é distinta, (Fig.3.9) com a morfologia alternando entre colunar e tipo T de acordo com o diagrama de Thornton. No caso do revestimento SiAgAu5 há um crescimento que induz a

### Capítulo 3

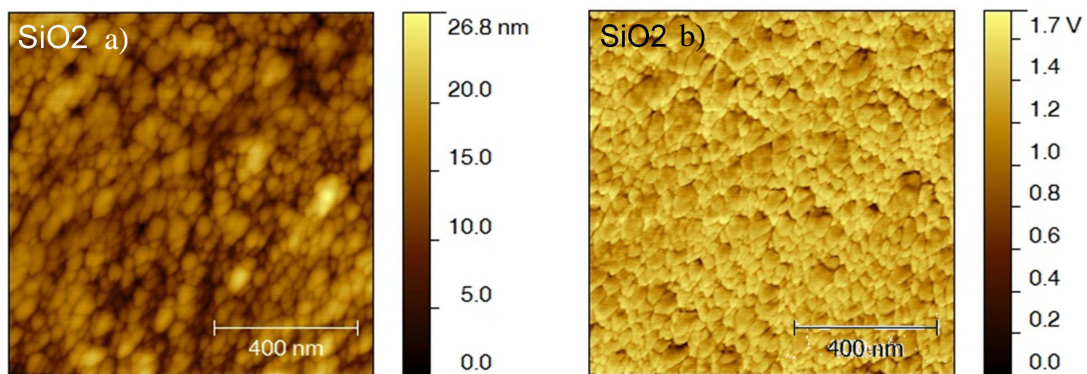
inclinação das colunas e que resulta do posicionamento dos substratos em relação aos alvos, o que, tal como referido anteriormente, mimetiza a inclinação dos substratos e que, tal como outros autores observaram, leva ao desenvolvimento deste tipo de morfologia<sup>[172]</sup>.



**Figura 3.9** - Micrografias representativas da morfologia da secção transversal dos filmes finos de sílica dopada com dois metais.

Quando o objetivo é o desenvolvimento de superfícies para estarem em contacto com material biótico, os parâmetros de rugosidade assumem uma importância semelhante à da composição química ou à da molhabilidade do material. Assim, e com o intuito de avaliar as diferentes topografias superficiais, os filmes finos foram caracterizados por microscopia de força atómica. Os filmes finos de sílica apresentam uma rugosidade média superficial ( $S_a$ ) de 2,6 nm, e o tamanho médio das partículas é de cerca de 25 nm de diâmetro (Fig. 3.10).



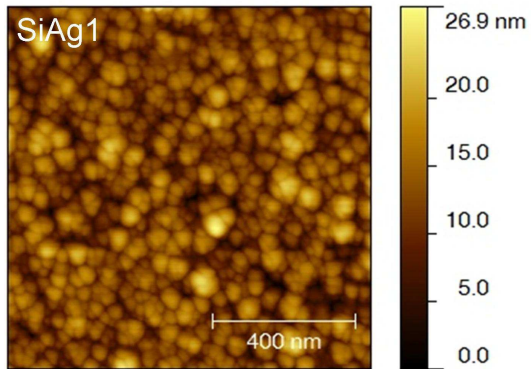


**Figura 3.10** - Imagens por microscopia de força atômica da superfície dos filmes de sílica: a) topografia; b) fase.

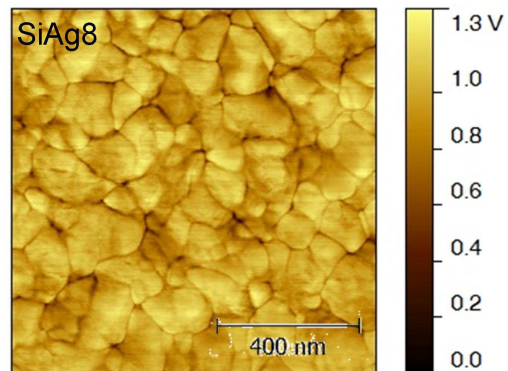
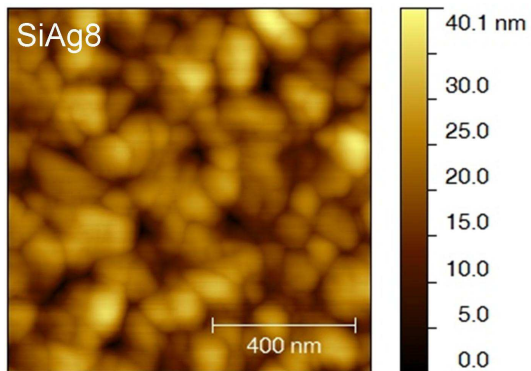
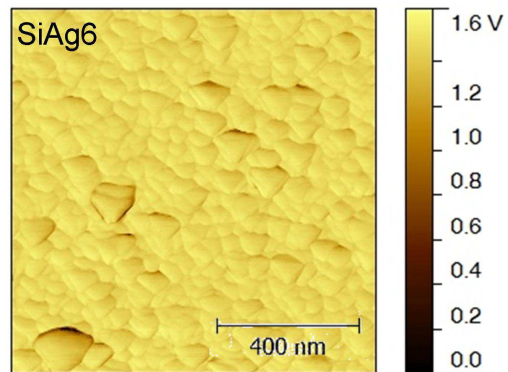
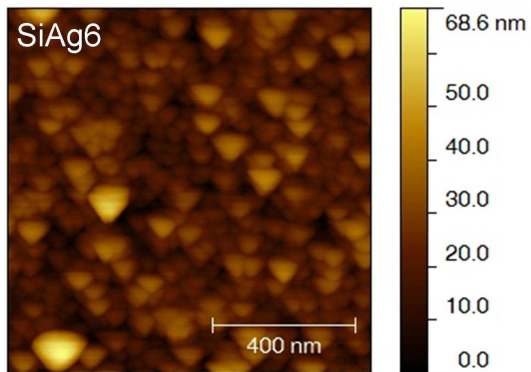
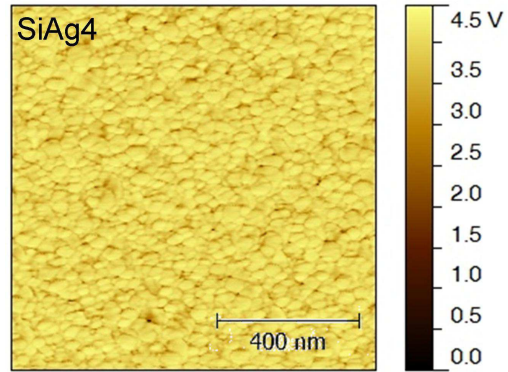
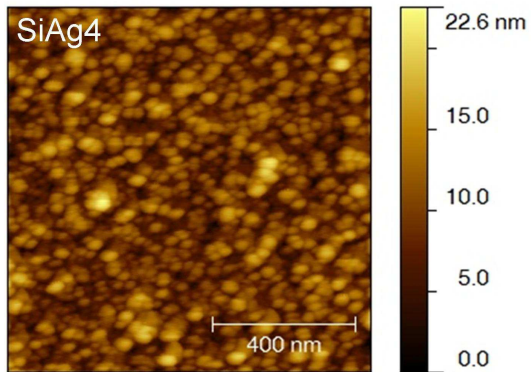
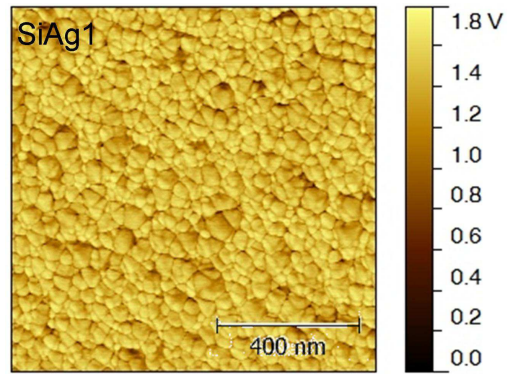
No caso das amostras de sílica dopada com um metal, e exemplificado em pormenor para o caso da prata (Fig. 3.11), é visível que o aumento da concentração dos elementos metálicos induz o aumento do tamanho de partícula. Quando a presença dos elementos metálicos no filme de sílica é em baixa concentração, o tamanho de partícula e a rugosidade média não se alteram significativamente em relação à caracterizada para o filme fino cerâmico. Contudo, para uma mesma concentração, o facto de se tratar de cobre, ouro, prata ou a mistura de dois metais altera essas dimensões (Fig. 3.12). Como para todos os filmes finos desenvolvidos o tamanho de partícula é sempre inferior a 100 nm os revestimentos podem ser classificados como nanocompósitos.

No entanto, e mais importante do que a análise das imagens de AFM, que apenas confirmam o anteriormente constatado pela caracterização em SEM, importa avaliar as características da rugosidade superficial. Assim foram analisados os parâmetros de rugosidade e os resultados estão sumariados na Tabela 3.7. Os parâmetros avaliados foram:  $S_a$ , a rugosidade média calculada pela média aritmética do desvio da altura da superfície relativamente ao valor médio e  $S_{ms}$ , valor médio quadrático do desvio relativamente ao valor médio. Quando existe uma distribuição gaussiana dos parâmetros de rugosidade, ou seja, quando a relação  $S_{ms}/S_a$  se encontra entre 1,20 e 1,30 é possível também efetuar uma análise recorrendo aos parâmetros adimensionais de assimetria (*skew*) e curtose (*kurtosis*) em que o primeiro avalia a simetria da superfície em relação ao plano médio e o segundo a “suavidade” da superfície<sup>[183]</sup>.

a)

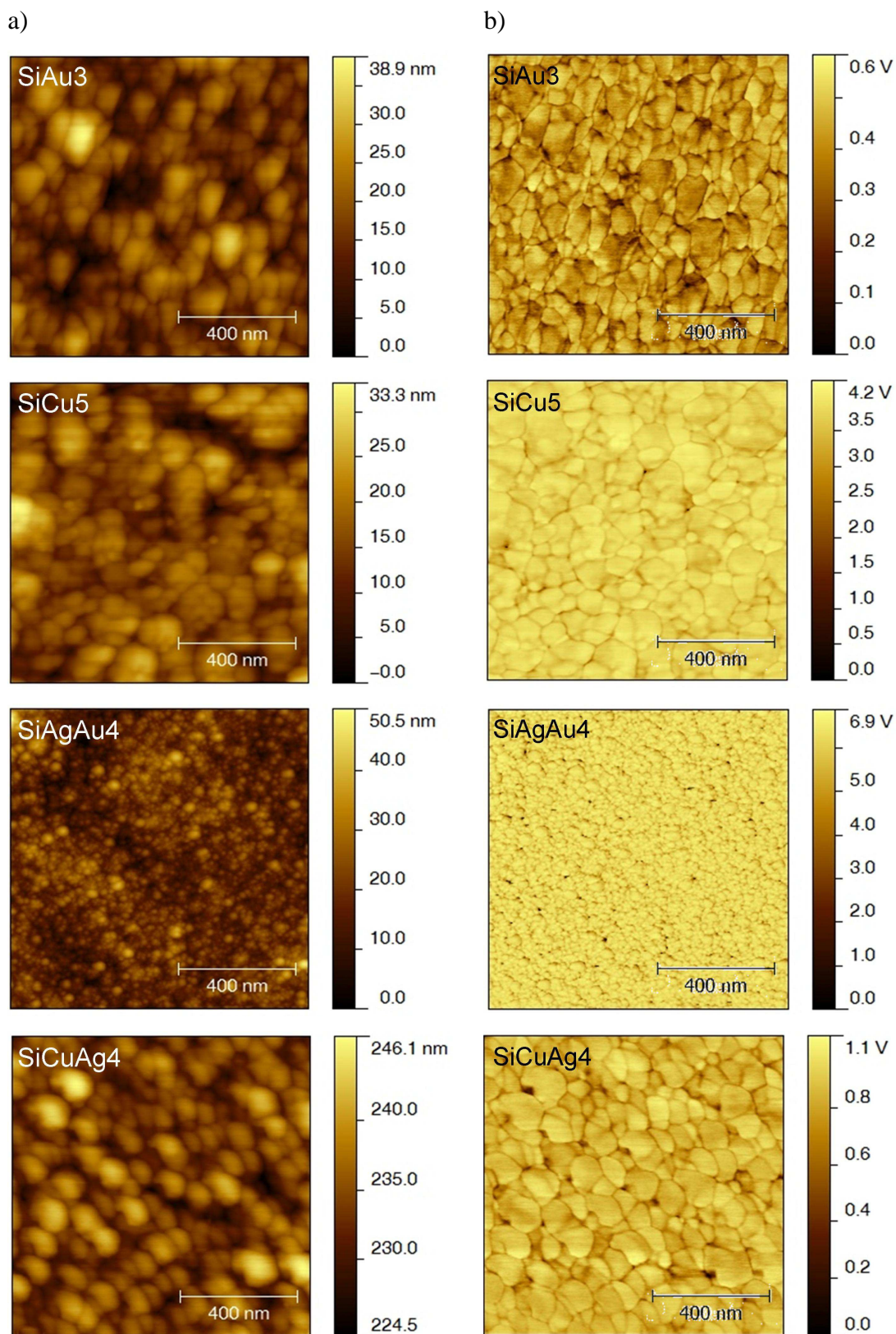


b)



**Figura 3.11** - Imagens por microscopia de força atômica da superfície dos filmes de sílica codepositados com prata: a) topografia; b) fase.





**Figura 3.12** - Imagens por microscopia de força atômica da superfície dos filmes de sílica codepositados com Au, Cu, AgAu e CuAg: a) topografia; b) fase.

**Tabela 3.3** - Rugosidade média de superfície (Sa), Rugosidade média quadrática da superfície (Sms), *skew*, *kurtosis* e área real da superfície (ARS) dos revestimentos de sílica codepositada com um metal.

	Parâmetros de rugosidade				ARS( $\mu\text{m}^2$ )	Sms/Sa
	Sa (nm)	Sms(nm)	<i>skew</i>	<i>kurtosis</i>		
SiO <sub>2</sub>	2,6	3,2	-0,1	-0,0	1,0	1,2
SiAg1	8,8	10,56	0,1	-0,7	1,1	1,2
SiAg2	14,0	17,0	0,2	-0,5	1,2	1,2
SiAg3	37,8	43,9	0,1	-1,1	1,1	1,2
SiAg4	5,9	6,9	0,0	-0,8	1,1	1,2
SiAg5	12,6	14,7	-0,1	-1,1	1,0	1,2
SiAg6	11,2	14,3	0,7	1,0	1,1	1,3
SiAg7	19,6	24,8	0,1	0,3	1,4	1,3
SiAg8	18,6	22,0	0,0	-0,9	1,0	1,2
SiAu1	3,7	4,6	0,2	-0,1	1,0	1,2
SiAu2	3,5	4,5	0,6	0,3	1,0	1,3
SiAu3	4,1	5,3	0,3	0,7	1,0	1,3
SiAu4	3,6	4,5	0,5	0,3	1,0	1,3
SiAu5	2,9	3,6	0,3	0,1	1,0	1,3
SiAu6	5,1	6,6	0,1	0,3	1,0	1,3
SiAu8	2,5	3,2	0,1	-0,0	1,0	1,3
SiCu1	2,9	3,6	0,3	-0,2	1,0	1,2
SiCu2	2,6	4,5	3,0	10,1	1,0	1,7
SiCu4	2,9	3,8	0,9	2,9	1,0	1,3
SiCu5	3,4	4,4	-0,0	0,6	1,0	1,3
SiCu6	3,2	4,0	0,1	0,1	1,0	1,3
SiCu7	2,3	2,9	0,4	0,3	1,0	1,3

O valor da rugosidade média da superfície dos filmes finos de sílica codepositados com prata e ouro são muito semelhantes aos do filme fino cerâmico. Com efeito, considerando este parâmetro de rugosidade apenas a prata induz o aumento dos valores de rugosidade média, que, no entanto, se mantêm sempre inferiores a 20 nm.

O parâmetro adimensional *skew* pode apresentar valores positivos ou negativos indicando predominância de picos ou de vales, respetivamente. Para as superfícies estudadas quase todas apresentam valores de *skew* positivos o que indica a predominância de picos sobre vales. No entanto, salvo algumas exceções, tanto os valores positivos como negativos são muito próximos de zero o que indica que efetivamente há uma uniformidade na distribuição de picos e vales, com ligeira predominância ora de uns ora de outros. A exceção é a superfície designada por SiCu2 que apresenta o valor de 3,04; contudo é necessário ter em consideração que esta superfície apresenta um valor da relação Sms/Sa

bastante díspar do que é considerado normal para que a análise dos parâmetros adimensionais possa ser efetuada. O valor de *kurtosis* é sempre inferior a 3, o que implica que o perfil de vales e picos é arredondado e não constituído por escarpas que terminam com perfil aguçado.

Os revestimentos de sílica codepositados com dois metais (tabela 3.4) tem uma rugosidade média de superfície na mesma ordem de grandeza dos dopados com ouro ou cobre.

**Tabela 3.4** – Rugosidade média de superfície (*Sa*), Rugosidade média quadrática da superfície (*Sms*), *skew*, *kurtosis* e área real da superfície (*ARS*) dos revestimentos de sílica codepositados com dois metais.

	Parâmetros de rugosidade				ARS( $\mu\text{m}^2$ )	Sms/Sa
	Sa (nm)	Sms(nm)	<i>skew</i>	<i>kurtosis</i>		
SiAgAu1	3,6	4,6	0,6	0,5	1,0	1,3
SiAgAu2	3,7	4,7	-0,1	0,1	1,0	1,3
SiAgAu4	4,3	5,5	0,4	0,7	1,2	1,3
SiAgAu5	6,8	9,6	2,1	5,0	1,2	1,4
SiCuAg1	2,9	3,8	0,0	0,6	1,0	1,3
SiCuAg2	6,8	8,6	0,5	0,5	1,1	1,3
SiCuAg3	3,4	4,2	0,4	0,0	1,0	1,2
SiCuAg4	2,5	3,1	0,4	0,4	1,0	1,3
SiCuAg5	1,5	1,9	0,3	0,4	1,0	1,3
SiCuAg7	1,7	2,3	1,1	3,0	1,0	1,4
SiCuAg9	3,8	4,9	0,3	0,7	1,2	1,3
SiCuAu1	2,2	2,8	0,5	0,7	1,0	1,3
SiCuAu2	2,6	3,5	1,1	3,0	1,0	1,3
SiCuAu3	2,0	2,6	0,5	0,4	1,0	1,3
SiCuAu4	3,3	4,2	0,1	0,0	1,0	1,3
SiCuAu5	0,4	0,6	4,1	68,1	1,0	1,4
SiCuAu6	3,1	3,9	-0,2	0,3	1,0	1,3
SiCuAu7	8,4	11,3	0,5	1,0	1,0	1,3
SiCuAu8	4,8	6,7	1,4	4,1	1,0	1,4

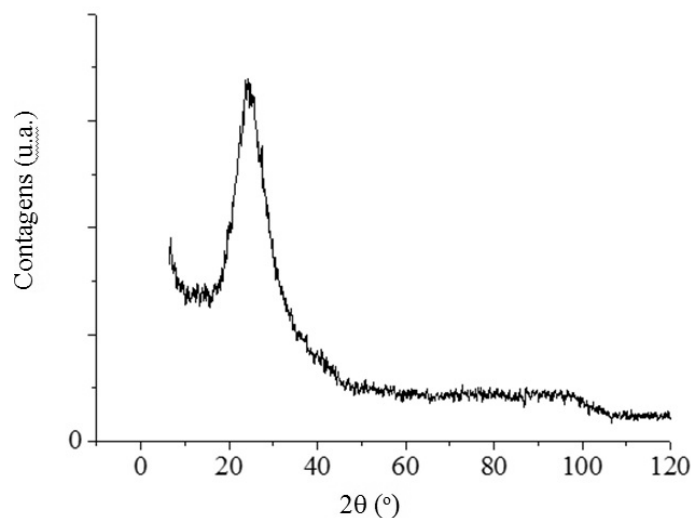
O facto de utilizar os dois metais parece não alterar significativamente a rugosidade da superfície em relação aos filmes codepositados apenas com um elemento metálico. No entanto, há um decréscimo nítido na rugosidade dos filmes em que um dos metais é prata quando comparados com os valores do sistema SiAg. Com efeito, parece que a presença de Au ou de Cu atenua a consequência da presença de Ag levando a uma homogeneização da superfície. Tal facto pode ser devido ao problema da falta de

molhabilidade entre a sílica e o ouro e o cobre. A presença destes dois elementos implica, provavelmente, uma maior densidade de nucleação, devido às diferenças de tensão superficial, que normalmente implica um maior nivelamento da superfície, ou seja, uma diminuição da sua rugosidade.

No caso destes sistemas os valores de *skew* são muito próximos de zero o que, há semelhança dos sistemas codepositados com um metal, implica uma distribuição homogênea de picos e vales. As exceções ocorrem para superfícies cujos valores da razão  $S_{ms}/S_a$  estão fora dos limites em que é aconselhado efetuar a análise dos parâmetros adimensionais de rugosidade. Também à semelhança dos valores apresentados na tabela 3.3 os valores de *kurtosis* indicam que o perfil da superfície se caracteriza por picos e vales arredondados.

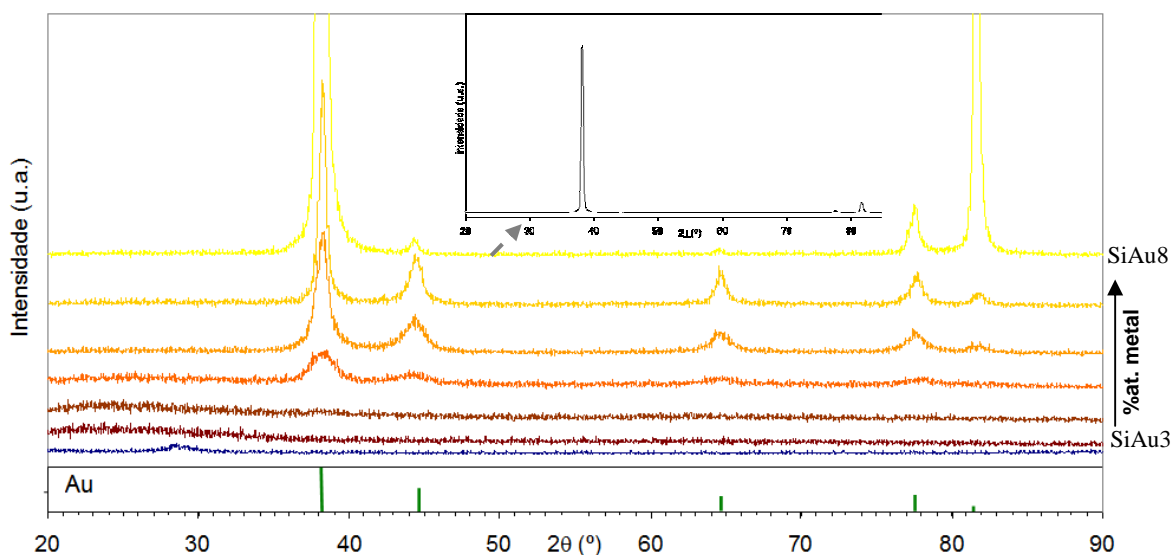
### 3.3 Estrutura

A sílica é um material amorfo e não apresenta picos de difração de raios X distintos, mas sim “bossas” largas tal como é visível no difratograma do alvo utilizado para as deposições efetuadas neste trabalho (Fig. 3.13).



**Figura 3.13** - Difratograma do alvo de sílica utilizado para a deposição dos filmes finos

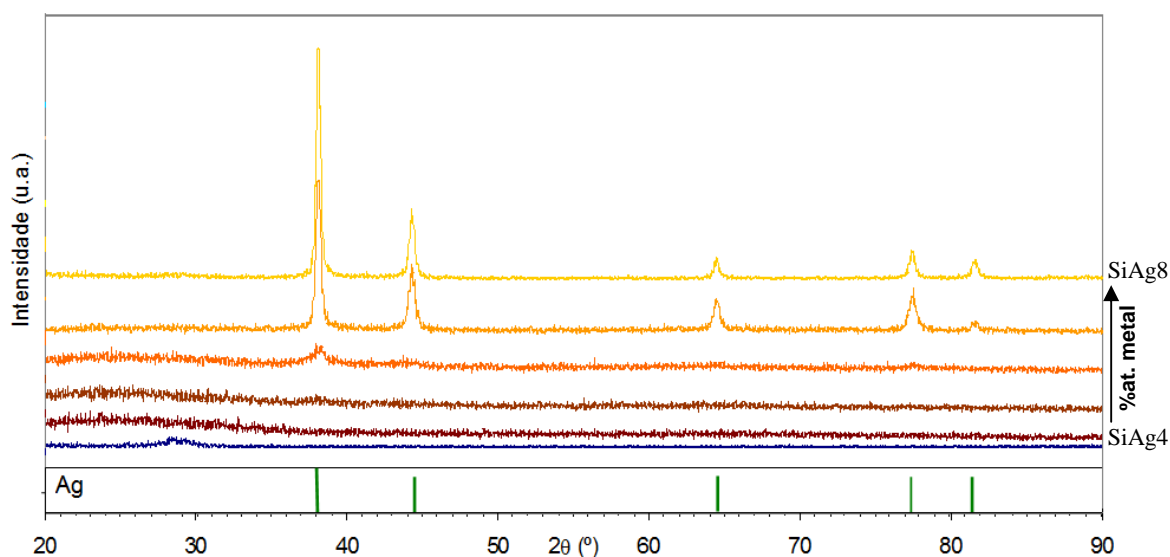
Nos filmes finos de sílica codepositados com um elemento metálico o comportamento, ao nível da evolução estrutural com teores crescentes do metal, é semelhante entre os três sistemas estudados. Com efeito, nas superfícies do sistema SiAu (Fig. 3.14) a “bossa” característica da sílica deixa de ser visível no difratograma das superfícies SiAu6 e SiAu7, pois a sua baixa concentração não permite a sua deteção. Já a presença de picos de difração correspondentes ao ouro são visíveis a partir do difratograma de SiAu4. No entanto, a largura a meia altura dos planos de difração indicam que os cristais que lhes origem deverão ter dimensões nanométricas. Para além desta característica é notório que a pulverização catódica induz orientação preferencial segundo o plano (111), sobretudo para os revestimentos com elevado teor de Au.



**Figura 3.14-** Difratogramas dos filmes finos de sílica sem (azul) e com codeposição de ouro (de SiAu3 a SiAu8).

A prata, de acordo com o referido nos subcapítulos anteriores, pode sofrer oxidação durante o processo de pulverização catódica, preferencialmente para formar  $\text{Ag}_2\text{O}$ . No entanto, nos difratogramas do sistema SiAg apenas são identificados planos de difração do elemento metálico (Fig. 3.15), que, à semelhança do sistema SiAu, também está orientada preferencialmente segundo o plano (111), embora não com a intensidade observada nos difratogramas do sistema SiAu. Considerando que a entalpia de formação de  $\text{Ag}_2\text{O}$  ( $-31,1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) é muito superior à de  $\text{SiO}_2$  ( $-910,86 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), tal significa que a

ligação do oxigénio ao silício é preferencial, pelo que a formação de  $\text{Ag}_2\text{O}$  pode não ser identificada devida a um ou à combinação de, essencialmente, dois fatores: falta de ordem estrutural do composto ou concentração em teores volumétricos inferiores a 5%. Assim, os únicos planos de difração observados correspondem a Ag e, também à semelhança do sistema anterior, a largura a meia altura dos picos de difração indicia a possibilidade de nanocrystalinidade. De facto, já foi observado que a codeposição de sílica com ouro e prata resulta em revestimentos onde os elementos metálicos, com dimensões nanométricas, estão embebidos numa matriz de sílica <sup>[166,184]</sup>.

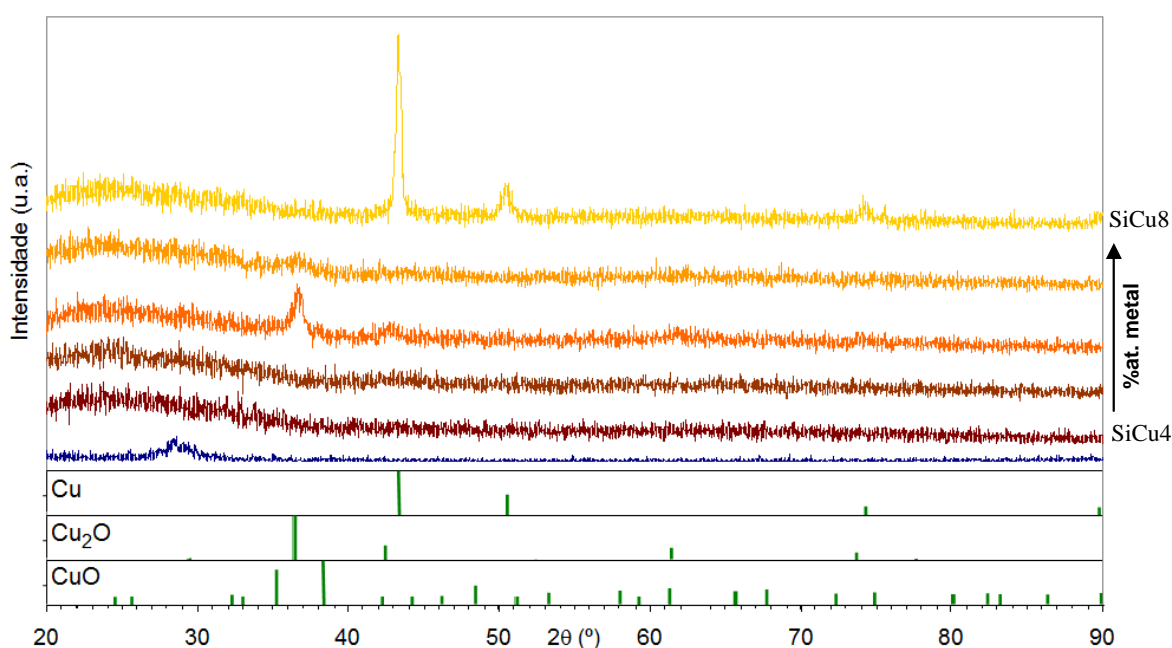


**Figura 3.15** - Difratogramas dos filmes finos de sílica sem (azul) e com codeposição de prata (de SiAg4 a SiAg8).

No sistema SiCu é necessário considerar que o cobre reage mais facilmente com o oxigénio, quando em comparação com os outros dois metais, podendo formar os compostos  $\text{CuO}$ ,  $\text{Cu}_4\text{O}_3$  ou  $\text{Cu}_2\text{O}$  <sup>[161]</sup>. De facto, as entalpias de formação dos óxidos de cobre mais comuns ( $\text{Cu}_2\text{O} = -166,7 \text{ kJ/mol}$ ,  $\text{CuO} = -155,2 \text{ kJ/mol}$ ) são mais negativas do que as dos óxidos de prata, mas ainda inferiores, em valor absoluto, aos da sílica. Para concentrações até 10% at. de cobre a relação entre O/Si é próxima de 2. Nesta concentração são perceptíveis (Fig. 3.16) picos de baixa intensidade, indexados como sendo de  $\text{Cu}_2\text{O}$  e Cu. Com o aumento da concentração de cobre o óxido do metal predomina, enquanto a relação entre O/Si sobe acima de 4, o que se justifica por o oxigénio se



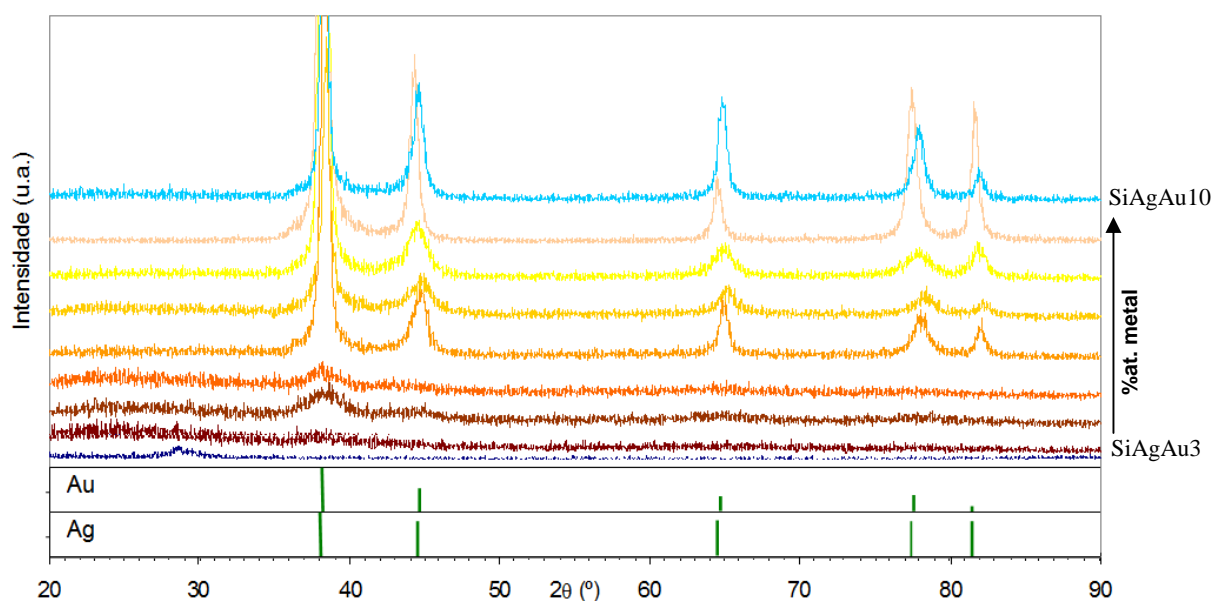
encontrar não só na sílica como no óxido de cobre. Quando a concentração de cobre é superior a 54% at., também não pode ser descartada a hipótese da presença de CuO. Após a desconvolução dos difratogramas o pico de difração correspondente a  $\text{Cu}_2\text{O}$  é assimétrico podendo ser devido à presença de CuO (*c.f.* Apêndices). No entanto, a baixa intensidade dos picos registados para este sistema, quando comparados com os restantes sistemas sílica-metal, pode ser explicada pelo facto de os óxidos de cobre não apresentarem ordem estrutural, de acordo com o observado por alguns autores<sup>[153, 154, 185]</sup> e reforçado pelo facto dos revestimentos serem ópticamente transparentes.



**Figura 3.16-** Difratogramas dos filmes finos de sílica sem (azul) e com codeposição de cobre (de SiCu4 a SiCu8).

Nos sistemas sílica codepositada com dois metais o comportamento dos sistemas é diferente entre si. De acordo com o diagrama de fases de Ag-Au ambos os elementos formam uma única solução sólida. Acresce o facto de na difração de raios X os picos de difração dos dois metais ocorrem para valores de  $2\theta$  muito próximos, sendo impossível distinguir as fases constituintes de cada elemento, apesar de nos difratogramas serem notórios desvios da posição dos picos, em relação aos valores das fichas ICDD, quando há variação relativa nas concentrações de ouro e prata (Fig. 3.17). Os picos de difração

observados têm origem apenas no(s) elemento(s) metálico(s). Deve ser realçado que a partir da amostra SiAgAu6 a relação O/Si é próxima de 4; contudo, o teor de silício é inferior a 10% at. pelo que a elevada concentração de oxigénio pode ser devida à incorporação deste elemento na rede cristalina durante a deposição, como observado por outros autores noutros revestimentos<sup>[154]</sup>, e não, exclusivamente, devido à formação de óxidos dos elementos metálicos.



**Figura 3.17** - Difratomogramas dos filmes finos de sílica codepositados com prata e ouro (de SiAgAu3 a SiAgAu10).

Os resultados anteriores indicam que a prata se manteve metálica quando depositada em conjunto com a sílica, pela avaliação por DRX, enquanto o cobre reagiu com o oxigénio. O diagrama de fases Cu-Ag (*cf.* Anexos) indica a possibilidade de alguma dissolução de cobre na rede da prata (fase  $\alpha$ ), assim como de prata na rede de cobre (fase  $\beta$ ), mas que são, fundamentalmente, imiscíveis<sup>[186]</sup>. Com efeito, nas superfícies resultantes da codeposição de cobre, prata e sílica, há a presença de picos de difração devidos à prata metálica apesar de não possível associar inequivocamente nenhum dos picos observados ao cobre metálico. Acresce o facto que, devido à sua posição, alguns picos poderem ser indexados como óxidos de cobre (Fig. 3.18).

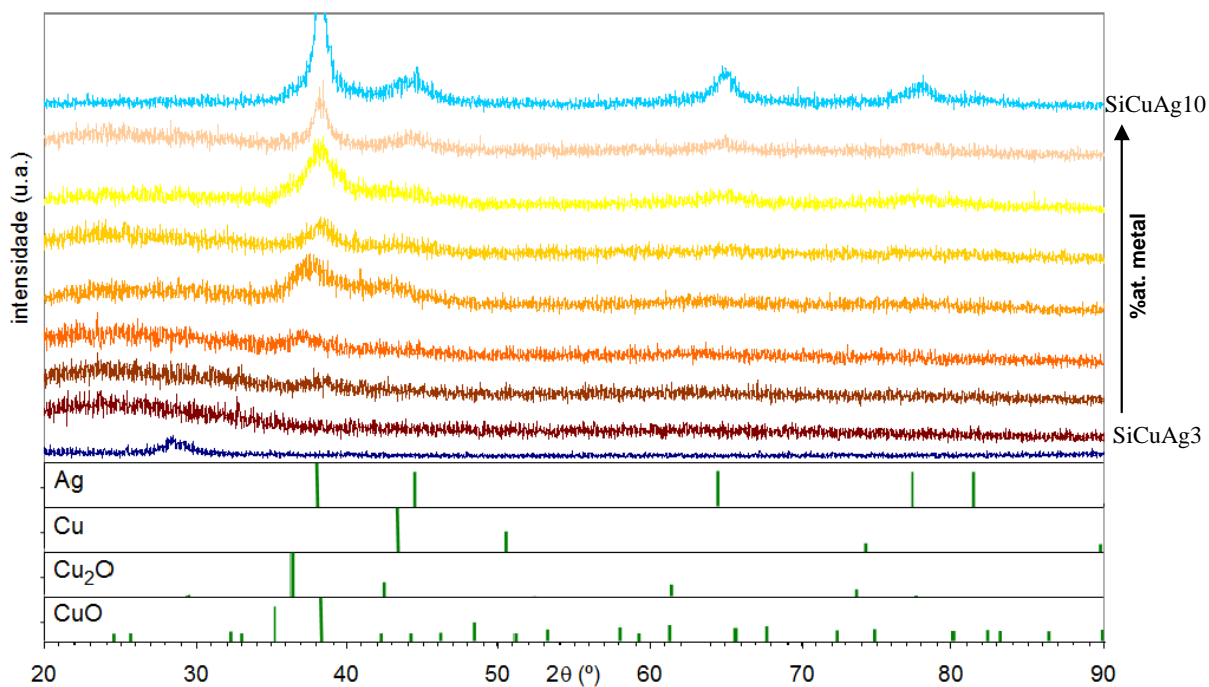


Figura 3.18 - Difratomogramas dos filmes finos de sílica codepositados com cobre e prata (CuAg3 a CuAg10).

A composição fásica dos filmes finos codepositados com ouro e o cobre apresenta um comportamento distinto dos outros sistemas. No diagrama de equilíbrio binário Cu e Au (*cf.* Anexos) está prevista a formação de três compostos diferentes. Contudo, a codeposição com sílica induz a competição entre a formação destes compostos e a formação dos óxidos de cobre. Não poderá ser ignorado o facto que também o silício irá competir pela ligação com o oxigénio, onde o fator determinante será não só a sua entalpia de formação, mas também a sua disponibilidade.

De facto, para concentrações de ouro e cobre baixas os primeiros picos a serem observados por DRX são os do ouro, no revestimento SiCuAu4 (14% at. Cu, 17%at. Au). Devido à baixa intensidade, é impossível demonstrar se existem ou não os picos correspondentes aos óxidos de cobre, tanto mais que os seus picos de difração são relativamente próximos dos do ouro, com uma diferença de cerca de 2°. Nesta superfície a composição química revelou que, matematicamente, há oxigénio suficiente para formar SiO<sub>2</sub> e Cu<sub>2</sub>O, contudo poderá não ser inequivocamente visível na avaliação por raios X por falta de ordem estrutural e a sua concentração volúmica ser próxima do limite inferior de deteção (Fig. 3.19). Nas superfícies com teores superiores de elementos metálicos é então possível observar picos de difração que podem ser indexados como sendo CuAu e Cu<sub>3</sub>Au, consoante a concentração relativa de Cu e Au.

A difração de Raios X permitiu identificar as fases presentes nos filmes, contudo não clarificou inequivocamente qual a sua estrutura. Por este motivo e para complementar os resultados, recorreu-se à microscopia eletrônica de transmissão.

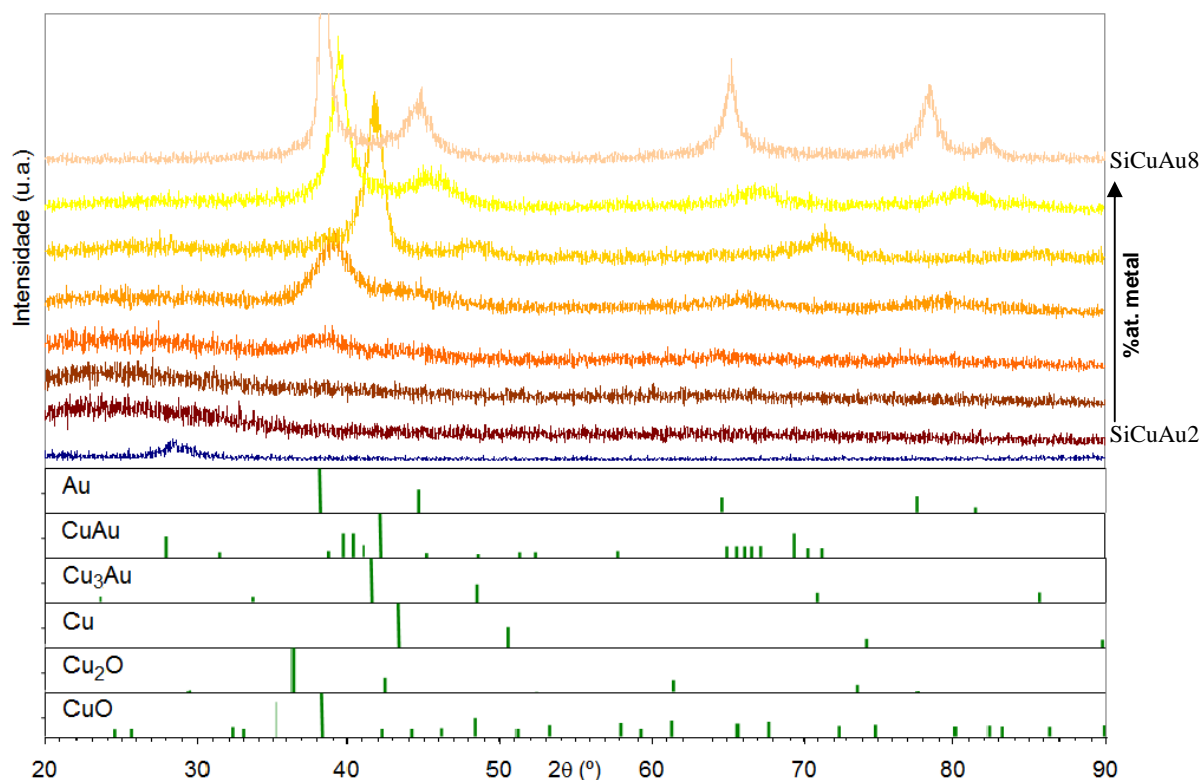
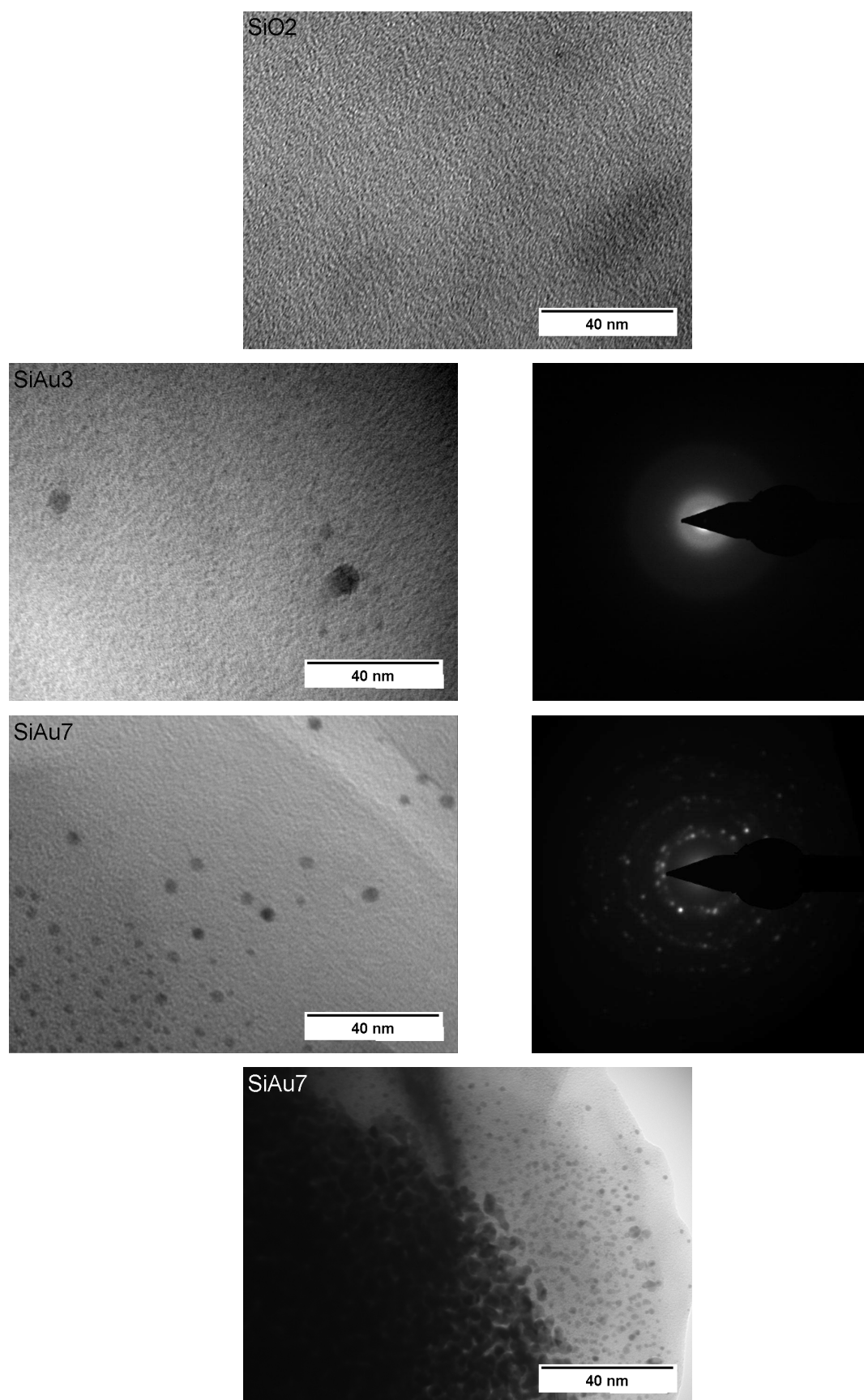


Figura 3.19 - Difratomogramas dos filmes finos de sílica codepositados com cobre e ouro (CuAu<sub>2</sub> a CuAu<sub>8</sub>).

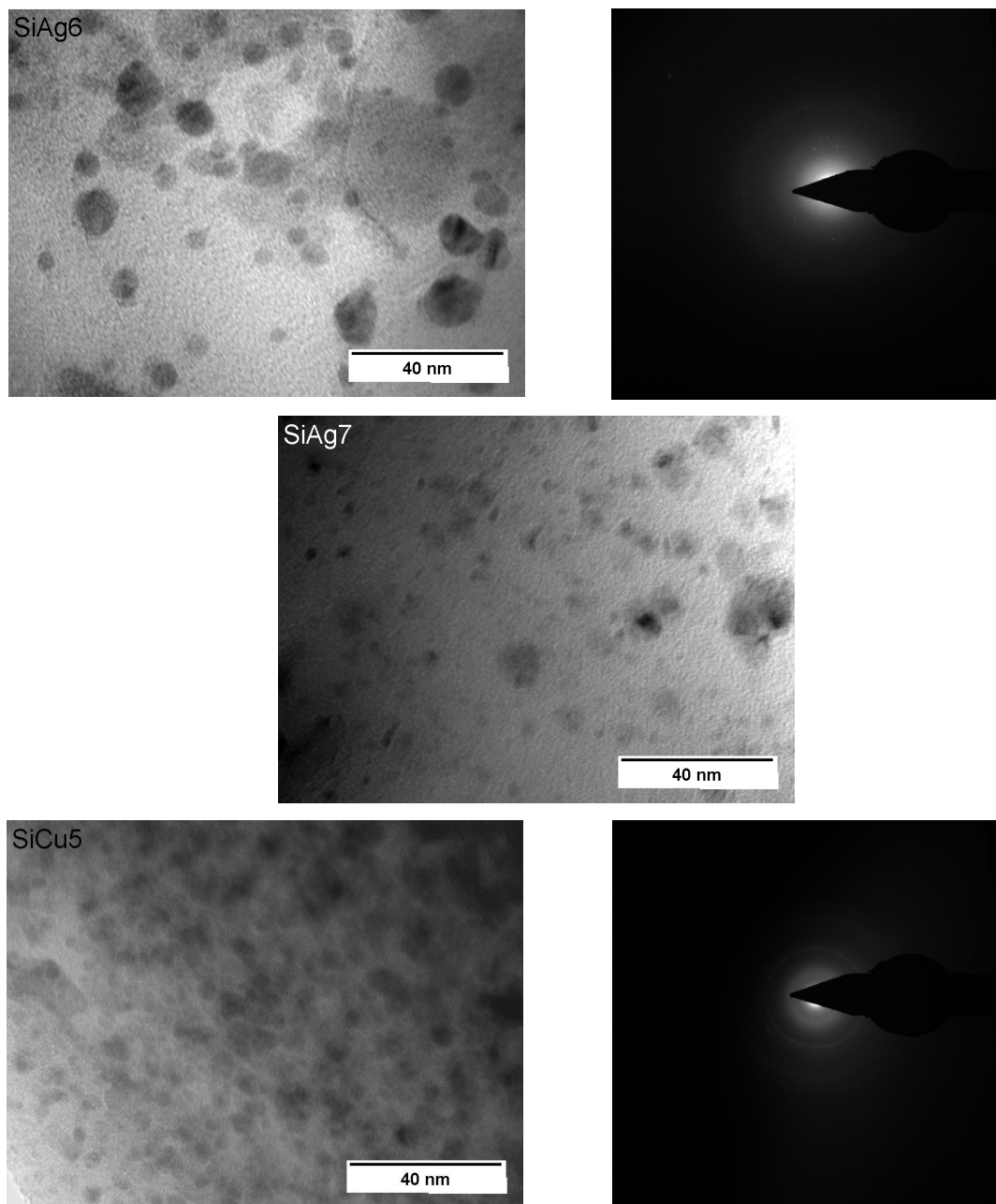
Nos filmes de sílica pura, não se notam elementos distintos reforçando a falta de ordem estrutural destes filmes (Fig. 3.20). A introdução de ouro leva à formação de um filme nanoestruturado onde o ouro, com dimensões inferiores a 10 nm, se encontra disperso na matriz amorfa de sílica. Nas superfícies designadas SiAu<sub>7</sub>, e em algumas zonas da amostra, sobretudo nas mais afastadas da zona onde se efetuou o furo para observação, são visíveis partículas com menos de 20 nm de diâmetro aglomeradas e diferentes das observadas. Esta diferença pode ter a sua origem no processo de preparação da amostra para ser visualizada em TEM e, cumulativamente ou em alternativa, pode também indicar a presença de um gradiente de estrutura ao longo da espessura do filme fino.



**Figura 3.20-** Micrografias de campo claro de microscopia eletrônica de transmissão, e respectivos padrões de difração, dos filmes finos de sílica codepositados com ouro.

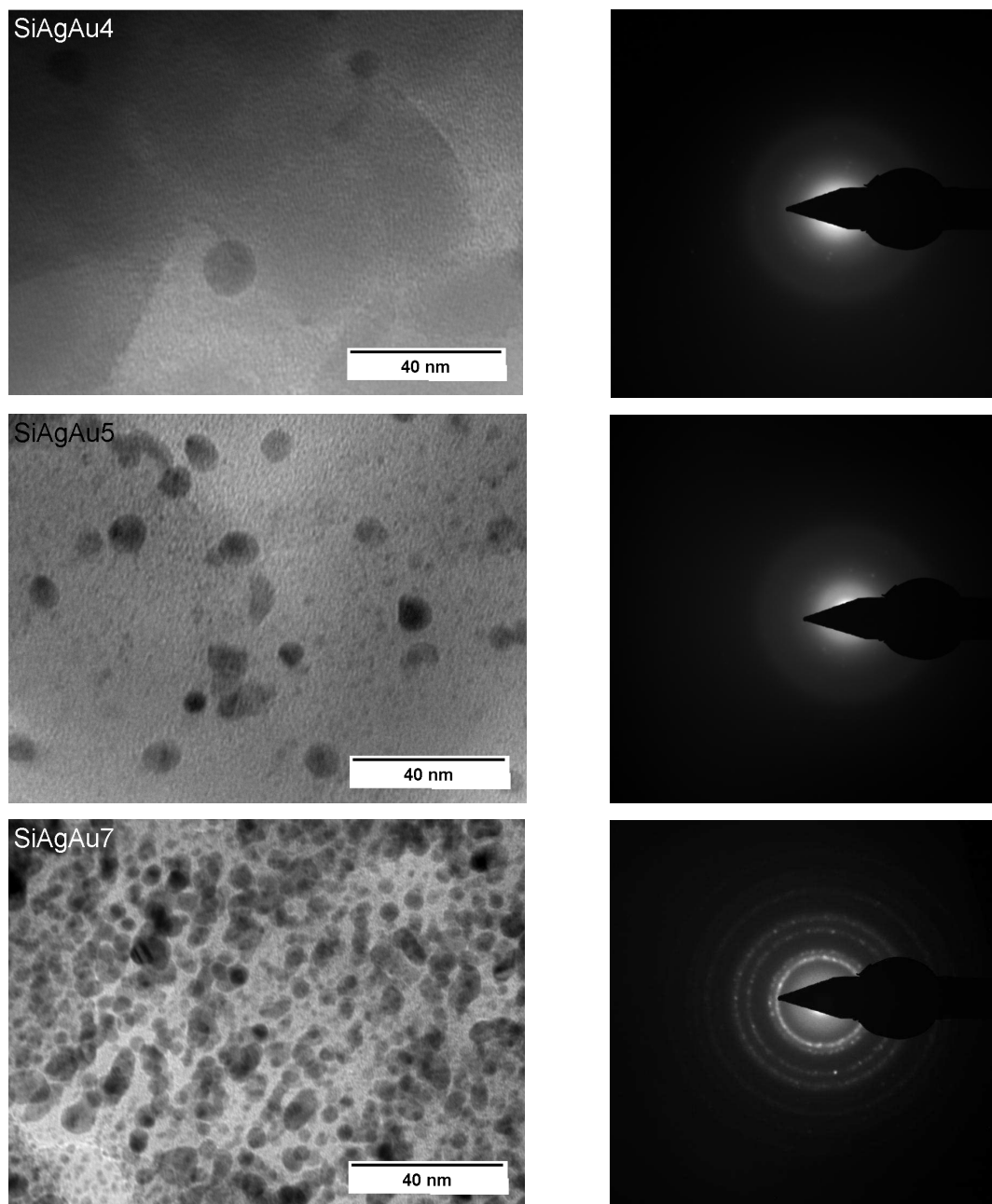
### Capítulo 3

No sistema dos filmes de sílica dopados com prata a observação por TEM deu origem a resultados semelhantes aos do sistema com ouro. A formação de um nanocompósito composto por uma matriz de sílica amorfa onde as partículas de prata se encontram dispersas, semelhante ao observado por outros autores (Fig. 3.21)<sup>[164]</sup>. Os revestimentos de sílica dopados com cobre, também à semelhança dos casos anteriores, são constituídos por cristais de  $\text{Cu}_2\text{O}$  e  $\text{CuO}$  dispersos numa matriz de sílica, mas com dimensões inferiores a 5 nm.



**Figura 3.21** - Micrografias de campo claro de microscopia eletrónica de transmissão, e respetivos padrões de difração, dos filmes finos do sistema SiAg e SiCu.

No que diz respeito ao sistema SiAgAu a microscopia eletrônica de transmissão revelou a existência de um nanocompósito. Contudo, à semelhança da difração de raios X, também não foi possível identificar se o ouro e a prata formavam partículas independentes ou se devido à sua miscibilidade formavam grãos com ambos os metais (Fig. 3.22).

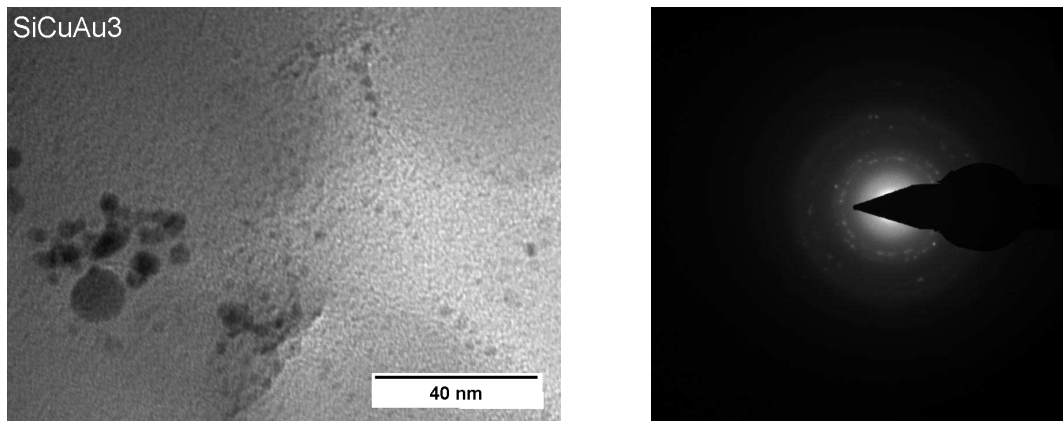


**Figura 3.22** - Micrografias de campo claro de microscopia eletrônica de transmissão, e respectivos padrões de difração, dos filmes finos do sistema SiAgAu.



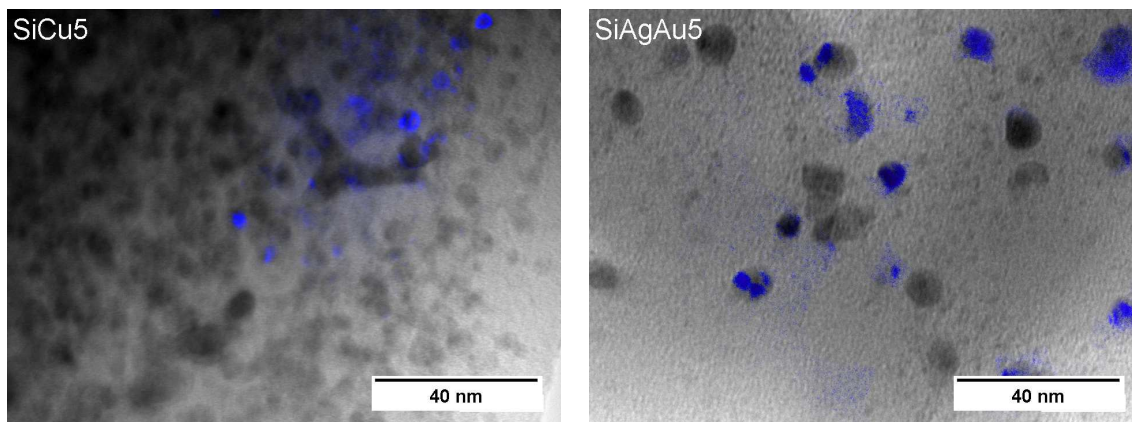
### Capítulo 3

No caso do sistema SiCuAu (Fig. 3.23) também é visível a matriz amorfa de sílica com partículas dispersas. Contudo, através da difração de elétrons, os anéis de difração apenas correspondem aos do ouro, não sendo visíveis anéis de difração correspondente ao  $\text{Cu}_2\text{O}$ . É possível que a concentração seja tão baixa, associada a um reduzido tamanho de cristalite, que não produza um sinal suficientemente intenso para ser visível na difração.



**Figura 3.23** - Micrografias de campo claro de microscopia eletrônica de transmissão, e respectivos padrões de difração, dos filmes finos do sistema SiCuAu.

A observação também foi efetuada em campo escuro, o permitiu realmente confirmar que as estruturas esféricas mais escuras se tratavam da fase metálica. As fotografias de campo escuro foram coloridas, e sobrepostas às de campo claro, de onde a cor realça os grãos que difratam segundo o primeiro anel de cada amostra (Fig. 3.24).



**Figura 3.24** - Sobreposição de fotografias de campo escuro sobre campo claro de microscopia eletrônica de transmissão, onde os grãos coloridos correspondem aos que difratam segundo o primeiro anel visível.



As tabelas 3.5 e 3.6 apresentam um resumo dos resultados da caracterização estrutural.

**Tabela 3.5** – Estrutura dos filmes finos de sílica dopados com um metal após caracterização por DRX e TEM.

Designação	Fases Presentes	Estrutura
SiO2	SiO <sub>2</sub>	Amorfa
SiAg1		
SiAg2		
SiAg3		
SiAg4	SiO <sub>2</sub> + Ag	Matriz amorfa de sílica com partículas de prata, com diâmetro inferior a 10 nm
SiAg5		
SiAg6		
SiAg7		
SiAg8	Ag	Cristais de Prata
SiAu1		
SiAu2		
SiAu3		
SiAu4	SiO <sub>2</sub> + Au	Matriz amorfa de sílica com partículas de ouro, com diâmetro inferior a 10 nm
SiAu5		
SiAu6		
SiAu7		
SiAu8	Au	Cristais de Ouro
SiCu1		
SiCu2		
SiCu3		
SiCu4	SiO <sub>2</sub> + Cu <sub>2</sub> O	Matriz amorfa de sílica com partículas de Cu <sub>2</sub> O, com diâmetro inferior a 10 nm
SiCu5		
SiCu6		
SiCu7	SiO <sub>2</sub> + CuO	Matriz amorfa de sílica com partículas de CuO, com diâmetro inferior a 10 nm
SiCu8	Cu	Cristais de Cobre

**Tabela 3.6** – Estrutura dos filmes finos de sílica dopados com dois metais após caracterização por DRX e TEM.

Designação	Fases Presentes	Estrutura	
SiAgAu1			
SiAgAu2		Matriz amorfa de Sílica com partículas de ouro e prata, provavelmente em solução sólida, com diâmetro inferior a 10 nm	
SiAgAu3			
SiAgAu4			
SiAgAu5	SiO <sub>2</sub> + Ag e Au		
SiAgAu6			
SiAgAu7			
SiAgAu8		Grãos de prata e ouro, possivelmente com nanopartículas de sílica nas fronteiras de grão.	
SiAgAu9			
SiAgAu10			
SiCuAg1			
SiCuAg2		Matriz amorfa de sílica com partículas, de dimensões nanométricas, de prata e possivelmente de Cu <sub>2</sub> O.	
SiCuAg3			
SiCuAg4			
SiCuAg5	SiO <sub>2</sub> + Ag e Cu <sub>2</sub> O	Matriz amorfa de sílica com partículas, de dimensões nanométricas, de Cu <sub>2</sub> O e possivelmente de prata.	
SiCuAg6			
SiCuAg7			
SiCuAg8		Matriz amorfa de sílica com partículas, de dimensões nanométricas, de prata e possivelmente de Cu <sub>2</sub> O.	
SiCuAg9			
SiCuAg10			
SiCuAu1			
SiCuAu2	SiO <sub>2</sub> + Au e Cu <sub>2</sub> O	Matriz amorfa de sílica com partículas, de dimensões nanométricas, de ouro e possivelmente partículas de Cu <sub>2</sub> O.	
SiCuAu3			
SiCuAu4			
SiCuAu5	SiO <sub>2</sub> + CuAu	Partículas, de dimensões nanométricas, de CuAu	
SiCuAu6	SiO <sub>2</sub> + Cu <sub>3</sub> Au	Partículas, de dimensões nanométricas, de Cu <sub>3</sub> Au	
SiCuAu7	SiO <sub>2</sub> + CuAu	Partículas, de dimensões nanométricas, de CuAu	
SiCuAu8	Au e CuAu	Partículas, de dimensões nanométricas, de ouro e CuAu	

Após esta análise deve ser salientado o facto de, aparentemente, não existir ligação entre a(s) fase(s) metálica(s) do nanocompósito o que implica que esta fase não é contínua, logo todo o filme fino continua a poder ser considerado como um revestimento com propriedades isolantes para a modificação da superfície de implantes neuronais.

### 3.4 Propriedades mecânicas

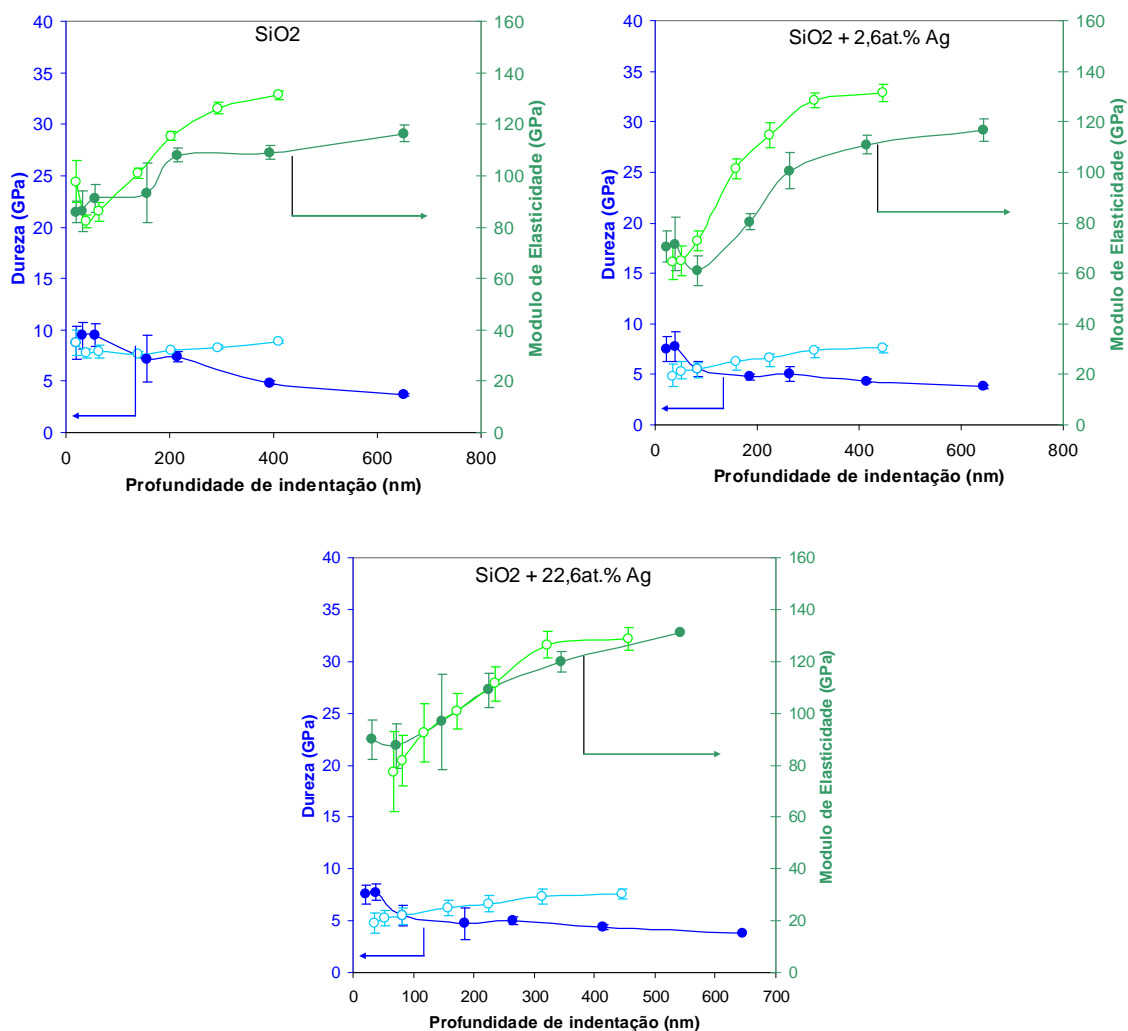
Ao realizar as deposições preliminares, para otimizar a disposição dos substratos durante as deposições, também foram realizados os testes preliminares para a determinação da carga a utilizar nos ensaios de nanoindentação utilizados para a caracterização das propriedades mecânicas dos revestimentos desenvolvidos. Com efeito, um dos problemas associados a esta técnica de caracterização é a determinação da profundidade máxima de indentação para a qual não ocorre influência do substrato. A literatura é profícua na explanação de várias regras empíricas que afirmam que se a profundidade de indentação for inferior a 1/10 ou 1/7 da espessura do revestimento, a influência do substrato é nula <sup>[187,188]</sup>. Ainda assim, foram efetuados ensaios preliminares onde foram utilizadas várias cargas sobre os revestimentos depositados sobre 2 substratos diferentes: aço 316L e Si puro <sup>[189]</sup>. Nestes testes é assumido que quando as profundidades de indentação forem suficientemente elevadas, os resultados deverão ser atribuídos apenas aos substratos, e os valores calculados terão que ser, obrigatoriamente, distintos e corresponder aos do material maciço que serve de substrato. Contudo, quando a carga for suficientemente baixa, dando origem a profundidades de indentação também suficientemente baixas para que apenas esteja a ser analisado o revestimento, os valores calculados deverão ser muito semelhantes e independentes dos valores dos substratos sobre os quais o filme está depositado.

Uma das informações importantes que pode ser retirada do ensaio de nanoindentação é a relativa ao módulo de elasticidade ( $E$ ) que é uma propriedade intrínseca, pois depende exclusivamente das ligações químicas presentes no material. De facto, o módulo de elasticidade não é mais do que uma avaliação de quanto podem os átomos ser afastados uns em relação aos outros, em função da carga, sem que seja quebrada qualquer ligação. Assim, em materiais monocristalinos, o módulo de elasticidade irá depender da direção em que seja feita a análise, uma vez que a resistência oferecida pela ligação química depende da direção em que é solicitada. O módulo de elasticidade de materiais policristalinos, desde que o tamanho de cristalite seja superior a 30nm, e a técnica de análise englobe um número de grãos suficientemente grande, é constante em qualquer direção. Em materiais amorfos, o valor de  $E$  não depende da direção nem da área que está a ser analisada. Neste caso, a dependência do módulo de elasticidade em relação à

### Capítulo 3

composição química é evidente e comprovada por vários modelos matemáticos que os permitem correlacionar<sup>[190-193]</sup>.

Nos ensaios preliminares foram utilizados filmes finos do sistema SiAg e os gráficos dos resultados (Fig. 3.25) evidenciam a convergência dos valores do módulo de elasticidade para profundidades de indentação inferiores a 100nm. Nestas condições, o módulo de elasticidade é representativo do revestimento. Na amostra com 22,6% at. de prata também é visível a variação do módulo de elasticidade com a espessura, o que indicia a possibilidade de existir um gradiente químico em função da espessura.



**Figura 3.25** – Ensaios preliminares de nanoindentação sobre filmes do sistema SiAg, com várias profundidades de indentação, sobre dois substratos diferentes. Círculos abertos: substrato de aço; círculos fechados: substrato de silício.

A dureza, porém, não converge para valores semelhantes para profundidades de indentação inferiores a 100nm. De facto, a dureza depende não só da composição química, mas também do tamanho de cristalite, como a relação de Hall-Petch indica, e da existência e do tipo de tensões internas. Como estes revestimentos são nanocompósitos em que a matriz de sílica é amorfa, não há tamanho de grão, mas o facto dos substratos que suportam os filmes finos serem diferentes podem induzir diferentes valores de tensões internas, o que poderia originar esta diferença. Assim, após esta análise prévia foi decidido utilizar cargas de 0,7 mN, para evitar a influência do substrato, o que corresponde a profundidades de indentação inferiores a 100nm. Como na aplicação desejada o material a modificar é o silício, todos os restantes ensaios também foram realizados nos revestimentos depositados sobre silício.

De um modo geral é notório que a dureza diminui com a concentração do metal, convergindo desde a do revestimento de sílica até à do metal puro (Tabela 3.7). No entanto, a dureza dos revestimentos SiAg8, SiAu8, SiCu8 (deposição apenas do metal) são superiores às dos respetivos em maciço. Isto já foi observado em inúmeros casos, porque a pulverização catódica de metais induz a formação de filmes nanocristalinos, que, tal como a relação de Hall-Petch indica, induz um aumento de dureza<sup>[194-196]</sup>.

O módulo de elasticidade, tal como já referido, é uma propriedade intrínseca, que é a medida do afastamento interatómico sem quebra permanente de ligações função da carga aplicada, e depende, fundamentalmente, da ligação atómica<sup>[190,191, 197]</sup>. Por essa razão é uma propriedade que é importante não só do ponto de vista de dimensionamento mecânico, mas também do ponto de vista da ciência dos materiais. Efetivamente, o módulo de elasticidade não varia com o tamanho de grão, ao contrário da dureza<sup>[198]</sup>. Porém, num cristal puro, tal como o silício utilizado em eletrónica, ele varia com a direção em que é determinado, ou seja, é anisotrópico. Num material policristalino, o módulo de elasticidade é a média do seu valor determinado segundo todas as direções possíveis. Por essa razão é um valor estável e constante independentemente do processo de fabrico e direção do ensaio<sup>[199-201]</sup>.

**Tabela 3.7** – Dureza e módulo de elasticidade dos filmes finos de sílica dopados com um metal.

Designação	Dureza (GPa)		E(GPa)	
	Média	Desv. pad.	Média	Desv. pad.
Si	10,3	0,8	114,9	7,4
SiO <sub>2</sub>	5,1	0,9	86,5	7,2
SiAg1	5,5	0,4	73,3	2,3
SiAg2	3,5	0,4	91,4	6,7
SiAg3	4,5	0,2	96,3	5,0
SiAg4	5,3	0,3	99,8	3,9
SiAg5	4,4	0,3	106,0	5,5
SiAg6	3,4	0,2	131,2	10,7
SiAg7	2,3	0,1	147,0	10,3
SiAg8	2,2	0,1	135,1	8,5
SiAu1	6,7	0,6	72,5	4,8
SiAu2	3,7	0,6	64,9	6,9
SiAu3	4,3	0,3	85,1	4,9
SiAu4	4,2	0,3	71,0	2,7
SiAu5	1,8	0,1	80,9	5,0
SiAu6	1,1	0,1	59,7	4,6
SiAu7	2,7	0,2	139,6	7,9
SiAu8	2,7	0,1	148,4	9,9
SiCu1	5,1	0,4	108,6	3,9
SiCu2	7,4	0,6	72,8	2,3
SiCu3	6,7	0,8	78,0	7,2
SiCu4	6,5	0,7	73,0	5,2
SiCu5	5,3	0,7	66,0	9,7
SiCu6	4,1	0,3	60,8	2,5
SiCu7	4,5	0,4	124,2	8,7
SiCu8	4,5	0,4	179,3	15,2

No caso dos filmes finos de SiAu, SiAg e SiCu, a caracterização estrutural dos sistemas revelou a presença de uma orientação preferencial segundo (111), o plano de maior densidade atômica, o que justifica que, de um modo geral, o módulo de elasticidade destes filmes seja superior ao reportado na literatura<sup>[202-204]</sup>.

O módulo de elasticidade dos filmes finos do sistema SiAg inicialmente aumenta e depois estabiliza com o aumento da concentração de prata, como seria esperado, uma vez que a orientação preferencial mantém-se ao longo dos diferentes revestimentos. Os

filmes finos de sílica dopados com ouro têm o módulo de elasticidade relativamente constante até às concentrações mais elevadas, onde a orientação preferencial é mais pronunciada. Nos filmes finos dopados com cobre o módulo de elasticidade diminui com a concentração, até à superfície designada por SiCu6, a partir da qual começa a aumentar. De facto, entre SiCu6 e SiCu7, a diferença fundamental é a diminuição da concentração de oxigénio disponível para formar o Cu<sub>2</sub>O, e a indexação da fase CuO.

Ao introduzir a fase metálica na matriz de sílica a dureza diminui, o que seria esperado pois qualquer um dos metais escolhidos, ouro, prata e cobre, são materiais dúcteis. Como foi constatado anteriormente, através da difração de raios X e dos padrões de difração de elétrões, não há vestígios de oxidação do ouro ou da prata. O mesmo não se verifica no cobre, que, maioritariamente, está presente como CuO ou Cu<sub>2</sub>O. Contudo, a dureza dos revestimentos aparenta ser independente do estado de oxidação da fase metálica e talvez mais dependente da concentração desta fase, uma vez que o seu valor evolui em função da concentração, qualquer que seja o sistema sílica/metal estudado.

A dureza dos filmes finos do sistema SiAgAu tem um valor aproximadamente constante com o aumento da concentração dos dois metais (Tabela 3.8). O ouro e a prata formam uma solução sólida, e, à semelhança do que acontece com os filmes de sílica dopados com ouro ou prata separadamente, com a diminuição da concentração de silício e oxigénio o módulo de elasticidade converge para o das fases metálicas, consoante a concentração relativa entre elas.

Nos filmes do sistema SiCuAg, de um modo geral, a dureza diminui com a diminuição da concentração de sílica. O módulo de elasticidade, porém, varia pronunciadamente consoante os filmes sejam mais ricos em cobre, onde diminui possivelmente pela presença de Cu<sub>2</sub>O, ou serem mais ricos em prata apresenta valores superiores. De facto, ao ordenar os dados do módulo de elasticidade em função da concentração de cobre, é visível uma tendência decrescente do módulo de elasticidade, enquanto não se observa qualquer tendência ao ordenar em função da concentração de prata.

Os filmes finos designados por SiCuAu apresentam valores de dureza quase sempre constante. Contudo, ao contrário do caso anterior, em que os dois metais formam uma solução sólida, o ouro e o cobre reagem podendo formar dois compostos distintos, CuAu e Cu<sub>3</sub>Au, cuja presença impede a formação dos óxidos de cobre. Nas composições químicas onde são identificados Au e CuAu, o módulo de elasticidade não apresenta uma variação acentuada do seu valor quando a concentração de sílica diminui. Contudo, nos

revestimentos onde foi identificada a formação de  $\text{Cu}_3\text{Au}$  o módulo de elasticidade é menor.

**Tabela 3.8** – Dureza e módulo de elasticidade dos filmes finos de sílica dopados com dois metais

Designação	Dureza (GPa)		E (GPa)	
	Média	Desv. Pad.	Média	Desv. pad.
SiAgAu1	3,0	0,1	54,1	1,7
SiAgAu2	4,7	0,3	63,1	2,2
SiAgAu3	3,4	0,1	55,4	1,6
SiAgAu4	2,3	0,1	60,2	3,1
SiAgAu5	2,5	0,1	75,8	5,0
SiAgAu6	2,8	0,1	117,5	6,5
SiAgAu7	3,1	0,2	153,2	6,9
SiAgAu8	2,6	0,1	127,9	6,3
SiAgAu9	3,2	0,2	137,1	7,6
SiAgAu10	4,6	0,4	152,0	11,0
SiCuAg1	6,9	0,6	75,5	3,1
SiCuAg2	7,1	0,6	84,6	4,5
SiCuAg3	5,3	0,3	83,4	3,1
SiCuAg4	4,4	0,4	116,2	7,2
SiCuAg5	3,1	0,3	86,3	6,7
SiCuAg6	2,5	0,5	43,2	6,4
SiCuAg7	3,2	0,2	112,2	8,5
SiCuAg8	2,9	0,2	86,6	7,2
SiCuAg9	2,9	0,2	114,0	8,3
SiCuAg10	3,6	0,3	108,0	6,2
SiCuAu1	5,2	0,4	73,6	2,8
SiCuAu2	4,9	0,2	81,7	2,3
SiCuAu3	4,6	0,4	97,4	5,6
SiCuAu4	4,3	0,2	102,7	4,6
SiCuAu5	4,1	0,2	120,6	5,6
SiCuAu6	2,4	0,2	59,4	3,1
SiCuAu7	4,2	0,3	110,3	7,7
SiCuAu8	5,2	0,3	130,1	7,5

Alguns autores <sup>[124, 205]</sup> afirmam que uma das possíveis razões que induz a gliose crónica é a incompatibilidade entre o módulo de elasticidade do silício com o do tecido nervoso. Uma das abordagens efetuadas para minimizar esta discrepância foi a de utilizar eléctrodos poliméricos, ou, alternativamente, produzir revestimentos mais macios. Ao



utilizar um revestimento de seda, com dureza e módulos de elasticidade inferiores aos do silício, Tien e colaboradores<sup>[124]</sup> conseguiram reduzir a formação da cicatriz glial. Nesta perspectiva, exceto nas concentrações mais elevadas do elemento metálico, os revestimentos apresentam propriedades favoráveis, porque tanto a dureza como o módulo de elasticidade dos revestimentos de todos os sistemas são inferiores aos do silício não revestido.

### ***3.5 Avaliação dos ângulos de contacto***

O ângulo de contacto ( $\theta$ ) formado entre uma superfície sólida e uma gota de água está diretamente relacionado com as zonas na superfície dos materiais com as quais o líquido consegue estabelecer uma ligação química, seja iónica, seja por pontes de hidrogénio (sites de Lewis). Quanto maior for a sua densidade e concentração no sólido, maior a tendência da água interagir quimicamente com a superfície, o que resulta num valor de ângulo de contacto baixo, e a superfície é designada de hidrófila. Porém, a ausência dessas áreas leva a que a água evite o contacto com a superfície, dando origem a ângulos de contacto elevados e, então, a superfície é designada como hidrofóba<sup>[206]</sup>. O valor de ângulo de contacto que estabelece o limite entre estas duas situações é muitas vezes apontado, na literatura, como sendo de 90°, mas há autores que consideram que 65° é o valor adequado<sup>[207]</sup>. Parâmetros e propriedades tais como a concentração aparente de locais de interação química, a composição química, e a estrutura, influenciam os valores do ângulo de contacto. No entanto, o parâmetro mais vezes referido como sendo determinante no valor do ângulo de contacto é a rugosidade superficial.

Wenzel e Cassie-Baxter<sup>[208]</sup> introduziram modelos que analisam a influência da rugosidade na molhabilidade das superfícies. O modelo de Wenzel pressupõe que o líquido está em contacto com a totalidade da superfície (picos e vales) o que ocorre preferencialmente em superfícies com perfil arredondado. No entanto, se houver a formação de uma fase vapor entre os vales da superfície e a gota de líquido (normalmente associado a perfis “escarpados” dos picos e vales), com o intuito de minimizar a energia livre de superfície, então a abordagem deverá ser efetuada de acordo com o modelo de Cassie-Baxter. Contudo, nem todas as superfícies se inserem apenas num dos modelos

citados dado que em alguns casos estão presentes os mecanismos inerentes a ambos os modelos, neste caso vulgarmente designado pelo modelo de Cassie-Baxter faquir. Qualquer que seja o modelo utilizado, ambos permitem calcular o ângulo de contacto real (superfície isenta de rugosidade) a partir da medição do ângulo de contacto aparente (superfície com rugosidade). Neste trabalho foi utilizado o modelo de Wenzel pois são superfícies hidrófilas com perfil arredondado, de acordo com os valores de *kurtosis* anteriormente determinados. Assim, o ângulo de contacto de Wenzel pode ser considerado como o ângulo de contacto que a água teria numa superfície perfeita, isenta de rugosidade, por forma a considerar apenas os efeitos da estrutura e composição química.

Na tabela 3.9 estão apresentados os valores médios e respetivos desvios padrão dos ângulos de contacto, medidos e corrigidos pelo modelo de Wenzel, entre água e as superfícies dos filmes finos de sílica e sílica codepositados com um elemento metálico.

**Tabela 3.9** – Valores médios e desvio padrão dos ângulos de contacto, aparente e real (modelo de Wenzel), entre água e filmes finos de sílica codepositados com um metal.

Designação	Ângulo de contacto com água (°)		Ângulo de Wenzel com água (°)	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
SiO <sub>2</sub>	38,4	1,4	41,1	1,3
SiAg1	26,4	5,4	32,2	4,0
SiAg2	33,7	1,4	46,2	0,9
SiAg4	46,0	3,2	49,2	2,9
SiAg6	42,3	1,6	49,1	1,3
SiAg7	34,0	0,7	53,3	0,4
SiAg8	82,6	0,5	82,8	0,4
SiAu1	88,6	1,8	88,6	1,8
SiAu2	97,7	4,8	97,6	4,7
SiAu3	52,5	1,0	53,7	1,0
SiAu4	52,2	7,9	54,1	7,4
SiAu5	52,5	1,1	53,7	1,1
SiAu6	86,4	3,1	86,5	3,0
SiAu8	11,3	1,5	14,0	1,3
SiCu1	51,1	4,3	51,9	4,2
SiCu2	55,8	4,2	56,2	4,1
SiCu5	84,1	1,6	84,2	1,6
SiCu6	75,6	1,4	75,9	1,3
SiCu7	62,9	0,3	63,3	0,3
SiCu8	58,3	1,7	52,8	1,6

De um modo geral é evidente que os valores de ângulos de contacto medidos experimentalmente não variam muito dos valores corrigidos de acordo com o modelo de Wenzel, o que está de acordo com o facto de a rugosidade média superficial dos filmes finos ser nanométrica, muito semelhante entre todas as superfícies, e em nenhum dos casos superior a 20 nm.

Para analisar os valores de molhabilidade, dos filmes finos de sílica codepositados com um ou dois elementos metálicos, é necessário ter em consideração que a energia de superfície ( $\gamma$ ), e implicitamente o ângulo de contacto, dependem da orientação e distribuição dos planos cristalográficos dos metais. Com efeito, vários autores, utilizando diferentes tipos de abordagens teóricas, e comparando os valores calculados com os experimentais, demonstraram esta dependência<sup>[209, 210]</sup>. Assim, e para metais cuja estrutura é cúbica de faces centradas (cfc), como é o caso dos três metais utilizados, a relação segue a seguinte ordem:  $\gamma_{(111)} < \gamma_{(100)} < \gamma_{(110)}$ . Dado que quanto menor a energia superficial maior a dificuldade da superfície ser molhada por líquidos com tensões superficiais elevadas, como o caso da água em que  $\gamma_L=72,4 \text{ mJ.m}^{-2}$ , é expectável que  $\theta_{(111)} > \theta_{(100)} > \theta_{(110)}$ .

Nas superfícies de sílica dopada com prata parece existir alguma correlação entre o valor do ângulo de contacto e a estrutura do elemento metálico, pois um aumento da concentração deste induz um aumento progressivo do ângulo de contacto de Wenzel. Considerando que as superfícies do sistema SiAg evidenciam alguma orientação preferencial segundo o plano (111) este resultados parecem confirmar o anteriormente observado na caracterização estrutural.

No caso do sistema SiAu, logo nas concentrações mais reduzidas do elemento metálico, há um aumento brusco do ângulo de contacto, para valores próximos de 90°. Em seguida, o valor do ângulo de contacto desce para cerca de 50°, para depois registar uma nova subida abrupta seguida de uma nova diminuição para um valor próximo de 10° para o filme fino com o teor mais elevado de ouro. Se considerarmos a evolução dos planos de difração correspondentes ao metal, e de acordo com a energia superficial, seria expectável que, à semelhança da prata, o ângulo de contacto aumentasse com o incremento do teor do elemento metálico atingindo o valor máximo na superfície SiAu8, pois há uma orientação preferencial segundo o plano (111). No entanto, é necessário ter em consideração que as caracterizações estruturais efetuadas ou analisaram em volume a espessura dos filmes finos (análise DRX) ou utilizaram uma espessura reduzida do revestimento mas que não

### Capítulo 3

podemos identificar de que “profundidade” do filme fino corresponde a área analisada devido ao próprio processo de preparação das amostras (análise TEM). Contudo, a análise do ângulo de contacto apenas recolhe informação de 3 a 5 nm de profundidade. Considerando todos estes contributos, parece que a superfície do sistema SiAu evolui da seguinte forma:

- para os teores mais baixos de ouro o aumento do valor do ângulo de contacto não pode ser devido apenas a uma possível orientação preferencial segundo plano (111) pois a concentração de ouro é reduzida; neste caso temos que considerar que, no que diz respeito à sílica, deve ocorrer uma prevalência de grupos siloxano (Si-O-Si) sobre grupos silanol (Si-O-H), dado que os primeiros apresentam características hidrófobas e os segundos hidrófilas <sup>[211]</sup>:

- para os teores intermédios de ouro e na superfície dos revestimentos, aparentemente, não há orientação preferencial segundo nenhum dos planos cristalográficos, pois os valores dos ângulos de contacto são apenas ligeiramente superiores aos avaliados para o filme fino de sílica;

- para os teores mais elevados de ouro, em que a contribuição dos grupos químicos funcionais associados à sílica pode ser considerada nula, ocorrem dois casos opostos; a superfície SiAu7 apresenta um valor de ângulo de contacto compatível com uma orientação preferencial segundo o plano (111), de acordo com a caracterização em volume; já no caso da superfície SiAu8 a superfície não reflete a orientação preferencial observada pelas técnicas de DRX e TEM, sugerindo até uma orientação preferencial segundo o plano (110).

No caso da sílica dopada com cobre, o ângulo de contacto aumenta progressivamente com o aumento de concentração do metal até à superfície designada por SiCu6, começando a diminuir progressivamente para as concentrações superiores. É nesta gama de concentrações que, na caracterização estrutural, surgiu a possibilidade de ocorrer a coexistência de Cu<sub>2</sub>O e CuO. Apesar de, um modo geral, a estrutura ser provavelmente composta de Cu<sub>2</sub>O de dimensões nanométricas disperso numa matriz de sílica amorfa até SiCu6, e para SiCu7 já apenas se considerar CuO na mesma matriz, há a suspeita de que essa transição de fase ocorra de uma forma progressiva e não abrupta, com concentrações abaixo do limite de deteção das técnicas. Assim, o aumento da concentração de CuO e diminuição do Cu<sub>2</sub>O poder-se-á refletir na diminuição do valor do ângulo de contacto. Um fator que poderá apoiar esta hipótese é o facto de alguns autores já terem produzido revestimentos de Cu<sub>2</sub>O para produzir superfícies superhidrófobas, que apresentaram

ângulos de contacto entre os 80° e os 140°<sup>[212, 213]</sup>. Outros investigadores também já modificaram a superfície do cobre para formar CuO e deste modo produziram superfícies mais hidrófilas<sup>[213, 214]</sup>. Assim, a evolução do valor de ângulo de contacto no sistema SiCu parece ser dependente da composição fásica superficial que, neste sistema, aparentemente reflete o que foi analisado em volume.

A avaliação da molhabilidade dos sistemas em que a sílica foi codepositada com dois elementos metálicos está resumida na tabela 3.10 onde, mais uma vez, são apresentados os valores medidos e os calculados após correção pelo método de Wenzell.

**Tabela 3.10** – Ângulo de contacto real e corrigido de acordo com o modelo de Wenzel entre a água e a superfície dos filmes finos de sílica dopados com 2 metais.

Designação	Ângulo de contacto em água (°)		Ângulo de contacto de Wenzel em água	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
SiAgAu1	40,8	2,6	42,5	2,5
SiAgAu2	12,3	0,3	17,9	0,2
SiAgAu4	25,6	2,2	40,4	1,2
SiAgAu5	78,0	2,6	80,2	2,2
SiCuAg1	36,1	1,5	38,4	1,4
SiCuAg2	74,8	1,4	75,7	1,3
SiCuAg3	64,5	1,3	64,9	1,2
SiCuAg4	60,2	0,5	60,7	0,5
SiCuAg5	41,1	1,9	41,4	1,9
SiCuAg7	70,1	1,6	70,1	1,6
SiCuAg9	60,3	7,7	65,6	6,1
SiCuAu2	64,4	1,8	64,9	1,8
SiCuAu3	63,0	2,2	63,6	2,2
SiCuAu4	85,7	1,2	85,9	1,1
SiCuAu5	71,3	1,4	71,4	1,4
SiCuAu6	53,2	0,2	53,8	0,2
SiCuAu7	68,1	1,1	68,7	1,0

No sistema SiCuAg, não há reação entre a prata e o cobre, pelo que a prata, o cobre e os óxidos de cobre coexistem na matriz de sílica. O que se observa é que quando a concentração relativa entre cobre e prata tende para o cobre, o ângulo de contacto diminui, enquanto quando tende para mais prata, aumenta. Na estrutura dos revestimentos de cobre e prata presumiu-se que estivesse presente o óxido Cu<sub>2</sub>O preferencialmente ao CuO, por

questões de estequiometria e de equilíbrio termodinâmico. Na difração de raios X foi difícil indexar com clareza qual das fases estava presente. Se, com o aumento de concentração de cobre relativamente à da prata, o ângulo de contacto diminui, para valores próximos dos que se obtiveram nas amostras de sílica dopada só com cobre, então é válida a assunção que o óxido presente, pelo menos na superfície, seja predominantemente CuO e não o Cu<sub>2</sub>O. De facto, na literatura, o CuO apresenta-se como hidrófilo, enquanto o Cu<sub>2</sub>O se apresenta como predominantemente hidrófobo<sup>[213]</sup>.

No caso do sistema de cobre e ouro a estrutura é a de uma matriz de sílica com partículas de dimensões nanométricas de óxido de cobre e de ouro, até ao filme fino designado por SiCuAu3. Nestas amostras, com o aumento do teor dos elementos metálicos, o ângulo de contacto aumenta, com algumas semelhanças com os sistemas de sílica dopada com cada um dos metais separados. Presume-se que, uma vez que se pode considerar a estrutura como um híbrido das duas, que ambos terão um efeito cumulativo em tornar a superfície mais hidrófoba. Nas concentrações mais elevadas, SiCuAu5 e SiCuAu7 o composto presente é CuAu, enquanto no revestimento SiCuAu6 é Cu<sub>3</sub>Au, numa matriz de sílica amorfa. Presume-se que enquanto Cu<sub>3</sub>Au induz a diminuição do ângulo de contacto para valores próximos do da sílica, o CuAu induz o seu aumento. Não foi encontrada qualquer referência sobre o ângulo de contacto da água nestas fases.

Apesar do ângulo de contacto de Wenzel ser útil para associar o efeito da estrutura e composição à variação do ângulo de contacto, ao presumir uma superfície sem efeitos de rugosidade, o facto é que a topografia tem um papel importante, e as amostras que estão a ser caracterizadas irão ser as mesmas que seguirão para testes *in vitro*. Assim, o ângulo de contacto que se irá considerar, no restante da análise, será o que foi efetivamente medido.

#### 3.5.1 Tensão de adesão da água

A tensão de adesão da água ( $\tau_0$ ) é calculada pelo produto da tensão da água ( $\gamma_L=72,4 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) pelo cosseno do ângulo de contacto entre a superfície em estudo e a água e é uma medida da reatividade deste líquido quando em contacto com uma superfície. Para valores superiores ao limite de Berg ( $\tau_0 = 30 \text{ mJ.m}^{-2}$ ) a superfície é considerada hidrófila, enquanto que para valores inferiores é considerada hidrófoba<sup>[207]</sup>.

No caso dos filmes finos dopados com prata (tabela 3.11), o metal não leva a uma alteração significativa no valor de  $\tau_0$ , a superfície continua a ser hidrófila, apesar de a prata puranormalmente apresentar características hidrófobas. De facto, a sílica na sua superfície é caracterizada pela presença de grupos silanol (Si-OH) o que permite estabelecer pontes de hidrogénio com a água. Este efeito parece predominar mesmo quando o revestimento tem concentrações elevadas do material metálico.

O ouro, em concentrações menores que 10 %at. ou superiores a 62% at. induz uma superfície hidrófoba. Contudo, nas superfícies SiAu1, SiAu2 e SiAu6 a superfície apresenta valores de ângulo de contacto característicos de superfícies hidrófilas. De facto, e de acordo com o anteriormente referido, a rugosidade, a composição química à superfície e a estrutura podem influenciar a concentração de zonas polares, e assim influenciar os ângulos de contacto com a água.

Os revestimentos de cobre puro apresentam características hidrófilas, mas o aumento da concentração dos seus óxidos, principalmente do  $\text{Cu}_2\text{O}$ , gradualmente torna a superfície hidrófoba, como é possível constatar para as superfícies SiCu5 e SiCu6.

Quando se utilizam dois metais para codepositar com a sílica a concentração relativa de ambos também influencia o ângulo de contacto e, conseqüentemente, a tensão de adesão com a água (tabela 3.12). Apesar de os restantes parâmetros de deposição se manterem constantes e apenas se alterar a potência e concentração relativa dos metais no alvo, o rácio entre eles não altera o facto de haver uma matriz amorfa de sílica com partículas metálicas de dimensões nanométricas, mas altera o crescimento da partícula, alterando a topografia da superfície. De facto, a concentração relativa dos metais, ou a alteração da estrutura não produz uma linha de tendência visível, principalmente nos revestimentos de sílica com ouro e prata. De facto, a utilização do modelo de Wenzel permitiu tirar algumas ilações em relação à estrutura e ao ângulo de contacto, e mostrou como realmente a componente da estrutura/composição química o influenciam. Mas nestas superfícies a rugosidade não é constante e isso reflete-se ao considerar  $\tau_0$ , porque onde antes as variações era mais progressivas, previsíveis e acompanhadas de uma variação na estrutura ou composição química, aqui manifesta-se em oscilações entre superfícies hidrófilas ou hidrófobas.

**Tabela 3.11** – Tensão de adesão da água ( $\tau_0$ ) dos filmes finos de sílica dopados com um metal.

Designação	Tensão de adesão da água ( $\text{mJ.m}^{-2}$ )	
	Média	Desvio padrão
SiO <sub>2</sub>	57,05	1,1
SiAg1	64,9	3,4
SiAg2	60,5	1,0
SiAg4	50,4	3,0
SiAg6	53,8	1,4
SiAg7	60,3	0,5
SiAg8	9,4	0,6
SiAu1	1,7	2,3
SiAu2	-9,7	6,1
SiAu3	44,3	1,0
SiAu4	44,2	7,8
SiAu5	44,3	1,1
SiAu6	4,6	3,9
SiAu8	71,3	0,4
SiCu1	45,6	4,1
SiCu2	40,8	4,3
SiCu5	7,4	2,0
SiCu6	18,0	1,7
SiCu7	33,1	0,4
SiCu8	38,3	1,8

Apesar de já terem sido feitas várias tentativas de estabelecer um modelo que correlacione a rugosidade da superfície com o ângulo de contacto, como os modelos de Wenzel e de Cassie-Baxter, nenhum ainda conseguiu estabelecer uma relação inequívoca, principalmente pelo facto de ser difícil definir um parâmetro que represente a topografia. Não são só os parâmetros dimensionais da rugosidade mas também os adimensionais, tal como *skew* e *kurtosis*, que informam sobre geometria da partícula<sup>[215]</sup>, que são difíceis de incorporar num modelo matemático.



**Tabela 3.12** – Tensão de adesão da água ( $\tau_0$ ) dos filmes finos de sílica dopados com dois metais.

Designação	Tensão de adesão da água ( $\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$ )	
	Média	Desvio padrão
SiAgAu1	55,1	2,2
SiAgAu2	71,1	0,1
SiAgAu4	65,6	1,2
SiAgAu5	15,1	3,3
SiAgAu7	5,1	1,8
SiAgAu8	46,6	1,0
SiCuAg1	58,8	1,1
SiCuAg2	19,1	1,7
SiCuAg3	31,4	1,4
SiCuAg4	36,2	0,5
SiCuAg5	54,8	1,6
SiCuAg7	24,8	1,9
SiCuAg9	35,8	8,4
SiCuAu2	31,4	2,1
SiCuAu3	33,0	2,5
SiCuAu4	5,4	1,5
SiCuAu5	23,3	1,7
SiCuAu6	43,7	0,3
SiCuAu7	27,1	1,3

Diversas respostas biológicas à inserção de biomateriais, tais como a sorção de proteínas, a ativação da cascata da coagulação ou a adesão de células dependem da estrutura e reatividade da água quando em contacto com a superfície do material. A sorção de proteínas ocorre em superfícies hidrófobas, mas não em superfícies hidrófilas, já que a “desidratação” da superfície é energeticamente proibitiva. No entanto, superfícies hidrófilas promovem a adesão celular e podem ativar a cascata da coagulação, aparentemente por mecanismos que não envolvem a sorção de proteínas<sup>[207]</sup>. No caso de células do sistema nervoso central os trabalhos reportados na literatura indicam que as células preferencialmente aderem a superfícies hidrófilas<sup>[216, 217]</sup>.

Resumindo, e considerando apenas a questão da hidrofiliidade/hidrofobicidade da superfície a maioria das superfícies dos 6 sistemas estudados poderiam, potencialmente, promover a adesão de células neuronais. No entanto, outras

propriedades/características, tais como a carga superficial têm também um papel determinante no desempenho da relação biomaterial/células.

#### ***3.6 Carga superficial e Adesão***

O potencial zeta ( $\zeta$ ) permite avaliar a carga desenvolvida na superfície de um material quando em contacto com um eletrólito. Em soluções coloidais, soluções onde há partículas com dimensões abaixo de 1  $\mu\text{m}$  dispersas num fluido, é uma das propriedades mais importante. Com efeito, para o intervalo de valores de -30 a +30 mV, há aglomeração das partículas que têm um comportamento distinto do que quando dispersas o que acontece quando a sua carga se encontra fora do referido intervalo.

No que concerne as superfícies desenvolvidas neste estudo temos vários fatores contraditórios, que têm que ser tidos em consideração, e nos quais o potencial zeta desempenha um papel fundamental. Com efeito, é sabido que, devido à carga negativa da membrana<sup>[1]</sup>, as células do sistema nervoso central, mais especificamente os neurónios, têm tendência a aderir a superfícies com uma carga positiva. Este é um dos motivos pelo qual a PDL é utilizada nos estudos que envolvem a cultura de células neuronais, pois apresenta um valor de +2 mV (valor determinado neste estudo em KCl 1mM pH=7,4). Neste aspeto uma superfície com uma carga superficial negativa pode ser responsável pelo não funcionamento do implante neuronal, pois se houver um afastamento de neurónios da superfície do implante, isto é se não ocorrer adesão, o desenvolvimento da cicatriz da glia é mais provável, tal como o encapsulamento do implante. Acresce o facto de que se os neurónios não estiverem em contacto com o implante, ou seja, se se encontrarem a uma distância superior ao comprimento de um neurónio, o implante torna-se inútil tanto para registar os sinais elétricos como para os fornecer.

As células procarióticas também apresentam, regra geral, um valor de potencial de superfície negativo, apesar de poderem ocorrer oscilações consoante se encontram na fase exponencial ou na fase estacionária<sup>[218]</sup>. Neste aspeto particular um valor de potencial zeta negativo é benéfico para a aplicação final dado que previne a adesão e consequente proliferação de bactérias. Considerando que estas etapas são essenciais para a formar do biofilme, responsável pela infeção bacteriana e resistência dos microrganismos aos

tratamentos com fármacos, a carga negativa parece ser a opção a tomar quando se pretende uma superfície antibacteriana. Também no que diz respeito ao potencial de superfície induzir ou não a formação de trombos, dado que a carga de superfície dos glóbulos vermelhos também é negativo, uma superfície com a mesma carga induzirá o afastamento destas células e será, em princípio, antitrombogénica. No entanto, e tal como já referido, uma carga superficial negativa poderá impedir a adesão e diferenciação das células neuronais.

Na tabela 3.13 estão apresentados os valores de potencial zeta das superfícies em estudo para um pH=7,4 quando foi utilizado como eletrólito uma solução de KCl 1mM. Enquanto o valor do ângulo de contacto em água é ditado pela concentração de locais de Lewis na área de superfície real, o potencial zeta depende da concentração de cargas que se desenvolvem na superfície do material quando em contacto com um fluido. Uma observação interessante que se destaca logo numa primeira avaliação global dos resultados é o valor do desvio padrão que para algumas das superfícies é superior ao valor médio do potencial zeta. Esta observação pode ser consequência de uma reação imediata e em grande extensão da superfície em análise com o eletrólito o que indica, possivelmente, a oxidação e libertação de iões a partir dos elementos metálicos. Este facto a ocorrer não só altera a superfície em estudo como também a força iónica do eletrólito que, por si só, é responsável pela variação do valor do potencial zeta, numa mesma superfície.

Com efeito, convém recordar que a modificação que constitui o cerne deste trabalho visa a obtenção de superfícies de implantes neuronais com melhor desempenho que o silício usualmente utilizado. Uma das vertentes da referida melhoria foca-se na ação antimicrobiana que é desejável que estas superfícies apresentem para melhorar a estatística no que concerne ao elevado índice de infeções nosocomiais. Por este motivo foram estudados sistemas com a incorporação de prata ou cobre dado que estes metais são conhecidos pelas suas propriedades inibitórias no desenvolvimento de biofilmes bacterianos. No entanto, dado que a cinética de libertação de iões dos referidos metais varia com os valores de pH, força iónica e composição química do meio em que estão inseridos e considerando que se pretende uma libertação logo a partir do instante inicial da implantação foi efetuada a abordagem de colocar ouro nos sistemas com prata e com cobre de modo a que, quando inseridos em fluido humano, o par de elementos metálicos presentes possa funcionar como pilha galvânica. Dado que o potencial de oxidação do ouro é sempre mais baixo que os respetivos potenciais da prata e do cobre ( $E^0_{(Au/Au^+)} = -1,68 \text{ V}$ ;  $E^0_{(Ag/Ag^+)} = -0,80 \text{ V}$ ;  $E^0_{(Cu/Cu^+)} = -0,52 \text{ V}$ )<sup>[219]</sup> tal implica que o ouro tem tendência a

### Capítulo 3

reduzir-se impondo assim a oxidação de qualquer um dos outros metais facilitando a ionização e, concomitantemente, a potencialidade da superfície em apresentar propriedades antibacterianas.

**Tabela 3.13** – Adesão e potencial zeta das superfícies. As amostras a sombreado são as que apresentam resultados menos favoráveis para a cultura de células neurais.

Designação	Adesão	Potencial zeta (mV)		Designação	Adesão	Potencial zeta (mV)	
		Média	Desvio Padrão			Média	Desvio Padrão
SiO2	Sim	-88,1	0,8	SiAgAu1	Sim	-65,5	2,6
PDL	--	+2,0	4,1	SiAgAu2	Sim	-71,2	2,8
SiAg1	Sim	-76,3	10,1	SiAgAu4	Sim	-70,4	4,0
SiAg2	Sim	-50,0	1,4	SiAgAu5	Sim	-32,9	7,4
SiAg4	reagiu	-64,7	11,9	SiAgAu8	Sim	-13,7	160,0
SiAg6	Sim	62,0	79,1	SiCuAg1	Sim	-83,9	2,2
SiAg7	Sim	87,9	29,4	SiCuAg2	reagiu	-46,3	3,0
SiAg8	Sim	-56,0	7,1	SiCuAg3	Sim	-74,3	3,6
SiAu1	Sim	-82,4	13,5	SiCuAg4	Sim	-51,5	0,7
SiAu2	Sim	-52,7	2,7	SiCuAg7	Não	-43,2	40,0
SiAu3	Sim	-76,0	9,1	SiCuAg9	Não	-100,5	162,5
SiAu4	Não	-46,4	64,8	SiCuAu2	Sim	45,6	103,4
SiAu5	Sim	-71,1	4,9	SiCuAu3	Sim	-34,8	4,3
SiAu6	Sim	68,1	23,8	SiCuAu4	Sim	-195,6	174,6
SiAu7	Sim	34,5	30,6	SiCuAu5	Sim	-51,9	64,6
SiAu8	Não	-51,0	29,4	SiCuAu6	Sim	-91,8	55,3
SiCu1	Sim	-82,4	2,6	SiCuAu7	Não	-472,9	333,4
SiCu2	Sim	-82,0	13,4				
SiCu5	Sim	-84,6	4,7				
SiCu6	Sim	-62,5	4,7				
SiCu7	Sim	-31,5	3,7				
SiCu8	Não	-509,6	89,4				

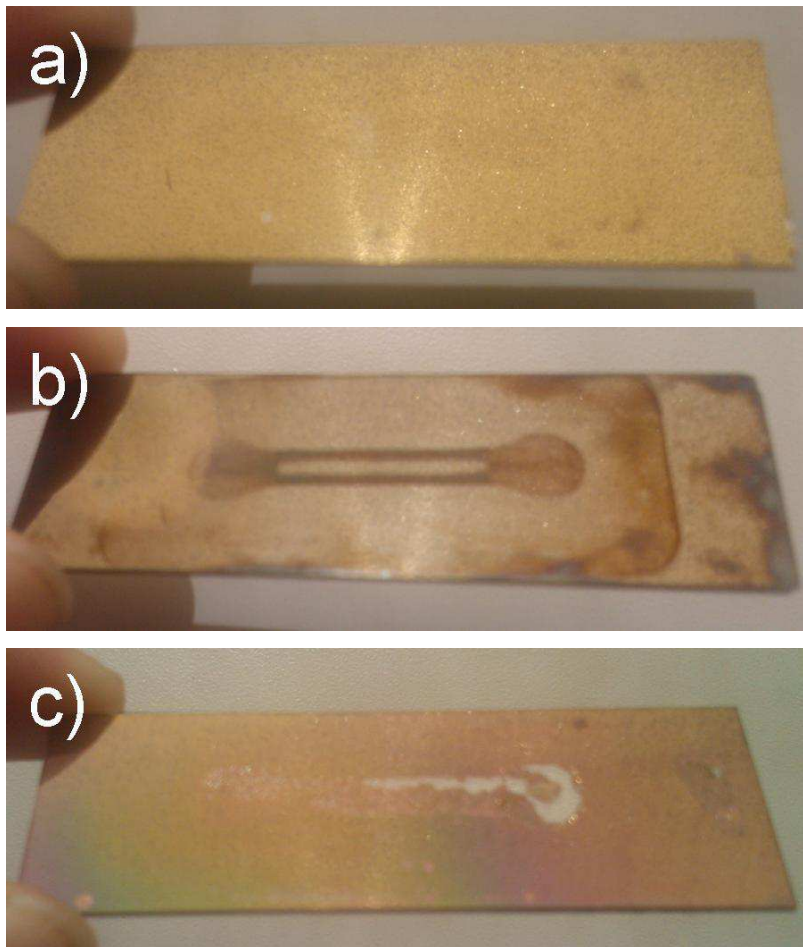
Nota: As zonas a sombreado evidenciam as superfícies que após esta caracterização não foram consideradas adequadas para modificar a superfície de implantes neuronais.

Dado o contexto eletroquímico referido não é de estranhar que nas medições efetuadas nos sistemas de sílica dopada com dois elementos, especialmente para os teores metálicos mais elevados, as variações produzam valores de desvio padrão enormes e em alguns dos casos superiores ao valor médio calculado. Por este motivo os sistemas onde foi observado este comportamento não podem ser utilizados para o objetivo pretendido pelo que não serão testados bioticamente.

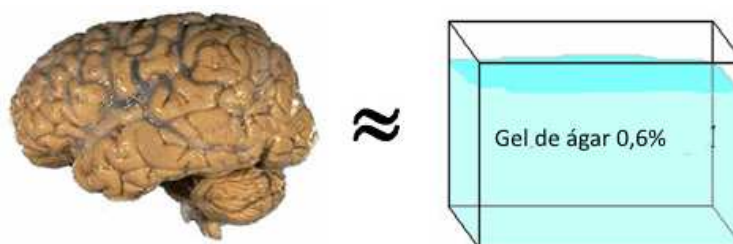
Nos sistemas de sílica dopada com prata ou ouro o potencial zeta oscila entre valores positivos e negativos para as concentrações de metal mais elevadas. Dado que é expectável que ocorra a libertação de metal, na forma iónica ou não, quando em contacto com o eletrólito, esta libertação pode ocorrer de forma diferenciada para as diferentes concentrações levando à variação do potencial zeta em função da composição química. No caso do sistema de sílica e cobre, a estrutura é composta por uma matriz de sílica com partículas de dimensões nanométricas de óxido de cobre. Este é um cerâmico não iónico, o que implica que terá ligações químicas mais resistentes à ionização do que a prata ou o cobre metálicos. Assim, é natural que o potencial zeta aumente de -82mV para -31mV com o aumento do teor de cobre.

A técnica utilizada para avaliar o potencial zeta, porque ocorre em condições dinâmicas permitiu observar, macroscopicamente a falta de adesão de alguns revestimentos, bem como a elevada reatividade superficial de outros (Fig.3.26 e Tabela 3.14). Por estes motivos também estas superfícies não foram consideradas como adequadas para o objetivo proposto neste trabalho.

A adesão é, obviamente, uma característica fundamental dos revestimentos qualquer que seja a sua utilização pois a falta de adesão inutiliza completamente o trabalho de desenvolver uma superfície com um desempenho melhorado em relação ao material maciço. O teste semiquantitativo que foi possível fazer concomitantemente com a determinação do potencial zeta não é suficiente para avaliar da verdadeira adesão dos filmes finos que, aparentemente, não mostraram problemas durante o teste. No entanto, qualquer ensaio padrão de adesão, nomeadamente o de indentação deslizante (“*scratch test*”), é demasiado agressivo para ter resultados credíveis. Acresce o facto de não ser possível efetuar este teste quando o revestimento se encontra depositado sobre silício devido à fragilidade do material que constitui o substrato. Assim, foi considerado o estudo de avaliação da adesão através dum ensaio já descrito na literatura <sup>[149]</sup>. Para tal foi utilizado um gel de ágar que, de acordo com o sumariado na figura 3.27 é utilizado em vários estudos para mimetizar o comportamento do tecido do cérebro <sup>[220]</sup>.



**Figura 3.26** - Fotografias de lâminas de vidro após o ensaio de potencial zeta: a) sem alteração aparente (sim em adesão); b) com alteração visual (reagiu em adesão); c) falta de revestimento no final do ensaio (não em adesão).



Propriedade	Cérebro	Gel de ágar
Tipo de material	Poroso e elástico	Poroso e elástico
Homogeneidade	Não homogêneo	Homogêneo
Isotropia	Anisotrópico	Isotrópico
Propriedade ótica	Opaco	Transparente
Disponibilidade	limitada	ilimitada

**Figura 3.27** – Comparação de propriedades entre o cérebro e gel de ágar <sup>(adaptado de 220)</sup>.

No caso de elétrodos para utilização como implantes neuronais, a principal solicitação vem da inserção do material no cérebro e do seu correto posicionamento. Com efeito, por vezes é necessário confirmar se a localização é a correta, e, caso não o seja, é necessário retirar e inserir o eletrodo mais do que uma vez. Por este motivo foi simulada a inserção de agulhas de Si, após revestidas, no cérebro ao utilizar um equipamento desenvolvido de propósito para as inserir em ágar-ágar. Na tabela 3.14 estão resumidos os resultados dos ensaios.

**Tabela 3.14** – Avaliação da adesão dos filmes finos ao substrato de silício pelo ensaio de inserção em ágar.

Designação	Adesão	Designação	Adesão
SiO2	sim	SiAgAu1	
SiAg1		SiAgAu2	
SiAg2		SiAgAu3	sim
SiAg3		SiAgAu4	
SiAg4		SiAgAu5	
SiAg5	sim	SiAgAu6	
SiAg6		SiAgAu7	não
SiAg7		SiAgAu8	sim
SiAg8		SiAgAu9	
SiAu1		SiAgAu10	não
SiAu2	sim	SiCuAg1	
SiAu3		SiCuAg2	
SiAu4	não	SiCuAg3	
SiAu5		SiCuAg4	sim
SiAu6	sim	SiCuAg5	
SiAu7		SiCuAg6	
SiAu8	não	SiCuAg7	
SiCu1		SiCuAg8	não
SiCu2		SiCuAg9	
SiCu3		SiCuAg10	sim
SiCu4	sim	SiCuAu1	
SiCu5		SiCuAu2	
SiCu6		SiCuAu3	sim
SiCu7		SiCuAu4	
SiCu8	não	SiCuAu5	
		SiCuAu6	
		SiCuAu7	Não
		SiCuAu8	Sim

### Capítulo 3

Apesar de se tratar um ensaio que não é muito agressivo para as amostras, foi imprescindível para saber se os filmes iriam manter a integridade estrutural aquando da sua inserção. Os filmes com maior concentração dos elementos metálicos foram os que demonstraram menor adesão, possivelmente porque não foi possível fazer uma transição progressiva entre o silício dos substratos, a sílica e os elementos metálicos. Com efeito, que já aquando da avaliação da morfologia (*c.f.* subcapítulo 3.2) foi referido que uma possível explicação para a morfologia dos filmes dos sistemas de sílica dopada com cobre ou ouro, sobretudo para os mais elevados teores destes elementos, seria a falta de adesão entre a sílica e o elemento metálico. A sobreposição das forças coesivas do elemento metálico em detrimento das adesivas para com o cerâmico podem ter a sua origem na falta de molhabilidade dos dois materiais devido à disparidade nos valores de energia superficial.

Outra observação que deve ser realçada é o facto de que alguns dos sistemas que cumpriram positivamente neste teste de adesão não o fizeram durante o teste dinâmico da medição da carga superficial. A hipótese de que os resultados distintos se podem dever ao facto de os substratos em que foram avaliados serem distintos (Si neste teste e vidro no teste de potencial zeta) não deve ser válida dado que, por uma questão de compatibilidade química seria expectável maior adesão dos filmes finos à base de sílica com o vidro (essencialmente  $\text{SiO}_2$ ) do que com o silício. Por este motivo não deve ser descurada a questão das condições dinâmicas em que ocorreu o teste anterior e que indica a necessidade de testar a superfície de biomateriais em condições o mais semelhante possível à utilização real.

Antes de efetuar o estudo do desempenho das superfícies com células procarióticas e eucarióticas são apresentados (nas tabelas 3.15 e 3.16) as principais propriedades/características dos revestimentos, que serviram para realizar a triagem das amostras a serem submetidas a testes bióticos.



**Tabela 3.15** – Resumo das principais propriedades/características dos revestimentos de sílica codepositados com um metal (A sombreado estão assinaladas as superfícies que foram excluídas para os testes *in vitro*).

Designação	Adesão	Ângulo de contacto (°)	Potencial Zeta (mV)	Módulo de elasticidade (GPa)
SiO2	✓	41,1	-88,1	86,5
SiAg1	✓	32,2	-76,3	73,3
SiAg2	✓	46,2	-50,0	91,4
SiAg3	✓			96,3
SiAg4	✓	49,2	-64,7	99,8
SiAg5	✓			106,2
SiAg6	✓	49,1	62,0	131,2
SiAg7	✓	53,3	87,9	147,0
SiAg8	✗	82,8	-56,0	135,1
SiAu1	✓	88,6	-82,4	72,5
SiAu2	✓	97,6	-52,7	64,9
SiAu3	✓	53,7	-76,0	85,1
SiAu4	✗	54,1	-46,4	71,0
SiAu5	✓	53,7	-71,1	80,9
SiAu6	✓	86,5	68,1	59,7
SiAu7	✓		34,5	139,6
SiAu8	✗	14,0	-51,0	148,4
SiCu1	✓	51,9	-82,4	108,6
SiCu2	✓	56,2	-81,9	72,8
SiCu3	✓			78,0
SiCu4	✓			73,0
SiCu5	✓	84,2	-84,6	66,0
SiCu6	✓	75,9	-62,5	60,8
SiCu7	✓	63,3	-31,5	124,2
SiCu8	✗	52,8	-509,6	179,3

**Tabela 3.16** – Resumo das principais propriedades/características dos revestimentos de sílica codepositados com dois metais (A sombreado estão assinaladas as superfícies que foram excluídas para os testes *in vitro*).

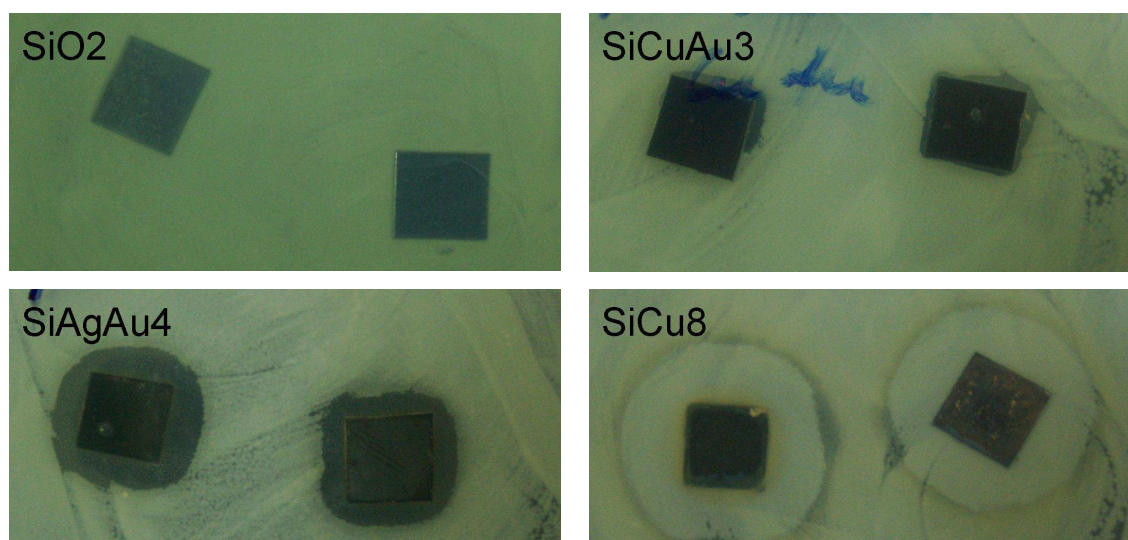
Designação	Adesão	Ângulo de contacto (°)	Potencial Zeta (mV)	Módulo de elasticidade (GPa)
SiAgAu1	✗	42,5	-65,5	54,1
SiAgAu2	✓	17,9	-71,2	63,1
SiAgAu3	✓			55,4
SiAgAu4	✓	40,4	-70,4	60,2
SiAgAu5	✓	80,2	-32,9	75,8
SiAgAu6	✓			117,5
SiAgAu7	✗			153,2
SiAgAu8	✓		-13,7	127,9
SiAgAu9	✓			137,1
SiAgAu10	✗			152,0
SiCuAg1	✓	38,4	-83,9	75,5
SiCuAg2	✓	75,7	-46,3	84,6
SiCuAg3	✓	64,9	-74,3	83,4
SiCuAg4	✓	60,7	-51,5	116,2
SiCuAg5	✓	41,4		86,3
SiCuAg6	✓			43,2
SiCuAg7	✓	70,1	-43,2	112,2
SiCuAg8	✗			86,6
SiCuAg9	✗	65,6	-100,5	114,0
SiCuAg10	✓			108,0
SiCuAu1	✓			73,6
SiCuAu2	✓	64,9	45,6	81,7
SiCuAu3	✓	63,6	-34,8	97,4
SiCuAu4	✓	85,9	-195,6	102,7
SiCuAu5	✓	71,4	-51,9	120,6
SiCuAu6	✓	53,8	-91,8	59,4
SiCuAu7	✗	68,7	-472,9	110,3
SiCuAu8	✓			130,1

### 3.7 Testes *in vitro*

#### 3.7.1 Células procarióticas

O conjunto de caracterizações acelulares efetuado evidenciou que nem todas as superfícies modificadas apresentam as propriedades/características apropriadas para serem utilizados como revestimentos de implantes neuronais de silício. Por este motivo apenas alguns dos filmes finos foram selecionados para serem testados *in vitro*.

Os testes com células procarióticas avaliaram a capacidade das superfícies inibirem o crescimento das estirpes bacterianas selecionadas, através do teste do halo de inibição (imagens no Apêndice 2.1). No decurso destes testes foram observados halos de inibição, em algumas das superfícies testadas, que variavam entre 1 e 8mm de diâmetro (Fig. 3.28). Alguns deles eram assimétricos, o que se pode justificar pelo facto de poder ter ocorrido algum deslizamento das superfícies testadas sobre a superfície do meio de cultura sólido. Também o facto de se a superfície do meio de cultura não se apresentar perfeitamente horizontal e paralelo à base pode contribuir para a deslocação do material em teste durante a sua duração. Algumas das superfícies testadas não deram origem a um halo de inibição perfeitamente delineado, mas sim a uma alteração da coloração. Esta normalmente é devida a uma menor densidade de biofilme bacteriano o que indica uma menor capacidade de induzir inibição, para o tempo de duração do teste. Na tabela 3.17 estão sumariados os resultados observados neste teste.



**Figura 3.28** - Fotografias representativas dos resultados observados durante o teste de formação do halo de inibição: SiO<sub>2</sub> sem halo de inibição; SiCuAu<sub>3</sub> com halo de inibição assimétrico; SiAgAu<sub>4</sub> com halo de inibição de 4mm; SiCu<sub>8</sub> com alteração da coloração.

**Tabela 3.17** – Resultados da presença ou ausência do halo de inibição de crescimento bacteriano e características do mesmo após contacto com as superfícies revestidas.

Designação	Características do halo de inibição		
	<i>A. lwoffii</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Si	Ausência de halo	Ausência de halo	Ausência de halo
SiO <sub>2</sub>	Ausência de halo	Ausência de halo	Ausência de halo
SiAg2	Ausência de halo	Ausência de halo	Ausência de halo
SiAg4	Halo 2mm	Halo 2mm	Halo 5mm
SiAg8	Halo 1mm assimétrico	Ausência de halo	Halo 2mm assimétrico
SiAu3	Halo 1mm assimétrico	Halo 1mm assimétrico	Ausência de halo
SiAu5	Ausência de halo	Halo 2mm assimétrico	Ausência de halo
SiAu8	Ausência de halo	Ausência de halo	Ausência de halo
SiCu1	Halo 1mm assimétrico	Halo 1 mm assimétrico	Halo 5mm assimétrico
SiCu2	5mm com coloração diferente	Ausência de halo	Ausência de halo
SiCu8	8mm com coloração diferente	Halo 1mm assimétrico	Ausência de halo
SiAgAu4	Halo 4mm	Halo 4mm	Halo 6mm
SiCuAg2	Ausência de halo	Halo 1mm assimétrico	Ausência de halo
SiCuAu3	Halo 2 mm assimétrico	Halo 2mm assimétrico	Halo 1 mm assimétrico

Em termos genéricos os resultados evidenciam que a bactéria *A.lwoffii* é sensível aos 3 metais quando considerados isoladamente. A *E. faecalis* aparenta ser mais sensível ao ouro e ao cobre quando estes metais se encontram isolados na matriz de sílica, mas é a única bactéria testada que é sensível a qualquer uma das combinações de metais reportadas. *P. aeruginosa* não parece ser sensível ao ouro, já que não se observou qualquer halo de inibição para as concentrações testadas e nas superfícies com conjugação de dois metais apresenta um comportamento semelhante ao de *A. lwoffii*.

Um halo de inibição macroscópico significa, nas amostras testadas, que houve libertação de metal(is) para o meio, e a sua difusão criou uma zona com concentração suficiente para inibir a proliferação de bactérias. Contudo, a libertação e a difusão estão limitadas pela facilidade com que determinado elemento metálico consegue sair da matriz cerâmica, pelo seu estado químico de oxidação e pela sua concentração na superfície do meio sólido. Para tentar compreender melhor a observação macroscópica efetuada a

superfície dos filmes finos foi observada em microscopia ótica após o teste do halo de inibição (Fig. 3-29 – Fig. 3.31).

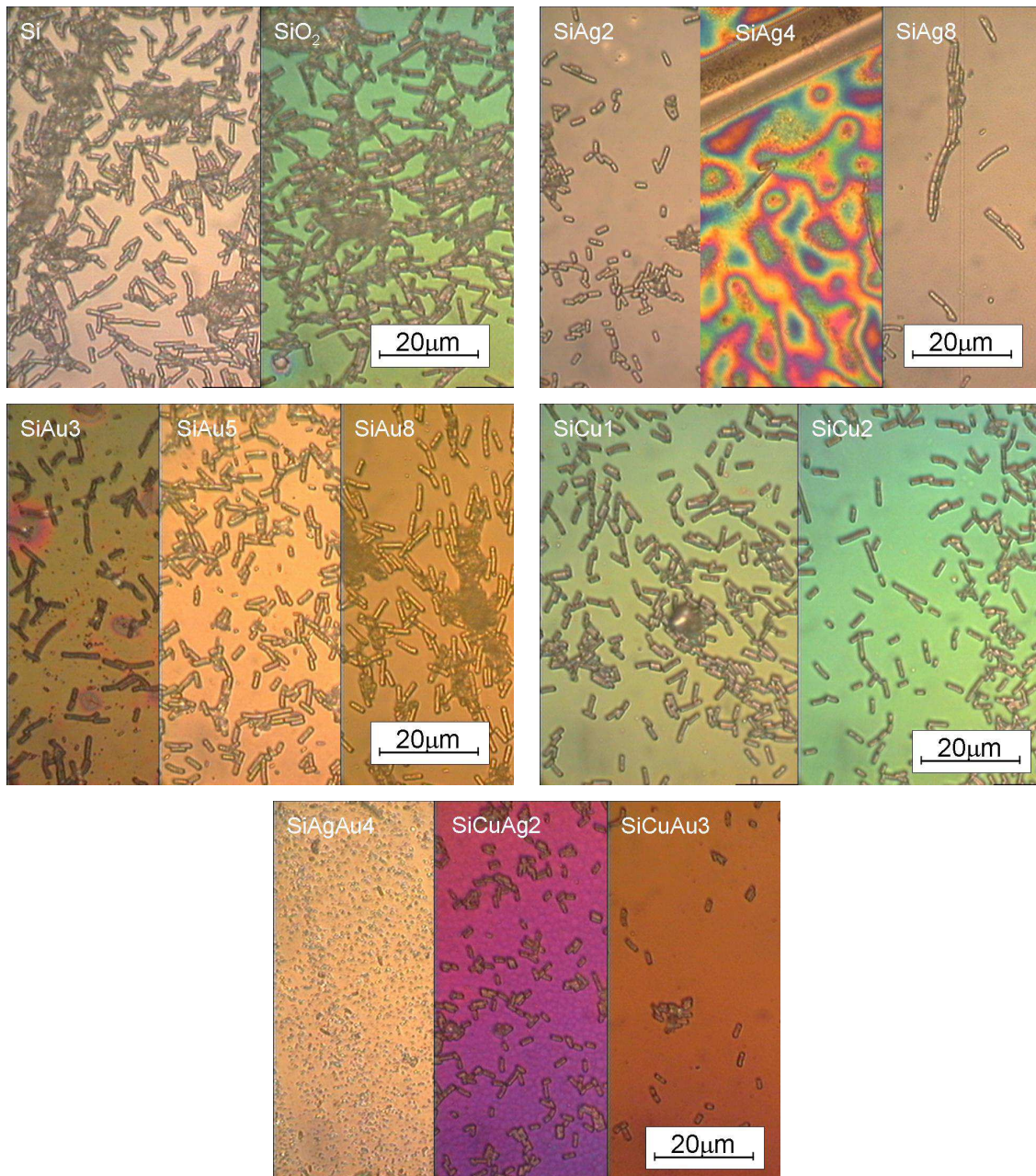
*A. lwoffii* tem a forma de um bastonete com cerca de 1 a 1,5µm de diâmetro e 2 a 2,5 de comprimento. Esta estirpe adere e prolifera na superfície do silício e da sílica, apresentando uma morfologia semelhante à reportada na literatura<sup>[221]</sup> (Fig. 3.28). Contudo, quando estão em contacto com a sílica dopada com prata, a sua densidade é muito inferior, mesmo na superfície SiAg2, que não apresentava halo de inibição visível a nível macroscópico. Na superfície SiAg8 as bactérias assumem a forma de um bastonete mas com um comprimento superior ao normal, o que indica que a prata, nas concentrações alcançadas, é mutagénica para esta estirpe bacteriana<sup>[81]</sup>. Com efeito, a prata pode desenvolver o seu efeito antibacteriano por contacto direto sob a forma metálica ou devido à ação dos seus iões ou pela ação conjugada das duas vias<sup>[222]</sup>. A ligação da prata, sobretudo sob a forma iónica, pode desenvolver o seu efeito antibacteriano por diversas vias, sendo uma delas é a sua ligação direta ao DNA. Nestes casos é normal observar-se o aumento da dimensão das células mas sem a capacidade de efetuar a divisão de material, aumentando a sua dimensão. Tal efeito culmina com a morte celular, sendo por isso uma forma de evidenciar o efeito antibacteriano. A maior densidade celular observada nesta superfície quando comparada com SiAg4 pode ser uma consequência da molhabilidade distinta apresentada por estas duas superfícies: enquanto SiAg4 é uma superfície hidrófila, portanto menos compatível com as células bacterianas que são genericamente hidrófobas<sup>[223-224]</sup>, SiAg8 é uma superfície hidrófoba, o que poderá facilitar a etapa de adesão irreversível durante a colonização bacteriana induzindo uma maior densidade celular.

Nas superfícies com ouro temos que considerar a eletroquímica dos metais, nomeadamente o facto de a prata poder sofrer oxidação ( $E^0\text{Ag}/\text{Ag}^+ = -0,80 \text{ V}$ ) e ser libertada sob a forma de nanopartículas ou de iões e no caso do ouro a sua oxidação, para dar origem a formação e libertação de iões, ser electroquimicamente muito desfavorável ( $E^0\text{Au}/\text{Au}^+ = -1,68 \text{ V}$ ). Por este motivo a atividade antimicrobiana deverá ser exclusivamente devida às partículas de dimensões nanométricas que se libertam da matriz do nanocompósito. Neste caso, a internalização das nanopartículas de ouro, devido à sua reduzida dimensão, não causa *stress* oxidativo nas células, devido à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) tal como acontece com a maioria dos antibióticos e nanomateriais com propriedades bactericidas. No caso do ouro o efeito antimicrobiano pode ser induzido por dois mecanismos: um induz o colapso do potencial da membrana,



### Capítulo 3

pela inibição da atividade da ATPase; o outro atua pela ligação do metal ao tRNA, inibindo subunidades ribossômicas [99].



**Figura 3.29-** Fotografias de microscopia ótica das superfícies após o teste de formação do halo de inibição com *A. lwoffii*.

Das superfícies testadas apenas foi visível a formação do halo de inibição em SiAu3. Nesta superfície as bactérias apresentam uma morfologia normal apesar da sua

densidade celular ser inferior à observada nas superfícies de Si e SiO<sub>2</sub>. Apesar de ser a amostra com menor concentração de ouro é a única que apresenta halo de inibição e tal facto poderá ser consequência de uma menor velocidade de libertação das partículas do metal a partir da matriz de sílica. Com efeito, tal como referido anteriormente (cf. 3.2) é provável que, para concentrações superiores do metal, o ligeiro aumento do tamanho das partículas de ouro embebidas na matriz de sílica dificulte a sua libertação. Acresce o facto de poder ocorrer superficialmente. Uma maior dimensão das nanopartículas imersas na matriz de sílica, ou a maior proximidade entre elas, pode levar a uma menor libertação, apesar da sua concentração global no filme fino ser superior. Por outro lado, ainda que a cinética de libertação seja semelhante em todas as amostras, a maior dimensão das partículas de ouro (ainda que dimensões nanométricas) poderá ser um entrave à sua internalização e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do efeito antimicrobiano.

As amostras de sílica dopada com cobre demonstraram ser das mais eficazes no efeito antibacteriano pela libertação de nanopartículas ou iões. Com efeito, a literatura refere que no caso de cobre quer o elemento metálico quer os seus óxidos apresentam efeito antimicrobiano essencialmente devido à libertação de cupriões, mas também pela criação de radicais por nanopartículas de óxido de cobre <sup>[225]</sup>.

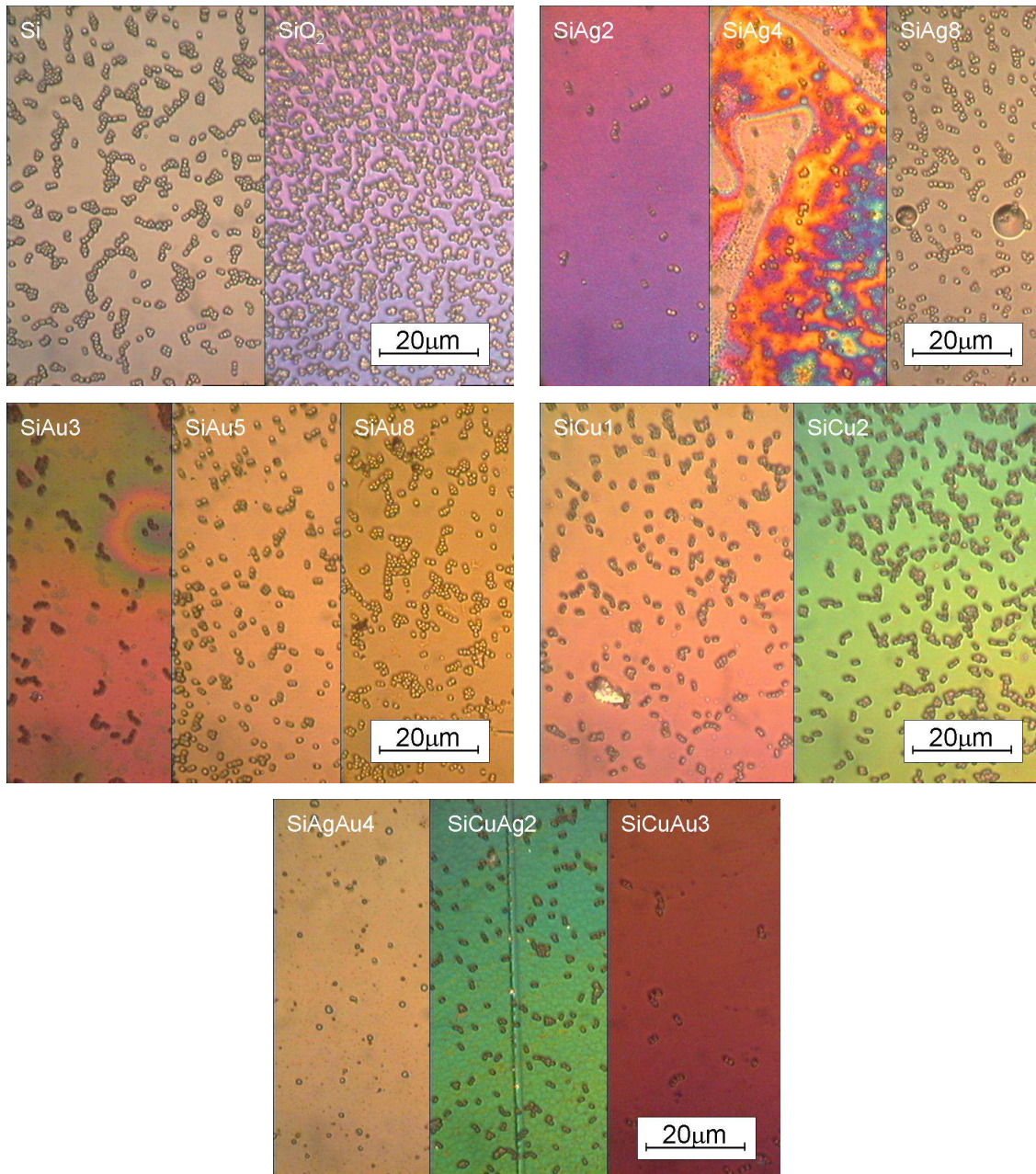
Quando são utilizados dois metais para dopar a sílica, qualquer uma das combinações testadas diminuiu a densidade de bactérias observadas nas superfícies após o teste. Contudo, a combinação de cobre e prata não foi tão eficaz quanto as outras combinações de metais testadas, e também não produziu um halo de inibição. Tal facto poderá ser consequência de o efeito de oxidação e libertação de iões cobre não ser electroquimicamente tão eficaz devido à pouca diferença de potenciais de oxidação dos metais envolvidos. A combinação de ouro e cobre (elementos com maior diferença de potenciais de oxidação) foi eficaz tanto na formação como na dimensão do halo de inibição, como na redução do número de bactérias. Contudo, a combinação de ouro e prata foi a mais eficaz, porque induziu o halo de inibição com o maior diâmetro e teve a menor concentração de bactérias à superfície. Apesar da diferença de potenciais de oxidação ser menor do que no caso Au/Cu o potencial antimicrobiano da prata parece ser superior ao do cobre. Neste sistema acresce o facto de a superfície apresentar um valor de potencial zeta mais negativo do que as outras duas superfícies testadas (-70 mV contra -46 e -34 mV) o que dificulta a fase inicial de adesão celular.



### Capítulo 3

A bactéria *E. faecalis* pertence à família dos coccus, caracterizadas por apresentarem uma morfologia esférica. Contrariamente a *A.lwoffii* esta estirpe é Gram+ pelo que a sua parede celular é menos resistente do que a das bactérias Gram-.

As superfícies de silício e de sílica não se mostraram eficazes em diminuir a sua concentração nem em produzir halo de inibição, tal como seria de esperar (Fig. 3.29).



**Figura 3.30-** Fotografias de microscopia ótica das superfícies após o teste de formação do halo de inibição de *E. faecalis*.



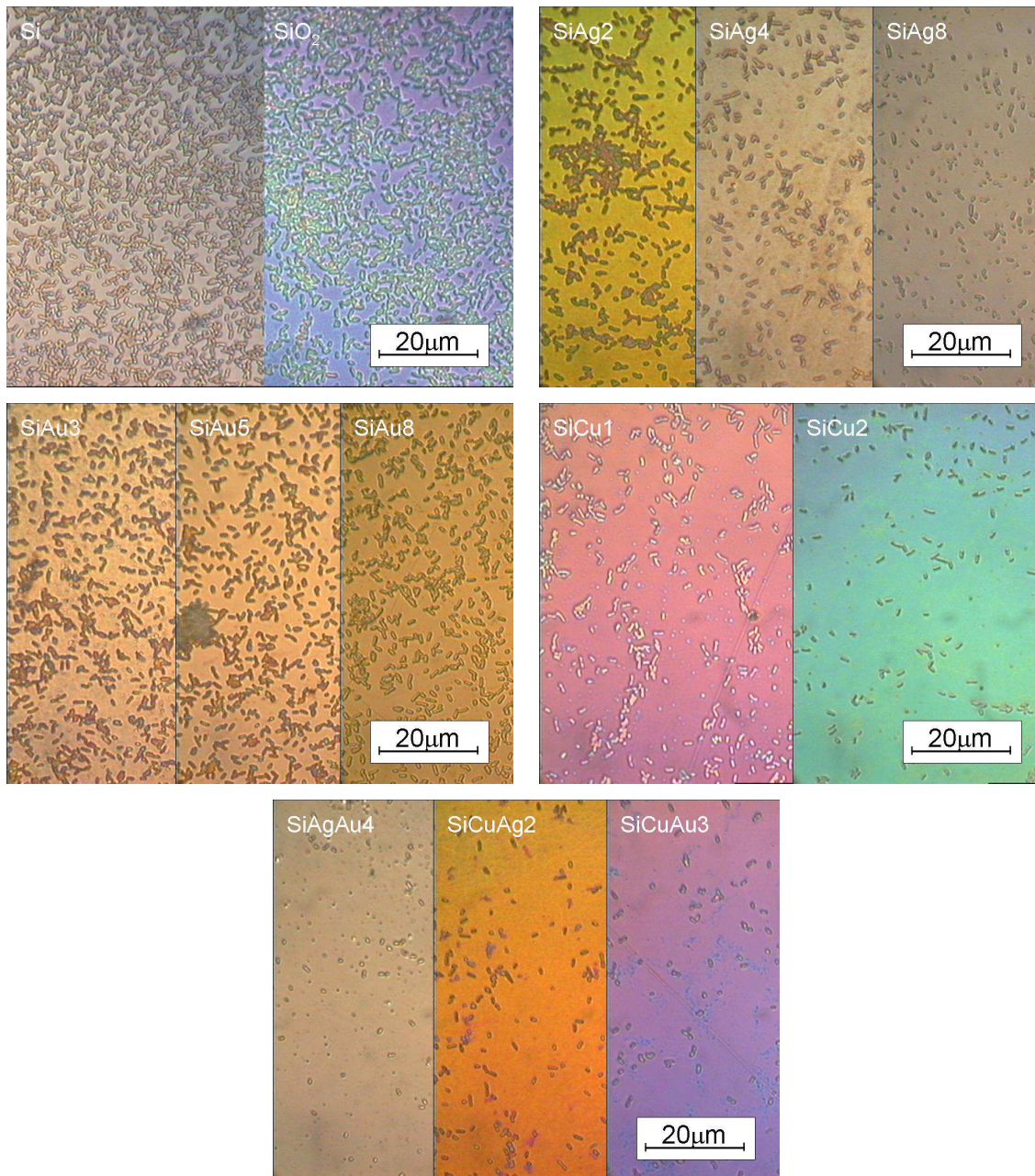
As superfícies com prata foram eficazes na diminuição da densidade celular e, uma delas, na formação do halo de inibição. No entanto a superfície de prata “pura” não apresentou nem diminuição da densidade celular, quando comparada com o silício, nem halo de inibição. Tal facto pode ser consequência de uma menor energia de superfície (indicada pelo valor mais elevado do ângulo de contacto) o que implica maior estabilidade superficial, logo menor apetência a sofrer oxidação e a libertar iões. A orientação preferencial que esta superfície apresentou é uma das razões deste comportamento.

No caso das superfícies com os outros dois metais estudados, ouro e cobre, o comportamento foi semelhante ao observado nos testes com *A.lwoffii* onde apenas nas menores concentrações é visível, pelo teste do halo de inibição, o efeito antibacteriano. O cobre, apesar de apresentar halo de inibição na SiCu1, não é tão eficaz quanto a prata em relação ao número de bactérias na superfície.

Quando se trata da combinação de dois metais, todas as superfícies testadas deram origem há formação de um halo de inibição visível, o que realça a contribuição da espécie bacteriana, neste caso de diferente composição da parede celular, para que determinado material apresente ou não efeito antibacteriano. Em termos de concentração de bactérias, e novamente à semelhança do observado anteriormente, a superfície com cobre e prata apresenta uma maior colonização de bactérias, apesar de inferior ao silício e à sílica. Também nesta estirpe a superfície com dois metais aparentemente mais eficaz é a SiAgAu.

*P.aeruginosa* é uma bactéria também com a forma de bastonetes, Gram+ e, à semelhança bactérias anteriores, também adere e prolifera nas superfícies de silício e sílica (Fig. 3.30). O aumento da concentração de prata reduz o número de bactérias que adere à superfície do revestimento, enquanto o ouro nem produz um halo de inibição nem reduz de forma significativa o número de bactérias na superfície. O cobre só produz um halo de inibição visível na menor concentração, mas a concentração de bactérias é visivelmente inferior nas duas amostras.

Apesar de não se refletir sempre no halo de inibição, a combinação dos dois metais reduz de forma significativa a concentração de bactérias na superfície. Contudo, se tivermos em conta o halo de inibição e a concentração de bactérias, a SiAgAu4 aparenta ser a melhor opção.



**Figura 3.31-** Fotografias de microscopia ótica das superfícies após o teste de formação do halo de inibição de *P. aeruginosa*.

Tal conforme o observado por outros autores o efeito antibacteriano de alguns metais em várias estirpes de bactérias, incluindo as utilizadas neste estudo [98, 222, 226, 227], a concentração necessária de metal para produzir um mesmo efeito antibacteriano é diferente consoante o micro-organismo estudado pois fatores como o tipo de parede celular, a fase de crescimento da bactéria (estacionário ou exponencial) e a capacidade de resistir melhor ou pior ao stress oxidativo são decisivos no tipo de resultado.

As observações efetuadas entre a formação do halo de inibição e a densidade e morfologia das bactérias nas superfícies testadas podem não ser completamente elucidativas dos testes antimicrobianos, razão pela qual foi efetuada a avaliação da toxicidade das superfícies em estudo. Este consistiu na avaliação do número de colónias formadas (CFU) após contacto do pré-inóculo de *A.lwoffii* com uma solução de NaCl previamente incubada, durante 24 horas, com as superfícies em estudo. Ao efetuar a cultura da estirpe bacteriana com diferentes de tempos exposição à solução de NaCl foi possível avaliar qual o efeito dessa libertação (tabela 3.18). Este teste foi apenas efetuado com *A.lwoffii* pois esta é a única, das três estirpes selecionadas, capaz de induzir meningite, uma infeção associada ao cérebro que é o órgão alvo dos implantes em foco neste estudo<sup>[221]</sup>.

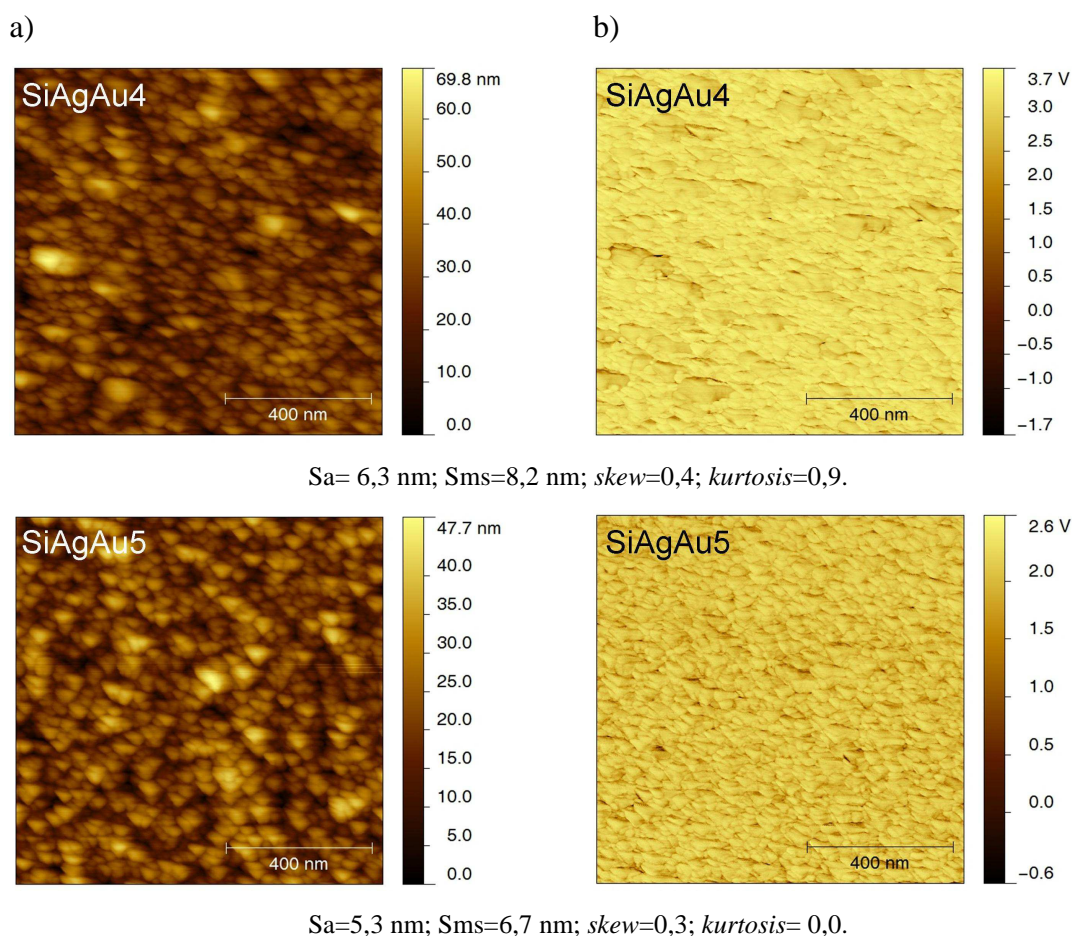
Os resultados (Apêndice 2.2) evidenciaram que ao fim de 4 horas em contacto com NaCl a viabilidade celular se encontra comprometida, com a maioria dos casos a apresentaram 100% de inibição, e em muitas situações logo ao fim de 1 hora. O cobre, tanto puro como em conjunto com ouro ou prata chegou a inibir o desenvolvimento de células com muito curto tempo de exposição de que é exemplo SiCu<sub>2</sub> teve promoveu 100% de inibição logo para t=0h. Este teste permitiu demonstrar que ocorre libertação material das superfícies para o soro fisiológico em concentração suficiente interferir com a viabilidade de *A. lwoffii*.

Este conjunto de resultados levou a que fosse efetuada uma caracterização topográfica, por AFM, das superfícies após 24h de imersão em NaCl (Fig. 3.32). As alterações observadas são mais evidentes na superfícies SiAgAu<sub>5</sub> pois tem maior concentração de elementos metálicos. Mais importante do que a comparação dos valores da rugosidade é a avaliação da variação dos parâmetros adimensionais. Com efeito, nesta superfície o valor de skew desce de 2,1 para 0,3 e o de kurtosis de 5 para 0. Tal facto aponta para um nivelamento da superfície que deixou de apresentar um perfil onde os picos, de perfil aguçado, eram predominantes em relação aos vales, para ter uma topografia equilibrada entre vales e picos com um perfil arredondado. Este resultado reforça que há libertação de material das superfícies em estudo o que depois se traduz no efeito antibacteriano observado.

**Tabela 3.18** – Variação da percentagem de inibição na formação de CFU de *A.lwoffii* com o tempo de exposição a soro fisiológico anteriormente incubado com as superfícies

Designação	Percentagem de inibição na formação de CFU após vários tempos de contacto com NaCl		
	0 h	1h	4h
Si	0	0	0
SiO2	0	0	0
SiAg4	0	100	100
SiAg8	0	72	79
SiAu3	37	100	100
SiCu1	40	70	100
SiCu2	100	100	100
SiCu8	100	100	100
SiAgAu4	0	100	100
SiAgAu5	0	100	100
SiCuAg2	76	100	100
SiCuAu3	72	100	100

Após este primeiro conjunto de testes celulares pode ser concluído que algumas das superfícies modificadas são promissoras na inibição de potenciais infeções nosocomiais. Com efeito, das superfícies avaliadas a SiAgAu4 é a que demonstrou induzir halos de inibição nas 3 estirpes estudadas, bem como 100% de inibição da viabilidade celular, sendo por isso a superfície selecionada para os testes com células neuronais.



**Figura 3.32** - Imagens por microscopia de força atômica da superfície dos filmes de sílica SiAgAu4 e SiAgAu5 após imersão em soro fisiológico: a) topografia; b) fase.

### 3.7.2 Células Eucarióticas

Para a realização dos testes bióticos com células eucarióticas foram selecionadas as superfícies que tiveram um bom desempenho nos ensaios com células procarióticas. Com efeito, considerando que a aplicação final pressupõe, além de um melhor desempenho biológico do que o silício, um efeito antimicrobiano, os testes anteriores serviram também para efetuar uma seleção das superfícies de acordo com o seu desempenho. Acresce o facto de o potencial zeta ( $\zeta$ ) assumir, para a seleção de superfícies, um papel preponderante dado que o potencial de membrana dos neurónios em repouso é



### Capítulo 3

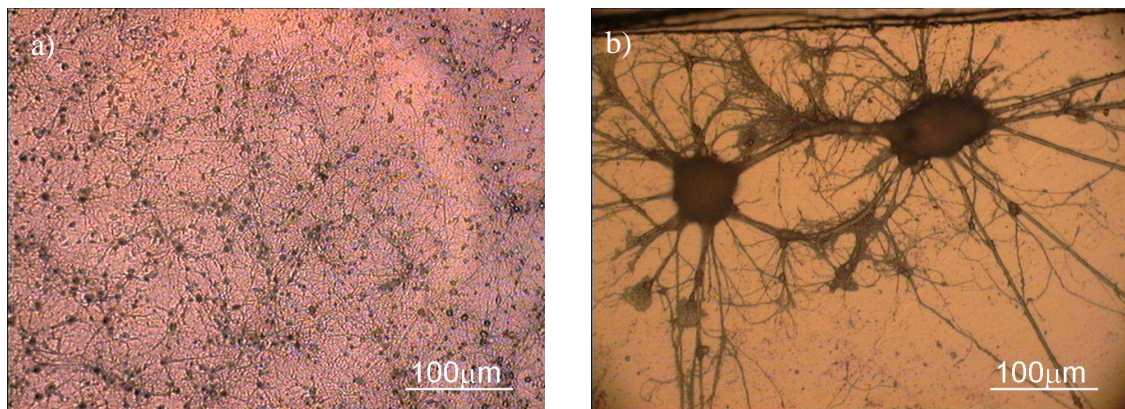
de -70 mV e o valor do potencial zeta da membrana exterior das células do sistema nervoso ronda os -20 mV, apresentando algumas variações consoante o tipo de célula<sup>[228]</sup>. Tal implica que a utilização de superfícies de implantes neuronais com carga negativa pode impedir a adesão das células neuronais devido às forças de repulsão. Por este motivo, e como anteriormente referido, a carga da superfície da poli-D-lisina, um homopolímero utilizado frequentemente para revestir lamelas de vidro usadas para estudos *in vitro* com culturas de células neuronais, é ligeiramente positiva. A carga desta superfície foi medida experimentalmente no decurso deste trabalho, nas condições experimentais usadas para a avaliação da carga das superfícies desenvolvidas, tendo sido registado o valor de  $+2 \pm 4$  mV.

Por outro lado, e de acordo com o anteriormente referido, a carga superficial negativa da superfície de biomateriais pode desempenhar um papel facilitador da ação antibacteriana devido à carga negativa apresentada pela generalidade das células procarióticas. No entanto, tem que ser considerado que o sucesso da modificação da superfície dos implantes neuronais passa também pelo facto de não interferir com a vascularização do tecido neuronal, nomeadamente, não serem superfícies facilitadoras ou indutoras da formação de trombos. Neste aspeto particular, e considerando que a carga superficial dos glóbulos vermelhos é negativa, variando entre valores de -30 e -23 mV<sup>[229]</sup>, a inserção de superfícies com carga positiva no tecido cerebral pode induzir a adesão e aglomeração de glóbulos vermelhos e potenciar a formação de trombos. Assim, para além do desafio colocado pelo sistema biológico muito complexo em que vão ser utilizadas as superfícies desenvolvidas, há o problema acrescido de a carga da superfície ter que apresentar valores que possam promover a adesão celular, evitar a adesão bacteriana e evitar a adesão de glóbulos vermelhos e conseqüentemente a formação de trombos sanguíneos.

A carga da superfície dos filmes finos selecionados para os testes com células procarióticas, medidos após deposição, era de cerca de -50 mV. No entanto, para os testes com células eucarióticas as superfícies modificadas ficam imersas no meio de cultura por períodos de tempo variáveis que podem ir a um máximo de 14 dias. Por este motivo, as superfícies SiAg4, SiCu1, SiAgAu4 e SiCuAu3 foram imersas durante 24 horas no meio de cultura utilizado para os testes com células neuronais e, após lavagem com água desionizada, o valor da carga superfície foi novamente avaliado, em condições experimentais iguais às anteriormente utilizadas. Os valores de potencial zeta oscilaram entre -20 e -30 mV, para todas as amostras. O facto destes valores serem distintos do

obtido para o revestimento de sílica,  $-88$  mV, indica que para além da libertação do(s) elemento(s) metálico(s) ocorreu uma alteração na química superficial que originou o desenvolvimento de uma carga de superfície distinta da do material cerâmico, seja pela oxidação do metal ainda existente na superfície seja pela formação de novos compostos devido à reação com o meio.

Nos testes preliminares foi feita a cultura das células sobre poli-D-lisina (PDL) e sobre silício. A observação das superfícies em microscopia ótica mostrou diferenças claras no tipo de estruturas celulares presentes sobre o silício e sobre o vidro revestido com PDL (Fig. 3.33). Com efeito, enquanto a superfície com PDL evidencia que as células aderiram e se diferenciaram, ao longo dos 10 dias de cultura, havendo já a formação de uma rede neuronal, sobre o Si as células têm uma dimensão e forma completamente distintas<sup>[61,230]</sup>.

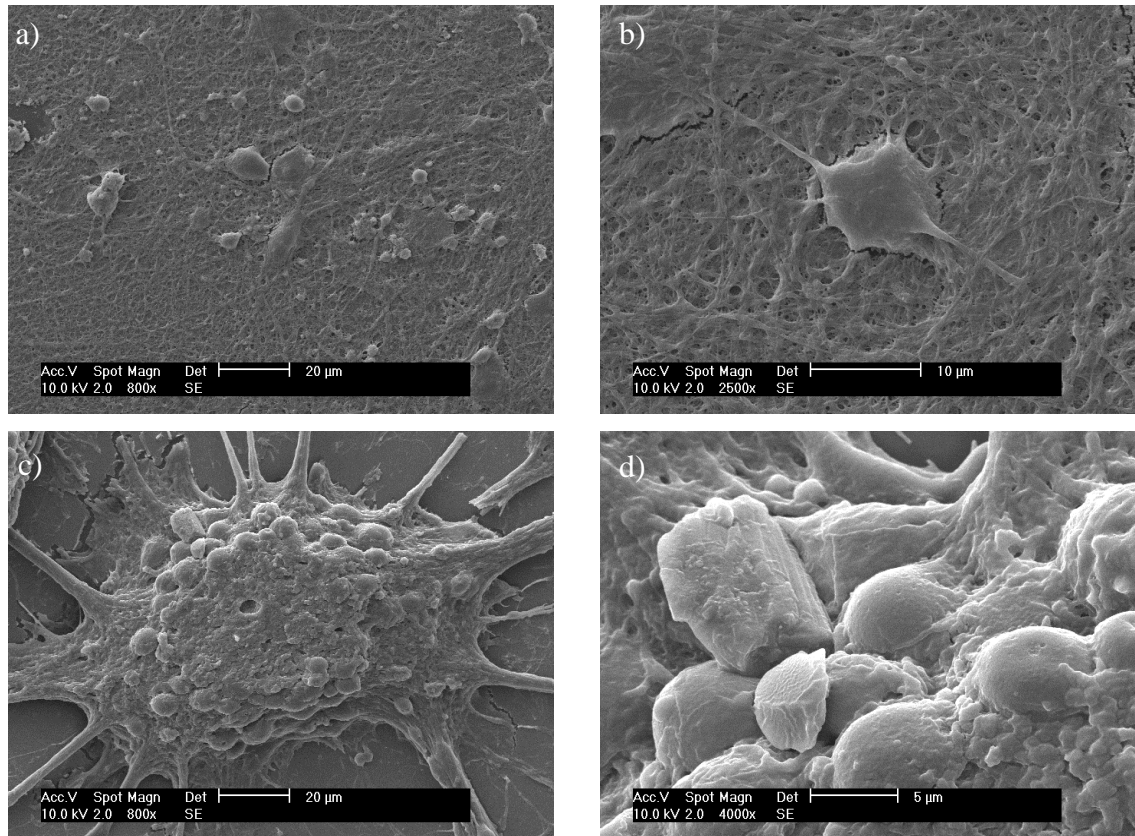


**Figura 3.33** – Neurónios do córtex cerebral mantidos em cultura sobre uma superfície de poli-D-lisina (a) ou de silício (b) durante 10 dias. As células foram observadas por microscopia ótica.

Para uma melhor observação da morfologia das células presentes nos dois tipos de superfícies recorreu-se à microscopia eletrónica de varrimento (Fig.3.34). Esta técnica permitiu confirmar a formação da uma rede neuronal sobre as superfícies revestidas com PDL. Nestas culturas as células apresentavam uma morfologia típica dos neurónios (Fig. 3.34a, b), indicando, tal como esperado, que a PDL é uma superfície adequada para a adesão e diferenciação de células neuronais. Pelo contrário, as células cultivadas sobre Si apresentaram aglomerados de corpos celulares a partir dos quais se projetam prolongamentos celulares com uma distribuição estrelada (Fig. 3.34c, d). Estes testes preliminares indicaram que o Si, enquanto material utilizado no fabrico de implantes

### Capítulo 3

neurónais não apresenta a compatibilidade biológica necessária para a manutenção da rede neuronal no local de implantação, como aliás referido por diversos autores, do qual um exemplo é o trabalho publicado por Wang e colaboradores<sup>[132]</sup>.

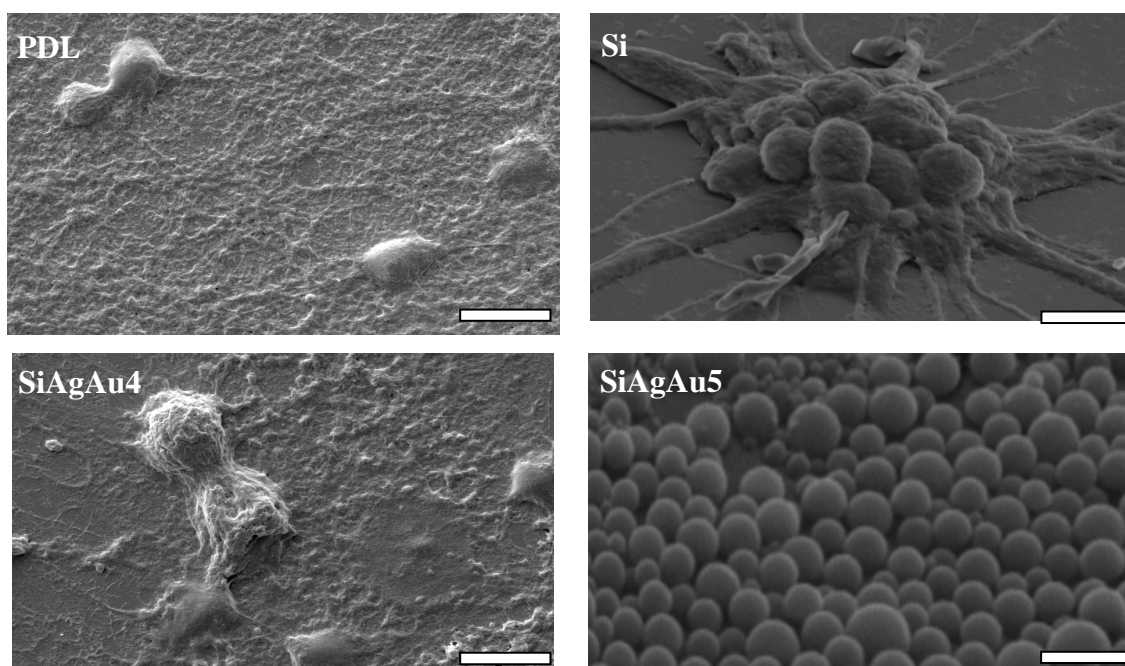


**Figura 3.34** – Neurónios do córtex cerebral mantidos em cultura sobre uma superfície de poli-D-lisina (a, b) ou de silício (c, d), durante 10 dias. As células foram observadas por microscopia electrónica de varrimento

Tendo em conta o valor de potencial zeta, a boa adesão ao substrato e o excelente desempenho antimicrobiano contra os três tipos de microrganismos testados, a superfície SiAgAu4 foi a selecionada para os testes *in vitro* com células eucarióticas e foram repetidos os testes em vidro revestido com PDL e em Si. Neste novo conjunto de testes foi também avaliado o comportamento da superfície SiAgAu5 para aferir do efeito de uma ligeira variação de composição química mas, sobretudo, para testar o efeito da menor hidrofobicidade da superfície, dado que nesta o ângulo de contacto com água é de cerca de 75° enquanto o ângulo medido na superfície SiAgAu4 é de cerca de 25°; o ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície com PDL é de cerca de 12°.



A observação por SEM permitiu confirmar os resultados anteriores no que concerne o comportamento das superfícies de PDL e Si (Fig. 3.35), e sobretudo permitiu concluir que uma pequena variação da composição química e, em particular, da molhabilidade da superfície desempenha um papel determinante no comportamento biológico. Com efeito, na superfície SiAgAu5 as células neuronais apresentam uma morfologia coincidente com a de células em processo apoptótico, enquanto na superfície SiAgAu4 foi observada a adesão e a diferenciação das células. Este comportamento distinto em superfícies hidrófilas e hidrófobas foi já observado por outros autores, para superfícies baseadas em sílica, quando em contacto com células endoteliais<sup>[231]</sup>. Com efeito, foi observado que este tipo de células apenas apresentava adesão em superfícies hidrófilas, enquanto a hidrofobicidade induzia a migração celular mas não a adesão.

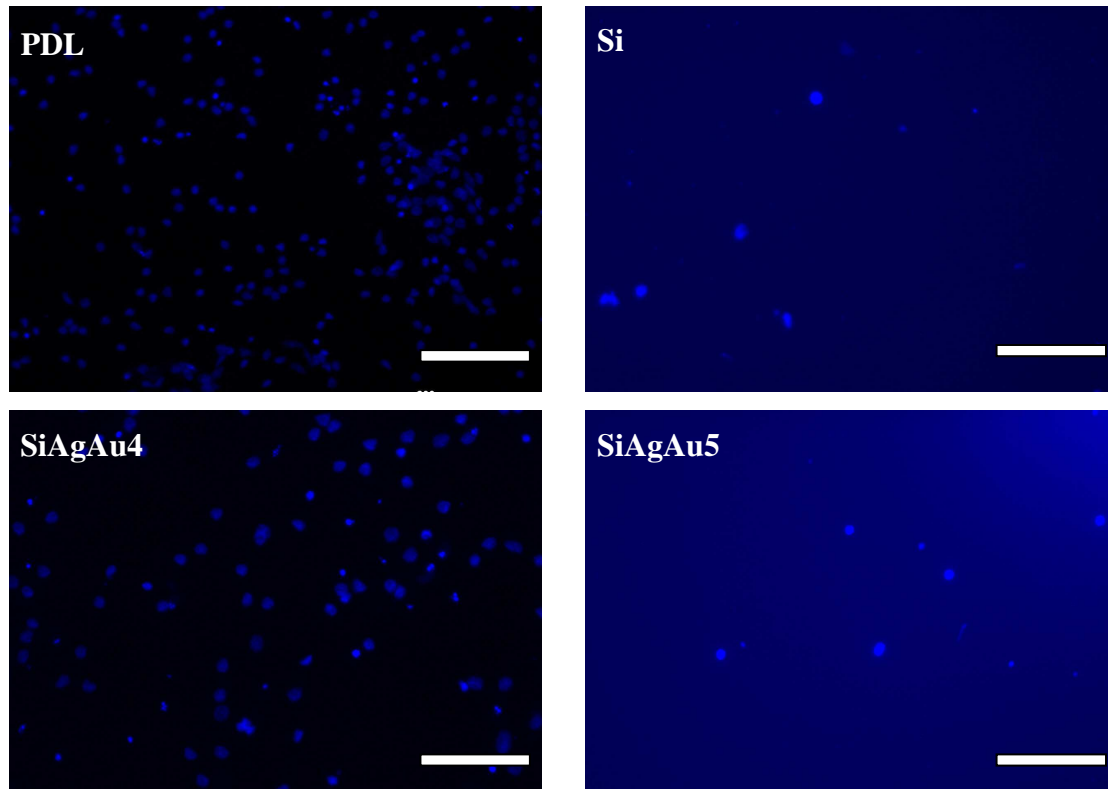


**Figura 3.35** - Neurónios do córtex cerebral mantidos em cultura sobre uma superfície de PDL, Si, SiAgAu4 ou SiAgAu5, durante 14 dias. As células foram observadas por microscopia electrónica de varrimento. (barra = 10  $\mu\text{m}$ )

A marcação do núcleo das células com Hoechst 33342 e a sua observação por microscopia de fluorescência permitiu complementar a observação inicial e evidenciar que o silício e a superfície SiAgAu5 não permitem assegurar a adesão e viabilidade celular. Os

### Capítulo 3

núcleos das células cultivadas sobre estas superfícies têm uma fluorescência azul muito intensa e brilhante normalmente associada a morte celular por apoptose (Fig. 3.36). Pelo contrário, os núcleos das células mantidas em cultura sobre a superfície SiAgAu4 apresentaram uma morfologia semelhante aos das células diferenciadas sobre PDL, ainda que com menor densidade.



**Figura 3.36** – Marcação de núcleos em culturas de células do córtex cerebral preparadas sobre superfícies de PDL, Si, SiAgAu4 ou SiAgAu5. As células foram cultivadas durante 14 dias antes da marcação com o corante de DNA Hoechst 33342. (barra = 200  $\mu$ m)

No conjunto, estes ensaios permitiram evidenciar o papel da hidrofiliicidade da superfície no comportamento das células neuronais. Com efeito, a rugosidade superficial de ambos os revestimentos é muito semelhante e, apesar de nanométrica, é superior à do silício (SiAgAu4= 4,3nm, SiAgAu5=6,8nm, Si=1,4nm). A falta de uma topografia mais acentuada à escala nanométrica também é apontada por muitos autores como sendo uma das razões para o pobre desempenho do silício neste tipo de implantes neuronais<sup>[130, 232,</sup>

<sup>233]</sup>. Por este motivo, muitas das modificações induzidas na superfície de implantes neuronais, independentemente do material ou da técnica utilizados, têm como objetivo o desenvolvimento de submicro- e nanotopografias<sup>[234,235]</sup>. Apesar da química de superfície ser diferente entre o silício e os revestimentos estudados deve referir-se que a superfície do silício também é hidrófoba, apresentando um ângulo de contacto com a água de cerca de 87° depois de removido o óxido superficial nativo. Assim, duas das superfícies testadas neste trabalho, Si e SiAgAu5, caracterizadas por uma molhabilidade semelhante, apesar de apresentarem química superficial e topografia distintas, induzem morte celular. Por outro lado, superfícies com composição química superficial e topografia semelhantes mostraram comportamentos distintos na adesão e diferenciação de células neuronais por possuírem molhabilidade distinta. A influência da hidrofobicidade é ainda mais relevante se considerarmos que a superfície SiAgAu4 apresenta valores de potencial zeta presumivelmente mais desfavoráveis à adesão celular do que a SiAgAu5.

Estes ensaios preliminares permitem concluir que, apesar de apresentarem um conjunto de propriedades/características semelhantes, as superfícies SiAgAu4 e SiAgAu5 apresentam molhabilidade distinta o que parece ser determinante para a adesão celular. Efetivamente, há estudos que demonstram que a molhabilidade da superfície tem um papel relevante na adesão de células neuronais e na formação de neurites<sup>[236]</sup>. Estes estudos indicam que valores intermédios do ângulo de contacto entre as superfícies e a água, ou seja entre os 40° - 60°, são os que apresentam melhor desempenho para com este tipo de células. Tal pode estar associado ao facto de a molhabilidade ser uma medida indireta da energia de superfície ( $\gamma_s$ ) e quando maior o ângulo de contacto (maior hidrofobicidade) menor  $\gamma_s$  e mais estável a superfície. Neste caso, a sua interação com o meio de cultura e com as próprias células é diminuto e a probabilidade de ocorrer adesão é menor. No caso oposto, em que os valores de  $\gamma_s$  são muito elevados, a que correspondem superfícies bastante hidrófilas, a reatividade da superfície torna-se excessiva o que, normalmente, induz a formação de uma camada tridimensional de água fortemente adsorvida na superfície do material que impede a ligação com os sistemas biológicos<sup>[207]</sup>.

A influência das propriedades mecânicas no desenvolvimento das culturas neuronais deve também ser considerada. Com efeito, foram efetuados estudos que evidenciam que as células do sistema nervoso são sensíveis à elasticidade intrínseca do substrato. Apesar das vias moleculares não estarem esclarecidas, os estudos demonstraram que miócitos, neurónios, astrócitos e células estaminais são sensíveis ao módulo de

### Capítulo 3

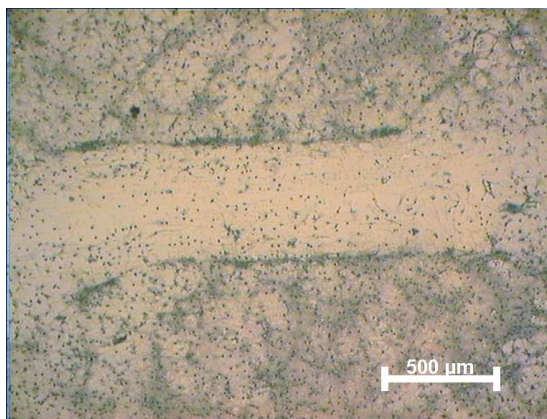
elasticidade e dureza do substrato<sup>[237-240]</sup>. Apesar de estes estudos terem sido efetuados em materiais poliméricos, se forem extrapolados para as condições aqui apresentadas pode observar-se que o Si apresenta uma dureza e módulo de elasticidade muito superior a qualquer um dos revestimentos testados:

Dureza - Si=10,4GPa, SiAgAu4=2,3GPa e SiAgAu5=2,5GPa.

Módulo de elasticidade - Si= 114,9GPa, SiAgAu4=60,2GPa e SiAgAu5=75,8GPa

Os estudos preliminares acima descritos permitiram eliminar a superfície SiAgAu5 e apenas considerar a modificação SiAgAu4 para os testes *in vitro* subsequentes. O primeiro conjunto de testes foi realizado em condições que favorecem a diferenciação de neurónios e, por isso, a cultura obtida não representa a diversidade celular existente no cérebro. Com efeito, na aplicação real os eléctrodos serão introduzidos no tecido cerebral que contém células da glia e neurónios diferenciados, com axónios e dendrites e que comunicam entre si nas sinapses. Por outro lado, a inserção do eléctrodo também provoca a lesão do tecido cerebral o que, por si só, pode induzir reações celulares em resposta ao trauma mecânico. De facto, há múltiplos mecanismos através dos quais um eléctrodo pode ser rejeitado pelo organismo e que incluem uma ativação desproporcionada das células da glia como resposta ao trauma mecânico. A médio e longo prazo esta reação normalmente induz uma inflamação crónica na área do implante ou a formação de uma cicatriz glial que irá encapsular e isolar o eléctrodo<sup>[60]</sup>. Por isso, foram efetuados novos testes mas utilizando um procedimento mais próximo do que ocorre durante a aplicação real.

As células neuronais foram cultivadas sobre superfícies de vidro revestidas com PDL, como descrito anteriormente, mas ao meio de cultura não foi adicionado o inibidor da divisão de células da glia, o composto desoxi-5-fluorouridina (5-FDU), permitindo, deste modo, que tanto os neurónios como as células da glia, entre as quais astrócitos, se pudessem dividir e diferenciar. Deste modo, este tipo de cultura de células é mais representativo da diversidade celular existente no sistema nervoso central. Ao fim de 9 dias foi efetuado, com recurso a uma agulha cirúrgica, um rasgo na superfície da camada de células aderida à PDL com o intuito de simular o trauma mecânico produzido pela inserção do eléctrodo. Na figura 3.37 é possível observar uma imagem de microscopia ótica de uma cultura de neurónios do córtex cerebral, mantida durante 14 dias, tendo sido efetuado o trauma mecânico ao 9º dia em cultura. Na imagem é perfeitamente visível a lesão efetuada com a agulha cirúrgica. Esta superfície, controlo, permite aferir a reduzida capacidade de recuperação das células neuronais.

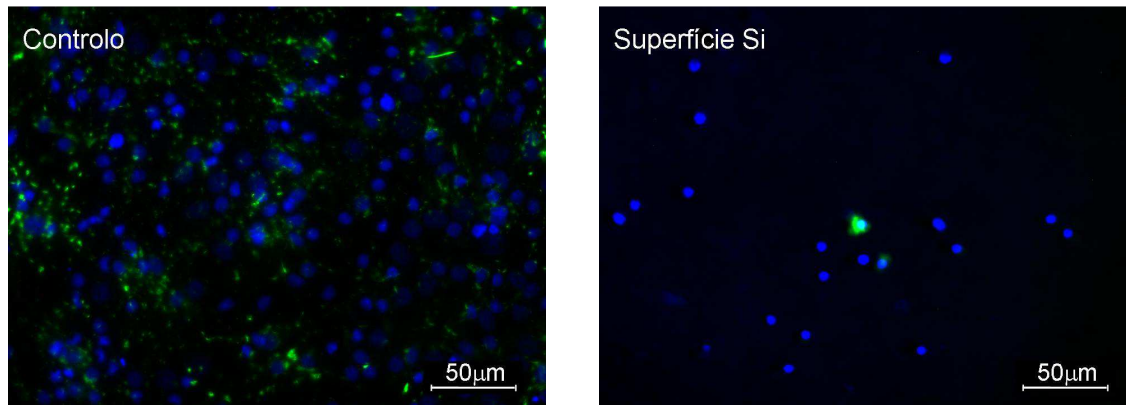


**Figura 3.37** – Cultura de neurónios do córtex cerebral onde foi aplicado um trauma mecânico com uma agulha hipodérmica ao fim de 9 dias em cultura. Depois de efetuada a lesão, as células foram mantidas em cultura durante mais 5 dias antes de serem fixadas. As células foram cultivadas sobre uma superfície de PDL e a preparação foi observada num microscópio óptico.

Imediatamente depois de efetuado o rasgo mecânico, as superfícies de Si e SiAgAu4 foram colocadas sobre a lamela de vidro com a superfície de interesse em contacto com as células neuronais. O controlo foi efetuado numa cultura onde, após o trauma mecânico da agulha, não foi colocada nenhuma superfície em contacto com a cultura de células. Após 14 dias em cultura (9 dias em PDL + 5 dias em contacto com a superfície de interesse), foi efetuada a marcação por imunocitoquímica, dos astrócitos e do núcleo de todas as células presentes na cultura, tanto na lamela de vidro como na superfície em teste. A marcação dos núcleos foi efetuada com Hoechst 33342, e os astrócitos foram identificados utilizando um anticorpo específico contra a proteína GFAP (*glial fibrillary acid protein*); um aumento na expressão desta proteína é um marcador de astrócitos reativos. Os astrócitos são responsáveis pela inibição de formação de uma nova camada de mielina nos axónios do sistema nervoso central adulto que sofreram uma lesão<sup>[241]</sup>. Nas fotos de microscopia de fluorescência a marcação a azul corresponde ao núcleo de todas as células presentes na cultura, enquanto a marcação a verde corresponde à presença de astrócitos (Figuras. 3.38 e 3.39). Na superfície controlo (lamela de vidro) foi efetuada uma análise na zona afastada do trauma mecânico que permitiu observar que mesmo em superfícies consideradas propícias e em locais que não sofreram a rutura da camada de células aderentes há a presença de astrócitos. Contudo, na superfície do silício a marcação apenas revela a presença de núcleos que, dada a sua morfologia aparente, são semelhantes aos observados em processo apoptótico. Nesta superfície não foi possível

### Capítulo 3

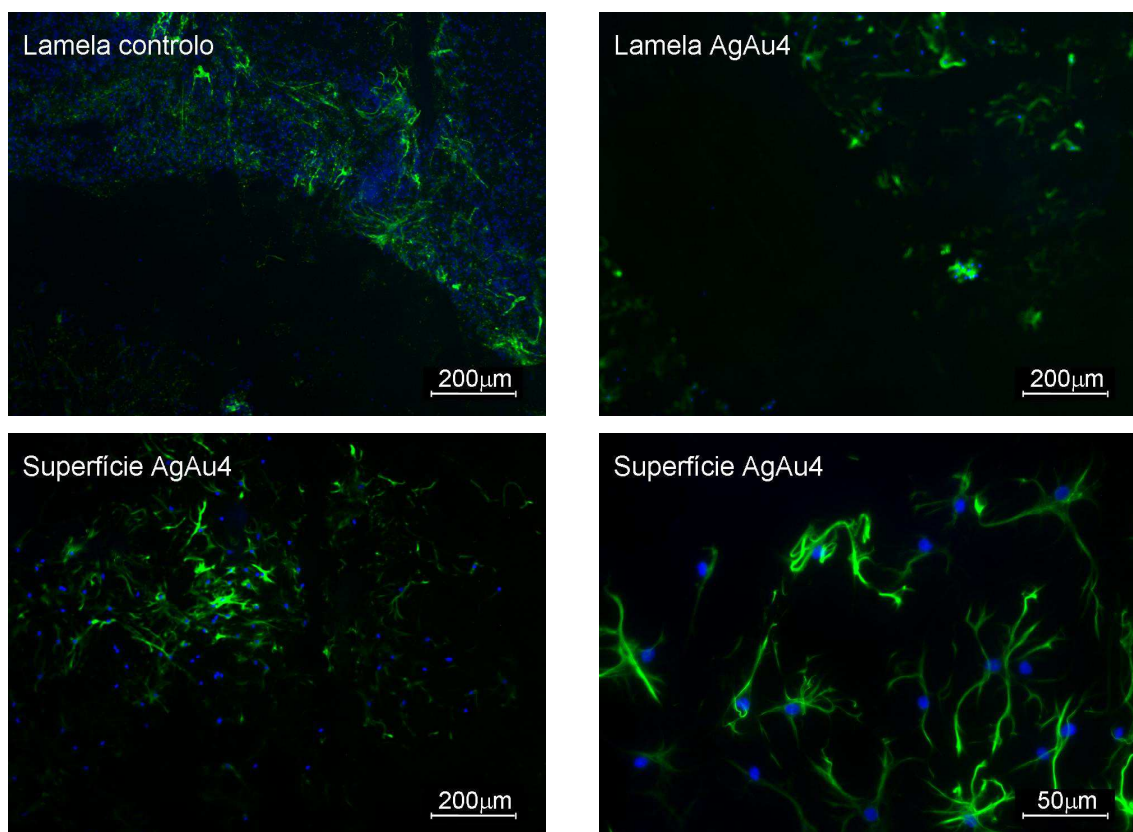
obter a marcação dos astrócitos, o que confirma os resultados obtidos por SEM, em que as células observadas não correspondiam a astrócitos mas sim à aglomeração de vários corpos celulares e não a células com uma morfologia do tipo estrela, na qual se incluem os astrócitos. Este teste reforça, uma vez mais, o pobre desempenho do silício como biomaterial para a fabricação de elétrodos neuronais.



**Figura 3.38** – Densidade celular e identificação de astrócitos em culturas de células do córtex cerebral, mantidas sobre lamelas revestidas com PDL (controlo). As células foram cultivadas sobre lamelas de vidro revestidas com PDL; ao 9º dia em cultura foi colocada sobre a cultura de células uma superfície revestida com Si (painel da direita) e as culturas foram mantidas durante mais 5 dias. As células em ambas as superfícies foram fixadas, incubadas com um anticorpo anti-GFAP (fluorescência verde) e coradas com Hoechst 33342 (fluorescência azul). As preparações foram visualizadas por microscopia de fluorescência.

Ao contrário dos resultados obtidos com a superfície de Si, foram observados astrócitos nas superfícies SiAgAu4 incubadas sobre as lamelas contendo culturas de células do córtex cerebral, ainda que em menor densidade do que a observada na superfície controlo (Fig. 3.39). No entanto, é importante notar que estas superfícies foram colocadas sobre culturas de células diferenciadas. Se o resultado evidenciasse a falta de células nestas superfícies isso seria indicativo de que o material biológico teria manifestado preferência pela superfície revestida com PDL, onde as células aderiram e se diferenciaram durante os primeiros 9 dias em cultura, e não apresentava qualquer tipo de afinidade com o silício modificado com SiAgAu4. No entanto, os resultados indicam que a superfície SiAgAu4 promoveu a adesão de astrócitos já diferenciados quando em contacto com as células mantidas em cultura sobre a superfície revestida com PDL.

Quando se observam as lamelas revestidas com PDL na zona onde foi efetuado o trauma mecânico é visível a presença de astrócitos a contornar a referida zona (Fig. 3.39). Na literatura, é referenciado que os neurónios ao serem seccionados libertam fatores tróficos que ativam na área lesionada estas células da glia<sup>[242]</sup>. De facto, um dos fatores que leva à falta de eficácia dos eléctrodos é a formação de uma cicatriz glial impenetrável para os neurónios<sup>[148]</sup>. Quando se observa a lamela com a qual a superfície SiAgAu4 esteve em contacto é evidente a menor densidade celular sobre esta lamela. Este efeito não foi observado no silício, que, aparentemente, acabou por provocar a morte celular (Fig. 3.38).



**Figura 3.39** – Densidade celular e identificação de astrócitos em culturas de células do córtex cerebral, mantidas sobre lamelas revestidas com PDL (lamela controlo). As células foram cultivadas sobre lamelas de vidro revestidas com PDL; ao 9º dia em cultura foi colocada sobre a lamela de vidro uma superfície revestida com SiAgAu4 e as culturas foram mantidas durante mais 5 dias. As células em ambas as superfícies foram fixadas, incubadas com um anticorpo anti-GFAP (fluorescência verde) e coradas com Hoechst 33342 (fluorescência azul). As preparações foram visualizadas por microscopia de fluorescência.



Uma das dificuldades da cultura de neurónios é a sua própria complexidade e o facto ser necessário assegurar uma densidade celular mínima de modo a permitir a interação entre as células da cultura. Para que uma cultura celular possa sobreviver mais do que 12 meses, tempo útil quando se deseja estudar a formação e desenvolvimento da rede neuronal, é necessário selar as culturas e utilizar membranas porosas que permitam a troca gasosa ( $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), mas minimizem a saída do vapor de água. Também é necessário que a cultura seja feita com neurónios e células da glia, por estas ajudarem na sobrevivência e diferenciação dos neurónios<sup>[243]</sup>.

Apesar de ter origem polimérica, o poli-benzocilcobuteno também foi estudado por outros autores<sup>[244]</sup> como revestimento para melhorar a biocompatibilidade do silício. Os testes celulares foram efetuados utilizando fatias do córtex cerebral de rato e foi observado a mobilidade e acumulação de neurónios e células da glia na zona da inserção. Contudo, o poli-benzocilcobuteno não teve qualquer efeito antimicrobiano e não permitiu adesão celular com a densidade observada na superfície desenvolvida no presente estudo.

A sílica também já foi estudada por outros autores como um revestimento para eléctrodos por ser um bom isolante elétrico e por permitir boa adesão celular. Raffa et al<sup>[245]</sup> compararam a adesão celular de células de feocromocitoma PC12 em eléctrodos de tungsténio revestidos com sílica, por pulverização catódica, ou poliimida, através de adesão electroestática de um precursor e posterior cura. Quando comparada com o material polimerico, a sílica não só permitiu uma maior adesão inicial de células, como apenas 7% delas perderam a adesão ao serem lavadas com PBS. No presente estudo, a matriz de sílica dos filmes finos também permitiu uma boa adesão celular.

Para minimizar a resposta anti-inflamatória, Zhong e colaboradores<sup>[246]</sup> desenvolveram filmes de nitrocelulose dopados com o neuro-peptídeo anti-inflamatório  $\alpha$ -MSH (hormona estimulante de melanócitos), que inibiu a produção de monóxido de azoto por parte da microglia durante um período de 21 dias. Estes autores concluíram que esta inibição diminuiu a resposta inflamatória e inferiram que tal permitiria ajudar a estabilizar a interface cérebro-eléctrodo, de modo a permitir a estimulação a longo prazo. Contudo, apenas realizaram o teste com células da microglia, não tendo sido reportada qual a influência sobre os neurónios, ou qual a resposta ao fim de 21 dias.

A superfície SiAgAu4 demonstrou conseguir minimizar o crescimento de algumas das bactérias responsáveis por infeções nosocomiais, e também promover a adesão de neurónios à sua superfície, aparentemente sem apresentar uma densidade excessiva de astrócitos. De facto, os resultados dos testes *in vitro* foram claramente



superiores aos do silício, material com o qual se pretendia, com o trabalho desenvolvido e aqui reportado, melhorar o desempenho celular.

Assim, e apesar de ainda haver alguns ensaios a realizar, os primeiros testes *in vitro* demonstram que é possível utilizar a pulverização catódica na modificação, à medida, da superfície do silício. As modificações permitem que as novas superfícies apresentem um conjunto de propriedades/características que permitem uma boa adesão ao substrato e, como tal, poderão ser consideradas na modificação de implantes neuronais de silício. Deste modo pode ser concluído que os objetivos iniciais que levaram ao desenvolvimento deste trabalho foram atingidos abrindo caminho para estudos mais exaustivos, no âmbito das Neurociências, sobre as características biológicas das células neuronais quando em contacto com estas superfícies.



## Conclusões

Os elétrodos utilizados como implantes neuronais já demonstraram ser um conceito viável, com provas dadas ao longo de mais de 30 anos. Contudo, o principal problema é a fiabilidade a médio e longo prazo pois ao fim de semanas ou meses, perdem a sua eficácia. Dos materiais utilizados como elétrodos o silício é um dos mais referenciados pois permite, através da micromaquinação, ser configurado em geometrias complexas. No entanto, a falta de compatibilidade biológica, química e mecânica entre este material e o tecido biológico onde se encontra inserido implica uma investigação contínua para tentar diminuir os problemas levantados pela utilização destes elétrodos.

Com o objetivo de minorar/eliminar alguns problemas referidos a superfície do silício foi modificada pela deposição de filmes finos recorrendo à técnica de pulverização catódica. Os revestimentos produzidos consistiram em sílica dopada com um (sistemas SiAg, SiAu e SiCu) e dois (sistemas SiAgAu, SiCuAg e SiCuAu) elementos metálicos, a saber: ouro, prata e cobre. As principais conclusões parcelares do trabalho desenvolvido são sumariadas a seguir:

- a pulverização catódica permitiu efetuar revestimentos de sílica dopada, com um ou dois dos elementos metálicos em estudo, com uma gama sequencial de concentrações dos elementos metálicos;

- a morfologia superficial dos revestimentos com teores mais elevados dos elementos metálicos, especialmente ouro e cobre, evidencia a falta de molhabilidade entre os elementos metálicos e o elemento cerâmico o que se traduziu na fissuração da superfície dos filmes finos;

- a topografia superficial apresentou, na maioria dos revestimentos produzidos, um perfil equilibrado entre vales e picos de forma arredondada; esta topografia induziu, em

## Conclusões

todas as superfícies, uma rugosidade média superficial inferior a 25 nm e tamanhos de partícula inferiores a 100 nm;

- a avaliação da estrutura dos revestimentos mostrou que sempre que o teor do(s) elemento(s) metálico(s) era inferior a 25% ponderal os filmes finos apresentavam natureza nanocompósita onde o(s) elemento(s) metálico(s), de dimensões nanométricas se encontrava disperso na matriz amorfa de sílica; para os teores mais elevados de metal, e quando estes eram ouro ou prata, a estrutura apresentava uma orientação preferencial segundo o plano (111); no caso do cobre os filmes finos do sistema SiCu apresentaram também uma fase cerâmica correspondente aos óxidos deste elemento metálico;

- as propriedades mecânicas dos três sistemas de sílica dopada apenas com um metal, a dureza diminuiu e o módulo de elasticidade aumentou, com o aumento da concentração da fase metálica, convergindo desde os valores associados à sílica para os associados a cada um dos metais; o mesmo comportamento foi observado para os sistemas de sílica com ouro-prata e cobre-prata ao contrário do avaliado para o sistema de sílica com cobre-ouro onde os valores de dureza foram aproximadamente constante, independentemente da concentração dos metais, enquanto o módulo de elasticidade aumentou com a diminuição do teor de sílica;

- a avaliação da molhabilidade e da carga da superfície, avaliados pela medição de ângulos de contacto e potencial zeta, não apresentaram nenhum tipo de relação com a evolução da composição química em nenhum dos seis sistemas estudados;

- na avaliação das propriedades antimicrobianas pelo teste de formação do halo de inibição de crescimento, apenas as superfícies SiCu1 (0,6%at. Cu), SiAg4 (13,7%at. Ag), SiAgAu4 (9,6%at. Ag e 11,2% at. Au) e SiCuAu3 (7,6%at. Ag e 8,7% at. Au) se mostraram eficazes contra as três estirpes bacterianas utilizadas no estudo; no teste de avaliação da viabilidade celular apenas a superfície de silício não modificado e o filme finos de SiO<sub>2</sub> não apresentaram inibição da viabilidade celular quando testados contra *A. lowffii*;

- os testes preliminares *in vitro* com células neuronais confirmaram o mau desempenho biológico do silício não modificado e demonstraram que superfícies com composição química, topografia e estrutura semelhantes induziram diferentes compatibilidades celulares devido às sua distinta hidrofiliicidade; com efeito a superfície SiAgAu4, mais hidrofílica, permitiu a adesão e diferenciação celulares enquanto a superfície SiAgAu5 (16,9%at. Ag e 19,5% at. Au), mais hidrófoba, induziu apoptose celular;

- os testes *in vitro* com culturas de células sem inibidores da diferenciação de células da glia confirmaram, uma vez mais um péssimo desempenho celular do silício não modificado enquanto a superfície SiAgAu4 confirmou um desempenho meritório no que concerne a sua compatibilidade biológica.

Em suma, e de um modo geral, o estudo desenvolvido permitiu concluir que a modificação da superfície do silício com filmes finos cerâmico/metal pode ser considerada uma aproximação válida quando o objetivo é o de melhorar o desempenho biológico e mecânico de implantes neuronais de silício.

De entre as muitas superfícies estudadas o estudo revela que a presença de dois metais, especialmente o par Ag/Au em concentrações específicas, permite uma libertação mais eficiente de iões do metal utilizado como agente antibacteriano conferindo à superfície proteção contra três das espécies patogénicas mais referenciadas na literatura como responsáveis de infeções nosocomiais.

A molhabilidade da superfície revelou ser, de entre o conjunto de propriedades/características apontadas como responsáveis pelo desempenho biológico de um biomaterial, decisiva para conferir à superfície modificada a desejada biocompatibilidade, em relação às células do sistema nervoso central, que o silício não apresenta.

Como complemento ao trabalho desenvolvido ao longo desta tese poderá ser feito o estudo dos efeitos da superfície selecionada ao nível das vias metabólicas das células neuronais, sendo que este tipo de investigação se situa mais no âmbito da Biologia Celular.



*Referencias Bibliográficas*

- 1 - Guyton, A.C.; Hall, J.E. *Textbook of medical physiology*, 11th edition, Elsevier Saunders (2007) 555-571
- 2 - White, J.S. *USMLE road map neuroscience*, 2nd Edition, The McGraw Hill Companies (2008), 1-33
- 3 - Wang, D.D.; Bordey, A. *The astrocyte adyssey*, Progress in Neurobiology 86(4) (2008) 342-67
- 4 - Tresguerres, J. A. F. *Fisiologia humana*, McGraw-Hill - Interamericana de Espanha (1992)
- 5 - <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/the-nervous-system-35/neurons-and-glia-cells-199/glia-760-11993/> em Maio de 2013
- 6 - Piccolino, M. *The bicentennial of the voltaic battery (1800-2000): the artificial electric organ*, Trends in Neurosciences 23(4) (2000) 147-151
- 7 - Harris, L.J.; Almerigi, J.B. *Probing the human brain with stimulating electrodes: The story of Roberts Bartholow's (1874) experiment on Mary Rafferty*, Brain and Cognition 70 (2009) 92-115
- 8 - House, W.F. *Cochlear implants*, Annals of Otology, Rhinology and Laryngology. 85 (27) (1976) 1-93
- 9 - Mudry, A.; Mills, M. *The early history of the cochlear implant: a retrospective*, JAMA Otolaryngology Head Neck Surgery 139(5) (2013) 446-453
- 10 - <http://kidshealth.org/parent/general/eyes/cochlear.html> em Maio 2013
- 11 - <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cocheairimplants.JPG> em Maio 2013
- 12 - Clarck, G.M. *Research advances for cochlear implants*, Auris Nasus Larynx 25 (1998) 73-87

## Referências Bibliográficas

- 13 - Chin, S.B.; Finnegan, K.R.; Chung, B.A. *Relationships among types of speech intelligibility in pediatric users of cochlear implants*, Journal of Communication Disorders 34 (2001) 187-205
- 14 - Margalit, E.; Maia, M.; Weiland, J.D.; Greenberg, R.J.; Fujii, G.Y.; Torres, G. et al.; *Retinal Prosthesis for the blind*, Survey of Ophthalmology 47 (4) (2002) 335-356
- 15 - Ahuja, A.K.; Behrend, M.R. *The Argus™ II retinal prosthesis: Factors affecting patient selection for implantation*, Progress in Retinal and Eye Research, Available online 14 March 2013
- 16 - Weiland, J.D.; Cho, A.K.; Humayun, M.S. *Retinal Prosthesis: Current clinical results and future needs*, Ophthalmology 118(11) (2011) 2227-2237
- 17 - Barbeau, H.; McCrea, D.A.; O'Donovan, M.J.; Rossignol, S.; Grill, W.M.; Lemay, M.A. *Tapping into spinal circuits to restore motor function*, Brain Research Reviews 30 1999. 27–51
- 18 - Edgerton, V.R.; Roy, R.R. *Paralysis recovery in humans and model systems*, Current Opinion in Neurobiology 12 (2002) 658–667
- 19 - Kumar, K.; Toth, C.; Nath, R.K.; Laing, P. *Epidural spinal cord stimulation for treatment of chronic pain - some predictors of success. A 15-year experience*, Surgical Neurology 50 (1998)110 –21.
- 20 - <http://trianglespine.com/treatments/spinal-cord-stimulation/> em Maio 2013
- 21 - George, M.S.; Sackeim, H.A.; Rush, A.J.; Marangell, L.B.; Nahas, Z.; Husain, M.M.; et al.; *Vagus nerve stimulation: a new tool for brain research and therapy*, Biological Psychiatry 47 (2000) 287-295
- 22 - George, M.S.; Nahas, Z.; Bohning, D.E.; Mu, Q.; Kozel, F.A.; Borckhardt, J. et al.; *Mechanisms of action of vagus nerve stimulation (VNS)*, Clinical Neuroscience Research 4 (2004) 71–79
- 23 - Hallböök, T., Lundgren, J.; Köler, S.; Blennow, G.; Strömblad, L.G.; Rosén, I. *Beneficial effects on sleep of vagus nerve stimulation in children with therapy resistant epilepsy*, European Journal of Paediatric Neurology 9 (2005) 399–40
- 24 - Fujimoto, A.; Yamazoe, T.; Yokota, T.; Enoki, H.; Sasaki, Y.; Nishimura, M.; et al.; *Clinical utility of vagus nerve stimulation for progressive myoclonic epilepsy*, Seizure 21 (2012) 810–812
- 25 - Marangell, L.B.; Martinez, J.M.; Niazi, S.K. *Vagus nerve stimulation as a potential option for treatment-resistant depression*, Clinical Neuroscience Research 4 (2004) 89–94
- 26 - Christmas, D.M.B.; Curran, S.; Matthews, K.; Eljamel, M.S. *Neurosurgery for mental disorder, vagus nerve stimulation and deep brain stimulation*, Psychiatry 5:6 (2006) 212-216



- 27 - Goffi-Gomez, M.V.S.; Magalhães, A.T.; Neto, R.B.; Tsuji, R.K.; Gomes, M.Q.T.; Bento, R.F. *Auditory brainstem implant outcomes and MAP parameters: Report of experiences in adults and children*, International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 76 (2012) 257–264
- 28 - Sennaroglu, L.; Ziyal, I. *Auditory brainstem implantation*, Auris Nasus Larynx 39 (2012) 439–450
- 29 - Coez, A.; Zilbovicius, M.; Ferrary, E.; Bouccara, D.; Mosnier, I.; Ambert-Dahan, E. et al., *Processing of voices in deafness rehabilitation by auditory brainstem implant*, NeuroImage 47 (2009) 1792–1796
- 30 - Gordon, K.A.; Papsin, B.C.; Harrison, R.V. *Auditory brainstem activity and development evoked by apical versus basal cochlear implant electrode stimulation in children*, Clinical Neurophysiology 118 (2007) 1671–1684
- 31 - Normann, R.A.; Maynard, E.M.; Rousche, P.J.; Warren, D.J. *A neural interface for a cortical vision prosthesis*, Vision Research 39 (1999) 2577–2587
- 32 - Lee, B.; Lyu, C.Y.; Apuzzo, M.L.J. *A primer on brain–machine interfaces, concepts, and technology: A Key Element in the future of functional neurorestoration*, World Neurosurgery 79 3/4 (2013) 457-471.
- 33 - Azizi, S.A. *“I think therefore I am”*: New prospects for neural prostheses, Neuroscience Letters 538 (2013) 1–2
- 34 - Kuliesevisky, J.; Luquin, M.R.; Arbelo, J.M.; Burguesra, J.A.; Carrillo, F.; Castro, A.; et al.; *Advanced Parkinson's disease: Clinical characteristics and treatment. Part II*, Neurologia Available online 20 July 2013
- 35 - Aghion, D.M.; Cosgrove, G.R. *Surgical Interventions for Pain, Chronic Pain and Brain Abnormalities* 5 (2014) 75-93
- 36 - Montgomery, E.B. *Mechanisms of action of deep brain stimulation*, Neuroscience & Biobehavioral Reviews 32 (3) (2008) 344-407
- 37 - [http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108\\_2008\\_Groups/group07/Parkinsons.html](http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2008_Groups/group07/Parkinsons.html) em Junho 2013
- 38 - Capecci, M.; Ricciuti, R.A.; Ortenzi, A.; Paggi, A.; Durazzi, V.; Rychlicki, F.; et al.; *Chronic bilateral subthalamic stimulation after anterior callosotomy in drug resistant epilepsy: long term clinical and functional outcome of two cases*, Epilepsy Research 98 (2-3) (2012) 135-139
- 39 - Ewing, S.G.; Porr, B.; Riddell, J.; Winter, C.; Grace, A.A. *SaBer DBS: A fully programmable, rechargeable, bilateral, charge-balanced preclinical microstimulator for long-term neural stimulation*, Journal of Neuroscience Methods 213 (2013) 228–235

## Referências Bibliográficas

- 40 - Synofzik, M.; Schlaepfer, T.E. *Electrodes in the braind - Ethical criteria for research and treatment with deep brain stimulation for neuropsychiatric disorders*, Brain Stimulation 4 (2011) 7–16
- 41 - Laxton, A.W.; Tang-Wai, D.F.; McAndrews, M.P.; Zumsteg, D.; Wennberg, R.; Keren, R. et al., *A Phase I Trial of Deep Brain Stimulation of Memory Circuits in Alzheimer's Disease.* , Annals of Neurology 68 (2010) 521–534.
- 42 - Bhandari, R.; Negi, S.; Rieth, L.; Normann, R.A.; Solzbacher, F. *A novel method of fabricating convoluted shaped electrode arrays for neural and retinal prostheses*, Sensors and Actuators A 145–146 (2008) 123–130
- 43 - Prasad, A.; Xue, Q.S.; Viswanath, S.; Nishida, T.; Shaw, G.; Streit, W. J. et al. *Comprehensive characterization and failure modes of tungsten microwire arrays in chronic neural implants.* , Journal of Neural Engineering 9 (2012) 056015
- 44 - Branner, A.; Stein R.B.; Normann, R.A. *Selective stimulation of cat sciatic nerve using an array of varying-length microelectrodes.*, Journal of Neurophysiology 85 (2001) 1585-1594
- 45 - Drake, K. L.; Wise, K.D.; Farraye, J.; Anderson, D.J.; Bement, S.L. *Performance of Planar Multisite Microprobes in Recording Extracellular Single-Unit Intracortical Activity*, *IEEE Trans. Biomedical Engineering* 35 (1988) 719-732
- 46 - Kewley, D. T.; Hills, M.D.; Borkholder, D.A.; Opris, I.E.; Maluf, N.I.; Storment, C.W. et al. *Plasma-etched neural probes*, Sensors and Actuators A-Physics, 58 (1997) 27-35.
- 47 - Lentini, J.J.; Severson, G.R.. *Humidity induced failures in parylene coated hybrids*, Circuits Manufacturing, 24 (1984) 56-57.
- 48 - Schmidt, E. M.; McIntosh, J.S.; Bak, M.J. *Long-Term Implants of Parylene-C Coated Microelectrodes*, Medical & Biological Engineering & Computing, 26 (1988) 96-101
- 49 - Bjornsson, C.S.; Oh, S.J.; Al-Kofahi, Y.A.; Lim, Y.J.; Smith, K.L.; Turner, J.N. et al., *Effects of insertion conditions on tissue strain and vascular damage during neuroprosthetic device insertion*, Journal Neural Engineering 3 (2006) 196- 207
- 50 - Zhong, Y.H.; Bellamkonda, R.V. *Biomaterials for the central nervous system*, Journal of the Royal Society Interface 5 (2008) 957-975
- 51 - Polikov, V. S. *An in vitro model of the brain tissue reaction to chronically implanted recording electrodes reveals essential roles for serum and bFGF in glial scarring.*, Ph.D Thesis, Duke University, Durham, NC, 2009
- 52 - Black, J. *Biological performance of materials Fundamentals of Biocompatibility*, 3rd ed., Dekker, New York, 1999

- 53 - Ludwig, K.A.; Uram, J.D.; Yang, J.Y.; Martin, D.C.; Kipke, D.R. *Chronic neural recordings using silicon microelectrode arrays electrochemically deposited with a poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) film*, Journal Neural Engineering 3 (2006) 59-70
- 54 - Biran, R.; Martin, D.C.; Tresco, P. *Neuronal cell loss accompanies the brain tissue response to chronically implanted silicon microelectrode arrays*, Exp. Neurol. 195 (2005) 115-126
- 55 - Fawcett, J.W.; Asher, R.A. *The glial scar and central nervous system repair*, Brain Research Bull. 49 (1999) 377-391
- 56 - Kao, W.J.; Hubbell, J.A.; Anderson, J.M. *Protein-mediated macrophage adhesion and activation on biomaterials: a model for modulating cell behavior*, Journal of Material Science: Materials in Medicine 10 (1999) 601-605
- 57 - Fujita, T.; Yoshimine, T.; Maruno, M.; Hayakawa, T. *Cellular dynamics of macrophages and microglial cells in reaction to stab wounds in rat cerebral cortex*, Acta Neurochirurgica 140 (1998) 275-279
- 58 - Giordana, M.T.; Attanasio, A.; Cavalla, P.; Migheli, A.; Vigliani, M.C.; Schiffer, D. *Reactive cell-proliferation and microglia following injury to the rat-brain*, Neuropathology and Applied Neurobiology 20 (1994) 163-174
- 59 - Stensaas, S.S.; Stensaas, L.J. *Reaction of cerebral-cortex to chronically implanted plastic needles*, Acta Neuropathologica 35 (1976) 187-203
- 60 - Polikov, V. S.; Tresco, P.A.; Reichert, W.M. *Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes*, Journal of Neuroscience Methods 148 (2005), 1-18
- 61 - Turner, J.N.; Shain, W.; Szarowski, D.H.; Andersen, M.; Martins, S.; Isaacson, M. et al.; *Cerebral astrocyte response to micromachined silicon implants*, Experimental Neurology 156 (1999) 33-49
- 62 - Mofid, M.M.; Thompson, R.C.; Pardo, C.A.; Manson, P.N.; VanderKolk, C.A. *Biocompatibility of fixation materials in the brain*, Plastic and Reconstructive Surgery 100 (1997) 14-20
- 63 - Winn, S.R.; Aebischer, P.; Galletti, P.M. *Brain-tissue reaction to permselective polymer capsules*, Journal of Biomedical Materials Research 23 (1989) 31-44
- 64 - Szarowski, D.H.; Andersen, M.D.; Retterer, S.; Spence, A.J.; Isaacson, M.; Craighead, H.G. et al.; *Brain responses to micro-machined silicon devices*, Brain Research 983 (2003) 23-35
- 65 - Logan, A.; Berry, M. *Cellular and molecular determinants of glial scar formation In Molecular and cellular biology of neuroprotection in the CNS*, (ed. C. Alzheimer), KluwerAcademic, New York, NY, 2002

## Referências Bibliográficas

- 66 - Patwardhan, R.V.; Nanda, A. *Implanted ventricular shunts in the United States: The billion-dollar-a-year cost of hydrocephalus treatment*, *Neurosurgery* 56 (2005) 139-144
- 67 - Alonso, G. *NG2 proteoglycan-expressing cells of the adult rat brain: Possible involvement in the formation of glial scar astrocytes following stab wound*, *Glia* 49 (2005) 318-338
- 68 - Hampton, D.W.; Rhodes, K.E.; Zhao, C.; Franklin R.J.M.; Fawcett, J.W. *The responses of oligodendrocyte precursor cells, astrocytes and microglia to a cortical stab injury, in the brain.*, *Neuroscience* 127 (2004) 813-820
- 69 - Magnus, T.; Coksaygan, T.; Korn, T.; Xue, H.P.; Arumugam, T.V.; Mughal, M.R.; et al.; *Evidence that nucleocytoplasmic Olig2 translocation mediates brain-injury-induced differentiation of glial precursors to astrocytes*, *Journal of Neuroscience Research* 85 (2007), 2126-2137
- 70 - Roitbak, T.; Sykova, E. *Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis*, *Glia* 28 (1999) 40-48
- 71 - Liu, X.; McCreery, D.B.; Carter, R.R.; Bullara, L.A.; Yuen, T.G.H.; Agnew, W.F. *Stability of the interface between neural tissue and chronically implanted intracortical microelectrodes*, *Journal of Neural Engineering* 7 (1999) 315-326
- 72 - Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. *A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces*, *Biomaterials* 34 (2013) 8533-8554
- 73 - Curtis, L.T. *Prevention of hospital-acquired infections: review of non-pharmacological interventions*, *Journal of Hospital Infections* 69 (2008) 204-219
- 74 - Nablo, J. B.; Heather, L. P.; Butler, R. D.; Klitzman, B.; Scoenfish, M. H. *Inhibition of implant associated infections via nitric oxide release*, *Biomaterials* 26 (2005) 6984-6990
- 75 - Barnes, R.; Chetter, I. *Infection in prosthetic materials*, *Surgery* 30 (2012) 667-672
- 76 - Paustian, T.; Roberts, G. *Through the Microscope: Adventures in Microbiology*, Textbook Consortia, 4th edition (2012)
- 77 - [http://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial\\_capsule#mediaviewer/File:Average\\_prokaryote\\_cell-\\_en.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/Bacterial_capsule#mediaviewer/File:Average_prokaryote_cell-_en.svg) em Maio 2013
- 78 - <http://immunology.blogs.upv.es/2014/03/06/lysozyme-the-enzyme-that-attacks-peptidoglycans-found-in-the-cell-walls-of-gram-positive-bacteria/> em maio 2013
- 79 - Campoccia, D.; Montanaro, L.; Arciola, C. *A review of the clinical implications of anti-infective biomaterials and infection-resistant surfaces*, *Biomaterials* 34 (2013) 8018-8029
- 80 - <http://en.wikipedia.org/wiki/Biofilm#mediaviewer/File:Biofilm.jpg> em Maio 2013

- 81 - Maillard, J. Y.; Hartemann, P. *Silver as an antimicrobial: Facts and gaps in knowledge*, *Critical Reviews in Microbiology* 39 (2013) 4, 373-383
- 82 - Jaiswal, S.; McHale, P.; Duffy, B. *Preparation and rapid analysis of antibacterial silver copper and zinc doped sol-gel surfaces*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 94 (2012) 170– 176
- 83 - Hilpert, K.; Elliott, M.; Jenssen, H.; Kindrachuk, J.; Fjell, C. D.; Körner, J.; et al *Screening and Characterization of Surface-Tethered Cationic Peptides for Antimicrobial Activity*, *Chemistry & Biology* (2009), 16(1):58-69
- 84 - Palermo, E. F.; Vemparala, S.; Kuroda, K. *Cationic Spacer Arm Design Strategy for Control of Antimicrobial Activity and Conformation of Amphiphilic Methacrylate Random Copolymers*, *Biomacromolecules* (2012), 13, 1632–1641
- 85 - Nunes, J.; Santos, R.; Loureiro, V.; Piedade, A. P. *Nanocomposite thin films with hybrid inorganic/organic matrix for the modification of silicon based implants*, *Plasma Processes and Polymers* 7 (2012) 709-717
- 86 - Mailey, S.; Hyland, M.; Mailley, P.; McLaughlin, J. A.; McAdams, E. T. *Thin film platinum cuff electrodes for neurostimulation: in vitro approach of safe neurostimulation parameters*, *Bioelectrochemistry* (2004) 63 359– 364
- 87 - Markogiannakis, H.; Pachylaki, N.; Samara, E.; Kalderi, M.; Minettou, M.; Toutouza, M., et al *Infections in a surgical intensive care unit of a university hospital in Greece*, *International Journal of Infectious Diseases* (2009) 13, 145—153
- 88 - Valero, C.; Palomo, J. D.; Matorras, P.; Fernández-Mazarrasa, C.; Fernández, C. G.; Fariñas, M. C. *Acinetobacter bacteraemia in a teaching hospital, 1989–1998*, *European Journal of Internal Medicine* (2001) 12 425–429
- 89 - Rathinavelu, S.; Zaros, Y.; Merchant, J. L. *Acinetobacter lwoffii infection and gastritis*, *Microbes and Infection* 5 (2003) 651–657
- 90 - <http://en.wikipedia.org/wiki/Acinetobacter> em Maio 2013
- 91 - Arciola, C. R.; Campoccia, D.; Baldassarri, L.; Pirini, V.; Huebner, J.; Montanaro, L. *The role of Enterococcus faecalis in orthopaedic peri-implant infections demonstrated by automated ribotyping and cluster analysis*, *Biomaterials* (2007) 28 3987–3995
- 92 - Murray, B. E. *The life and times of the Enterococcus*, *Clinical Microbiology* Ver. 3 (1990) 1 46-65
- 93 - Moghadas, L.; Shahmoradi, M.; Narimani, T. *Antimicrobial activity of a new nanobase endodontic irrigation solution: in vitro study*, *Dental Hypotheses* 3 (2012) 4 142-146
- 94 - Lyczak, J. B.; Cannon, C. L.; Pier, G. B. *Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist*, *Microbes and Infection* 2 (2000) 1051–1060

## Referências Bibliográficas

- 95 - Defez, C.; Fabro-Peray, P.; Bouziges, N.; Gouby, A.; Mahamat, A.; Dauréz, J.P.; et al *Risk factors for multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa nosocomial infection*, Journal of Hospital Infection (2004) 57, 209–216
- 96 - [http://www.nasa.gov/topics/shuttle\\_station/features/pseudomonas.html](http://www.nasa.gov/topics/shuttle_station/features/pseudomonas.html) em maio de 2013
- 97 - Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. *Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria*, Journal of Colloid and Interface Science (2004) 275 177–182
- 98 - Guzman, M.; Dille, J.; Godet, S. *Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 8 (2012) 37–45
- 99 - Cui, Y.; Zhao, Y.; Tian, Y.; Zhang, W.; Lü, X.; Jiang, X. *The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli*, Biomaterials (2012) 33 2327e2333
- 100 - Sotirou, G. A.; Pratzinis, S. E. *Antibacterial Activity of Nanosilver Ions and Particles*, Environmental Science & Technology (2010), 44, 5649–5654
- 101 - Hajipour, M. J.; Fromm, K. M.; Ashkarran, A. A.; Aberasturi, D. J.; Larramendi, I. R.; Rojo, T.; et al *Antibacterial properties of nanoparticles*, Trends in Biotechnology 30 (2012) 499-511
- 102 - Musallam, S.; Bak, M.J.; Troyk, P. R.; Andersen, R. A. *A floating metal microelectrode array for chronic implantation*, Journal of Neuroscience Methods 160 (2007) 122-127
- 103 - Khan, S.P.; Auner, G.G.; Palyvoda, O.; Newaz, G.M. *Biocompatibility assessment of next generation materials for brain implantable microelectrodes*, Materials Letters 65 (2011) 876–879
- 104 - Suzuki, M.; Ikeda, K.; Yamaguchi, M.; Kudoh, S.N.; Yokoyama, K.; Satoh, R.; et al., *Neuronal cell patterning on a multi-electrode array for a network analysis platform*, Biomaterials 34 (2013) 5210e5217
- 105 - Inagaki, K.; Heiney, S.A.; Blazquez, P.M. *Method for the construction and use of carbon fiber multibarrel electrodes for deep brain recordings in the alert animal*, Journal of Neuroscience Methods 178 (2009) 255–262
- 106 - Richardson-Burns, S.M.; Hendricks, J.L.; Goster, B.; Povlich, L.K.; Kim, F.; Martin, D.C. *Polymerization of the conducting polymer poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) around living neural cells*, Biomaterials 28 (2007) 1539–1552
- 107 - Collazos-Castro, J.E.; Polo, J.L.; Hernández-Labrado, G.R.; Padial-Cañete, V.; García-Rama, C. *Bioelectrochemical control of neural cell development on conducting polymers*, Biomaterials 31 (2010) 9244-9255

- 108 - Chikar, J.A.; Hendricks, J.L.; Richardson-Burns, S.M.; Raphael, Y.; Pfingst, B.E.; Martin, D.C. *The use of a dual PEDOT and RGD-functionalized alginate hydrogel coating to provide sustained drug delivery and improved cochlear implant function*, *Biomaterials* 33 (2012) 1982-1990
- 109 - Luo, X.; Weaver, C.L.; Zhou, D.D.; Greenberg, R.; Cui, X.T. *Highly stable carbon nanotube doped poly(3,4-ethylenedioxythiophene) for chronic neural stimulation*, *Biomaterials* 32 (2011) 5551-5557
- 110 - Long, Y.; Li, M.; Gu, C.; Wan, M.; Duvail, J.; Liu, Z.; Fan, Z. *Recent advances in synthesis, physical properties and applications of conducting polymer nanotubes and nanofibers*, *Progress in Polymer Science* 36 (2011) 1415– 1442
- 111 - Chen, S.; Pei, Q.; Tang, R.; Chen, Y.; Zhao, S.; Wang, H.; Chen, H. *PEDOT/MWCNT composite film coated microelectrode arrays for neural interface improvement*, *Sensors and Actuators A* 193 (2013) 141– 148
- 112 - Green, R.A.; Lovell, N.H.; Wallace, G.G.; Poole-Warren, L.A. *Conducting polymers for neural interfaces: Challenges in developing an effective long-term implant*, *Biomaterials* 29 (2008) 3393–3399
- 113 - Green, R.A.; Hassarati, R.T.; Bouchinet, L.; Lee, C.S.; Cheong, G.L.M.; Yu, J.F.; et al.; *Substrate dependent stability of conducting polymer coatings on medical electrodes*, *Biomaterials* 33 (2012) 5875-5886
- 114 - Richardson, R.T.; Wise, A.K.; Thompson, B.C.; Flynn, B.O.; Atkinson, P.J.; Fretwell, N.J.; et al., *Polypyrrole-coated electrodes for the delivery of charge and neurotrophins to cochlear neurons*, *Biomaterials* 30 (2009) 2614–2624
- 115 - Cui, X.; Wiler, J.; Dzaman, M.; Altschuler, R.A.; Martin, D.C. *In vivo studies of polypyrrole/peptide coated neural probes*, *Biomaterials* 24 (2003) 777–787
- 116 - Lu, Y.; Li, T.; Zhao, X.; Li, M.; Cao, Y.; Yang, H.; Duan, Y.Y. *Electrodeposited polypyrrole/carbon nanotubes composite films electrodes for neural interfaces*, *Biomaterials* 31 (2010) 5169-5181
- 117 - Liu, X.; Yue, Z.; Higgins, M.J.; Wallace, G.G. *Conducting polymers with immobilised fibrillar collagen for enhanced neural interfacing*, *Biomaterials* 32 (2011) 7309-7317
- 118 - Lee, J.Y.; Schmidt, C.E. *Pyrrole–hyaluronic acid conjugates for decreasing cell binding to metals and conducting polymers*, *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 4396–4404
- 119 - Rao, L.; Zhou, H.; Li, T.; Li, T.; Duan, Y.Y. *Polyethylene glycol-containing polyurethane hydrogel coatings for improving the biocompatibility of neural electrodes*, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 2233–2242
- 120 - Zhou, H.; Li, T.; Duan, Y.Y. *Reduce impedance of intracortical iridium oxide microelectrodes by hydrogel coatings*, *Sensors and Actuators B* 161 (2012) 198– 202

## Referências Bibliográficas

- 121 - Lewitus, D.Y.; Smith, K.L.; Shain, W.; Bolikal, D.; Kohn, J. *The fate of ultrafast degrading polymeric implants in the brain*, *Biomaterials* 32 (2011) 5543e5550
- 122 - Lewitus, D.; Smith, K.L.; Shain, W.; Kohn, J. *Ultrafast resorbing polymers for use as carriers for cortical neural probes*, *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 2483–2491
- 123 - Kolarcik, C.L.; Bourbeau, D.; Azemi, E.; Rost, E.; Zhang, L.; Lagenaur, C.F.; et al., *In vivo effects of LI coating on inflammation and neuronal health at the electrode-tissue interface in rat spinal cord and dorsal root ganglion*, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3561–3575
- 124 - Tien, L. W.; Wu, F. ; Tang-Schomer, M. D.; Yoon, E.; Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. *Silk as a multifunctional biomaterial substrate for reduced glial scarring around brain-penetrating electrodes*, *Advanced Functional Materials* 23 (2013) 3185-3193
- 125 - Regan, E.M.; Uney, J.B.; Dick, A.D.; Zhang, Y.; Nunez-Yanez, J.; McGeehan, J.P.; et al., *Differential patterning of neuronal, glial and neural progenitor cells on phosphorus-doped and UV irradiated diamond-like carbon*, *Biomaterials* 31 (2010) 207–215
- 126 - Sorokin, R.; Gabay, T.; Blinder, P.; Baranes, D.; Bem-Jacob, E.; Hanein, Y. *Compact self-wiring in cultured neural networks*, *Journal of Neural Engineering* 3 (2006) 95-101
- 127 - McKenzie, J. L.; Waid, M. C.; Shi, R.; Webster, T. J. *Decreased function of astrocytes on carbon nanofiber materials*, *Biomaterials* 25 (2004) 1309-1317
- 128 - Frommhold, A.; Tarte, E. *Effect of film structure on the electrochemical properties of gold electrodes for neural implants*, *Electrochimica Acta* (2011) 56 6001– 6007
- 129 - Tykocinsk, M.; Duan, Y.; Tabor, B.; Cowan, R. *Chronic electrical stimulation of the auditory nerve using high surface area (HiQ) platinum electrodes*, *Hearing Research* 159 (2001) 53-68
- 130 - Bayliss, S. C.; Buckberry, L. D.; Fletcher, I.; Tobin, M. J. *The culture of neurons on silicon*, *Sensors and Actuators A*, 74 (1999) 139-142
- 131 - Khan, S.P.; Auner, G.G.; Newaz, G.M. *Influence of nanoscale surface roughness on neural cells attachment on silicon*, *Nanomedicine* 1 (2005) 125-129
- 132 - Wang, A.; Finlayson, P. G.; Li, J.; Brabant, K.; Black, C. A.; McAllister, J.P.; Cao, T.; et al *Is silicon suitable for making implantable medical devices?*, AICHE Annual Meeting (2005), Cincinnati OH, 2005, p.15420
- 133 - Kotzar, G.; Freas, M.; Abel, P.; Fleischman, A.; Roy, S.; Zorman, C.; Moran, J. M.; Melzak, J. *Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices*, *Biomaterials* 23 (2002) 13 2737–2750
- 134 - Gorth, D. J.; Puckett, S.; Ercan, B.; Webster, T. J.; Rahaman, M.; Bal, B. S. *Decreased bacteria activity on Si3N4 surfaces compared with PEEK or titanium*, *International Journal of Nanomedicine* (2012) 7 4829–4840



- 135 - Webster, T. J.; Patel, A. A.; Rahaman, M. N.; bal, B. S. *Anti-infective and osteointegration properties of silicon nitride, poly(ether ether ketone), and titanium implants*, Acta Biomaterialia (2012) 8 4447–4454
- 136 - Wagenaar, D. A.; Pine, J.; Potter, S. M. *Effective parameters for stimulation of dissociated cultures using multi-electrode arrays*, Journal of Neuroscience Methods 138 (2004) 27–37
- 137 - Aryan, N. P.; Asad, M. I.; Brendler, C.; Kibbel, S.; Heusel, G.; Rothmel, A. *In Vitro Study of Titanium Nitride Electrodes for Neural Stimulation*, 33rd Annual International Conference of the IEEE EMBS Boston, Massachusetts USA, August 30 - September 3, 2011
- 138 - Torimitsu, K.; Kawana, A. *Selective growth of sensory nerve fibers on metal oxide pattern in culture*, Development Brain Research 51 (1990) 128-131
- 139 - Cogan, S.F.; Troyk, P.R.; Ehrlich, J.; Plante, T.D. *Potential-biased, asymmetric waveforms for charge-injection with activated iridium oxide (AIROF) neural stimulation electrodes*, IEEE Trans. Biomed. Eng. (2006) 53(2) 327-332
- 140 - Sawy, E.N.; Birss, V.I. *Nano-porous iridium and iridium oxide thin films formed by high efficiency electrodeposition*, Journal of Materials Chemistry 19 (2009) 8244-8252
- 141 - Negi, S.; Bhandari, R.; Rieth, L.; Wagenen, R.V.; Solzbacher, F. *Neural electrode degradation from continuous electrical stimulation: Comparison of sputtered and activated iridium oxide*, Journal of Neuroscience Methods 186 (2010) 8–17
- 142 - Göbbels, K.; Kuenzel, T.; Ooyen, A.v.; Baumgartner, W.; Schnakenberg, U.; Bräunig, P. *Neuronal cell growth on iridium oxide*, Biomaterials 31 (2010) 1055–1067
- 143 - Lee, I.; Whang, C.; Lee, Y.; Lee, G.H.; Park, B.; Park, J.; et al., *Formation of nano iridium oxide: material properties and neural cell culture*, Thin Solid Films 475 (2005) 332– 336
- 144 - Cruz, A.M.; Casañ-Pastor, N. *Graded conducting titanium–iridium oxide coatings for bioelectrodes in neural systems*, Thin Solid Films 534 (2013) 316–324
- 145 - Cogan, C. F.; Guzelian, A. A.; Agnew, W. F.; Yuen, T. G. H.; McCreery, D. B. *Over-Pulsing degrades activated iridium oxide films used for intracortical neural stimulation*, Journal of Neuroscience Methods, 137 (2004), 141-150
- 146 - Pierce, A.L.; Sommakia, S.; Rickus, J.L.; Otto, K.J. *Thin-film silica sol–gel coatings for neural microelectrodes*, Journal of Neuroscience Methods 180 (2009) 106–110
- 147 - Lee, J. W.; Lee, K. S.; Cho, N.; Ju, B. K.; Lee, K. N.; Lee, S. H. *Topographical guidance of mouse neuronal cell on SiO<sub>2</sub> microtracks*, Sensors & Actuators B 128 (2007) 252-257
- 148 - Roach, P.; Parker, T.; Gadegaard, N.; Alexander, M.R. *Surface strategies for control of neuronal cell adhesion: A review*, Surface Science Reports 65 (2010) 145<sup>±</sup> 173

## Referências Bibliográficas

- 149 - Deitch, S.; Choi, M. *Brain model for microelectrode implantation testing*, *Novel Materials and Processing in chemical engineering*. Department of Bioengineering, University of Illinois, Chicago, 10 Aug 2006
- 150 - Ejserholm, F.; Vastesson, A.; Haraldsson, T.; Wijngaart, W., Schouenborg, J.; Wallman, L.; Bengtsson, M. *A polymer neural probe with tunable flexibility*, Neural Engineering (NER), 2013 6th International IEEE/EMBS Conference on
- 151 - Radovic, I.; Serruys, Y.; Limoge, Y.; Bibic, N.; Poissonnet, S.; Jaoul, O.; et al *Stoichiometric SiO<sub>2</sub> thin films deposited by reactive sputtering*, *Materials Chemistry and Physics* 104 (2007) 172–176
- 152 - Cattaruzza, E.; Battaglin, G.; Gonella, F.; Poloni, R.; Scremin, B. F.; Mattei, G.; et al *Au–Cu nanoparticles in silica glass as composite material for photonic applications*, *Applied Surface Science* 254 (2007) 1017–1021
- 153 - Cattaruzza, E.; Battaglin, G.; Canton, P.; Sada, C. *Some structural and optical properties of copper and copper oxide nanoparticles in silica films formed by co-deposition of copper and silica*, *Journal of Non-Crystalline Solids* 351 (2005) 1932–1936
- 154 - Cattaruzza, E.; Battaglin, G.; Canton, P.; Finotto, T.; Sada, C. *Copper-based nanocluster composite silica films by rf-sputtering deposition*, *Materials Science and Engineering C* 26 (2006) 1092 – 1096
- 155 - Gurvich, L.V.; Veyts, I. V.; Mendvedev, V. A.; Khachkuruzov, G. A.; Yungman, V. S.; Bergman, V. F.; et al., *Thermodynamic Properties Of Individual Substances: Elements And compounds*, fourth edition, Hemisphere Publishing Corporation
- 156 - <http://srdata.nist.gov/gateway/gateway?property=enthalpy+of+formation> em Janeiro 2013
- 157 - Wang, C.J.; Jou, S., *Study of copper-doped SiO<sub>2</sub> films prepared by co-sputtering of copper and SiO<sub>2</sub>*, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 69 (2008) 523–526
- 158 - Kumari, P.; Majewski, P. *Adsorption of Albumin on Silica Surfaces Modified by Silver and Copper Nanoparticles*, *Journal of Nanomaterials* Volume 2013, Article ID 839016, 7 pages
- 159 - Kim, D. H.; Lee, G. H.; Lee, S. Y.; Kim, D. H. *Atomic scale simulation of physical sputtering of silicon oxide and silicon nitride thin films*, *Journal of Crystal Growth* 286 (2006) 71–77
- 160 - Sarhammar, E.; Strandbert, E.; Martin, N.; Nyberg, T. *Sputter rate distribution and compositional variations in films sputtered from elemental and multi-element targets at different pressures*, *International Journal of Materials Science and Applications* 2014; 3(2): 29-36

- 161 - Pierson, J.F.; Wiederkehr, D.; Billiard, A. *Reactive magnetron sputtering of copper, silver, and gold*, Thin Solid Films 478 (2005) 196–205
- 162 - Snyders, R.; Dauchot, J.; Hecq, M. *Synthesis of Metal Oxide Thin Films by Reactive Magnetron Sputtering in Ar/O<sub>2</sub> Mixtures: An Experimental Study of the Chemical Mechanisms*, Plasma Processes and Polymers 2007, 4, 113–126
- 163 - Mishra, Y. K.; Mohapatra, S.; Kabiraj, D.; Mohanta, B.; Lalla, N.P.; Pivin, J. C.; Avasthi, D. K. *Synthesis and characterization of Ag nanoparticles in silica matrix by atom beam sputtering*, Scripta Materialia 56 (2007) 629–632
- 164 - Sella, C.; Chenot, S.; Reillon, V.; Berthier, S. *Influence of the deposition conditions on the optical absorption of Ag–SiO<sub>2</sub> nanocermet thin films*, Thin Solid Films 517 (2009) 5848–5854
- 165 - Rizzo, A.; Tagliente, M. A.; Alvisi, M.; Scaglione, S. *Structural and optical properties of silver thin films deposited by RF magnetron sputtering*, Thin Solid Films 396 (2001) 29–35
- 166 - Sangpour, P.; Akhavan, O.; Moshfegh, A. Z. *RF reactive co-sputtered Au–Ag alloy nanoparticles in SiO<sub>2</sub> thin films*, Applied Surface Science 253 (2007) 7438–7442
- 167 - Veith, G. M.; Lupini, A. R.; Rashkeev, S.; Pennycook, S. J.; Mullins, D. R.; Schwartz, V.; et al *Thermal stability and catalytic activity of gold nanoparticles supported on silica*, Journal of Catalysis 262 (2009) 92–101
- 168 - Worsh, C.; Wisniewsky, W.; Kracker, M.; Rüssel, C. *Gold nano-particles fixed on glass*, Applied Surface Science 258 (2012) 8506–8513
- 169 - Mohamed, S. H.; Kappertz, O.; Ngaruiya, J. M.; Pedersen, T. P.; Drese, R.; Wittig, M. *Correlation between structure, stress and optical properties in direct current sputtered molybdenum oxide films*, Thin Solid Films 429 (2003) 135–143
- 170 - Vink, T. J.; Verbeek, R. G. F. A.; Snijders, J. H.; M.; Tamminga, Y. *Physically trapped oxygen in sputter-deposited MoO<sub>3</sub> films*, Journal of Applied Physics 87 (2000) 7252
- 171 - Couzinié-Devy, F.; Barreau, N.; Kessler, J. *Dependence of ZnO:Al properties on the substrate to target position in RF sputtering*, Thin Solid Films 516 (2008) 7094–7097
- 172 - Li, T. C.; Chung, C. J.; Han, C. F.; Lin, J. F. *Effects of inclination angle applied to a polyethylene terephthalate substrate before the coating of Al-doped Zn O on film quality and mechanical and optical properties*, Ceramics International 40 (2014) 6987–6998
- 173 - Khan, S.A.; Heinig, K. H.; Avasthi, D. K.; *Atomistic simulations of Au-silica nanocomposite film growth*, Journal of Applied Physics 109 (2011) 9
- 174 - Kwon, J.; Yoon, T.; Kim, K.; Min, S. *Comparison of the agglomeration behavior of Au and Cu films sputter deposited on silicon dioxide*, Journal of Applied Physics 93, 3270 (2003)

## Referências Bibliográficas

- 175 - Szunerits, S.; Boukherroub, R. *Electrochemical investigation of gold/silica thin film interfaces for electrochemical surface plasmon resonance studies*, *Electrochemistry Communications* 8 (2006) 439–444
- 176 - sun, X.; Hong, R.; Hou, H.; Fan, Z.; Shao, J. *Thickness dependence of structure and optical properties of silver films deposited by magnetron sputtering*, *Thin Solid Films* 515 (2007) 6962–6966
- 177 - Wang, L.; Wang, W.; Di, L.; Lu, Y.; Wang, J. *Protein adsorption under electrical stimulation of neural probe coated with polyaniline*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 80 (2010) 72–78
- 178 - Ricci, E.; Novakovic, R. *Wetting and surface tension measurements on gold alloys*, *Gold Bulletin*, 2001, 34(2), 41-49
- 179 - Morga, M.; Para, G.; Adamczyk, Z.; Karminski, A. *Silica binders wetting property modification in investment casting*, [http://mech-ing.com/journal/Archive/2010/4-5/2-Tehnologii/54\\_Maria%20Morga.pdf](http://mech-ing.com/journal/Archive/2010/4-5/2-Tehnologii/54_Maria%20Morga.pdf), maio 2012
- 180 - <http://www.billhansenthinfilmx-ray.com/CoatingStress.html>
- 181 - Reichelt, K.; Jiang, X. *The preparation of thin films by physical vapour deposition methods*, *Thin Solid Films* 191 (1990) 91-126
- 182 - Pease, R.F.W. *Significant Advances in Scanning Electron Microscopes (1965–2007)*, *Advances in Imaging and Electron Physics* 150 (2008) 53-86
- 183 - Kumar, B.; Rao, T. *AFM studies on surface morphology, topography and texture of nanostructured zinc aluminium oxide thin films*, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostuctures*, 2012, 7, 181-189
- 184 - Sangpour, P.; Akhavan, O.; Moshfegh, A. Z. *The effect of Au/Ag ratios on surface composition and optical properties of co-sputtered alloy nanoparticles in Au–Ag:SiO<sub>2</sub> thin films*, *Journal of Alloys and Compounds* 486 (2009) 22–28
- 185 - Battaglin, G.; Cattaruzza, E.; Gonella, F.; Poloni, R.; Scremin, B.F.; Mattei, G.; et al., *Structural and optical properties of Cu:silica nanocomposite films prepared by co-sputtering deposition*, *Applied Surface Science* 226 (2004) 52–56
- 186 - Gohil, S.; Baerjee, R.; Bose, S.; Ayyub, P. *Influence of synthesis conditions on the nanostructure of immiscible copper–silver alloy thin films*, *Scripta Materialia* 58 (2008) 842–845
- 187 - Hernandez, L. C.; Ponce, L.; Fundora, A.; Lopez, E.; Perez, E. *Nanohardness and Residual Stress in TiN Coatings*, *Materials* 2011, 4, 929-940;
- 188 - Dey, A.; Mukhopadhyay, A. K. *Nanoindentation of Brittle solids*, 2014 by Taylor Francis Group, LLC
- 189 - Nunes, J.; Piedade, A. P. *Nanoindentation of functionally graded hybrid polymer/metal thin films*, *Applied Surface Science* 284 (2013) 792– 797

- 190 - Makishima, A., Mackenzie, J. D. *Direct calculation of Young's modulus of glass*, Journal of Non-Crystalline Solids 12 (1973) 35-45
- 191 - Matecki, M. Lucas J. *Elastic moduli of fluoride glasses: Application of makishima and mackenzie's theory*, Materials Research Bulletin 1994 29 5 473
- 192 - Rocherulle, J. Evolivet, C.; Poulain, M.; Verdier, P.; Laurent U. *Elastic moduli of oxynitride glasses*, Journal of Non-Crystalline Solids 1989 108 187.
- 193 - Zhou, Y.; Erb, U.; Aust, K. T.; Palumbo, G. *The effects of triple junctions and grain boundaries on hardness and Young's modulus in nanostructured Ni-P*, Scripta Materialia 48 (2003) 825-830
- 194 - Saada, G. *Hall-Petch revisited*, Materials Science and Engineering 400-401 (2005) 146-149.
- 195 - Lin, Y. C., Weng, Y. J., Pen, D. J., Li, H. C. *Deformation model of brittle and ductile materials under nano-indentation*, Materials and design 30 (2009) 1643-1649
- 196 - Gutier, P.; Darbeida, A.; Billard, A.; Frantz, C.; Stebut, J. *Tribological behaviour of N- or O-doped austenitic stainless-steel magnetron sputter-deposited coatings*, Surface and Coatings Technology 114 (1999) 148-155
- 197 - Mahieu, S.; Depla, D.; Gryse, R. *Characterization of the hardness and the substrate fluxes during reactive magnetron sputtering of TiN*, Surface and Coatings Technology 202 11 (2008) 2314-2318
- 198 - Cao, Y.; Allameh, S.; Nankivil, D.; Sethiaraj, S.; Otit, T.; Soboyejo, W. *Nanoindentation measurements of the mechanical properties of polycrystalline Au and Ag thin films on silicon substrates: Effects of grain size and film thickness*, Materials Science and Engineering: A 427 (2006) 232-240
- 199 - Chen, Y.; Wu, C. *Effect of grain size on nano-indentation property of Co60Fe20B20 thin film*, Journal of Alloys and Compounds, 551 (2013) 360-364
- 200 - Zhou, J.; Li, Y.; Zhu, R.; Zhang, Z. *The grain size and porosity dependent elastic moduli and yield strength of nanocrystalline ceramics*, Materials Science and Engineering: A 445-446 (2007) 717-724
- 201 - He, Q.; C. *Characterization of the anisotropic materials capable of exhibiting an isotropic Young or shear or area modulus*, International Journal of Engineering Science 42 19-20 (2004) 2107-2118
- 202 - Yang, Q.; HE, C.; Zhao, L.R.; Immarigeon, J *Preferred orientation and hardness enhancement of TiN/CrN superlattice coatings deposited by reactive magnetron sputtering*, Scripta Materialia 4 (2002) 293-297
- 203 - Kamaya, M. *A procedure for estimating Young's modulus of textured polycrystalline materials*, International Journal of Solids and Structures, 46 13 (2009) 2642-2649

## Referências Bibliográficas

- 204 - Zhang, J.; Zhang, Y.; Xu, K.; Ji, V. *Anisotropic elasticity in a textured cubic film plane*, Physica B: Condensed Matter, 403 19-20 (2008) 3379-3383
- 205 - Miller, W.J.; Leventhal, I.; Scarsella, D.; Haydon, P. G.; Janmey, P.; Meaney, D. F. *Mechanically induced reactivi gliosis causes ATP-mediated alterations in astrocyte stiffness*, Journal of Neurotrauma 26 (2009) 5, 789-97
- 206 - Fowkes, F.M.; Riddle, F.L.; Pastore, W.E.; Weber, A.A. *Interfacial interactions between self-associated polar liquids and squalane used to test equations for solid-liquid interactions*, Colloids and Surfaces 43 (1990) 367.
- 207 - Vogler, E.A. *Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces*, Advances in Colloid and Interface Science 74 (1998) 69-117
- 208 - <http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/349223.html> em Janeiro 2013
- 209 - Wang, S. G.; Tian, E. K.; Lung, C. W. *Surface energy of arbitrary crystal plane of bcc and fcc metals*, Journal of Physics and Chemistry of Solids 61 (2000) 1295-1300
- 210 - Galanakis, I.; Papanikolaou, N.; Dederichs, P. H. *Applicability of the broken-bond rule to the surface energy of the fcc metals*, Surface Science 511 (2002) 1-12
- 211 - Ana Paula Fonseca Piedade *A pulverização catódica e os biomateriais*, Tese de Doutorado, Universidade de Coimbra (2001)
- 212 - ding, Y.; Li, Y.; Yang, L.; Li, Z.; Xin, W.; Liu, X.; Pan, L.; Zhao, J. *The fabrication of controlled coral-like Cu<sub>2</sub>O films and their hydrophobic property*, Applied Surface Science 266 (2013) 395– 399
- 213 - huang, D.; Leu, T. *Fabrication of high wettability gradient on copper substrate*, Applied Surface Science 280 (2013) 25– 32
- 214 - Min, J.; Wo, X.; Gao, F. *Hydrophilic Treatments of Copper Finned Tube evaporators*, International Refrigeration and Air Conditioning Conference at Purdue, July 14-17, 2008
- 215 - Kubiak, K.J.; Wilson, M.C.T.; Mathia, T.G.; Carval, P. *Wettability versus roughness of engineering surfaces*, Wear 271 3–4 (2011) 523–528
- 216 - Slaughter, G.E.; Bieberich, E.; Wnek, G.E.; Wynne, K.J.; Guiseppi-Elie, A. *Improving Neuron-to-Electrode Surface Attachment via Alkanethiol Self-Assembly: An Alternating Current Impedance Study*, Langmuir 2004, 20, 7189-7200
- 217 - Bibari, O.; Sauter-Starace, F.; Mailley, P.; Dijon, J, Rouviere, R.; Charvet, G.; et al., *Characterization of nanostructured electrodes for neural implant*, TNT2007 - Trends in nanotechnology (2007) Poster
- 218 - Walker, S. L.; Hill, J. E.; Redman, J. A.; Elimelch, M. *Influence of growth phanse on adhesion kinetics of Escherichia coli D21g*, Appl, Environ. Microb. 70 (2005) 3093-3099

- 219 - Brett, A. M. O. *Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*, Livraria Almedina (2000)
- 220 - Chen, Z. J., Glillies, G. T.; Broaddus, W. C.; Prabhu, S. S.; Fillmore, H.; Mitchell, R.M. et al *A realistic brain tissue phantom for intraparenchymal infusion studies*, Journal of Neurosurgery 101 (2004) 2 314-322
- 221 - Regalado, N. G.; Martin, G.; Antony, S. J. *Acinetobacter lwoffii: Bacteremia associated with acute gastroenteritis*, Travel Medicine and infectious disease 7 (2009) 316-317
- 222 - Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. *Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy: elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver*, Nanoscale, 2013, 5, 7328
- 223 - Campoccia, D.; Cangini, I.; Selan, L.; Vercellino, M.; Montanaro, L.; Visai, L. et al *An overview of the methodological approach to the invitro study of anti-infective biomaterials*, International Journal of Artificial Organs 35 (2012) 800-816
- 224 - Desrosseayx, C.; Sautou, V.; Descamps, S.; Traoré, O. *Modification of the surface of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation*, Journal of hospital Infection 85 (2013) 87-93
- 225 - Applerot, G.; Lellouche, J.; Lipovsky, A.; Nitzan, Y.; Lubart, R.; Gedanken, A.; Banin, E. *Understanding the antibacterial mechanism of CuO nanoparticles: revealing the route of induced oxidative stress*, Small 8 (2012) 21 3326-37
- 226 - Husheng, J.; Wensheng, H.; Liqiao, W.; Bingshe, X.; Xuguang, L. *The structures and antibacterial properties of nano-SiO<sub>2</sub> supported silver/zinc-silver materials*, dental materials 2 (2008) 4 244-249
- 227 - Bagchi, B.; Kar, S.; Dey, S. K.; Bhandary, S.; Roy, D.; Mukhopadhyay, T.; et al *In situ synthesis and antibacterial activity of copper nanoparticle loaded natural montmorillonite clay based on contact inhibition and ion release*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 108 (2013) 358- 365
- 228 - Freire E, Gomes F, Jotha-Mattos T, Neto VM, Filho FCF, Coelho-Sampaio T *Sialic acid residues on astrocytes regulate neuritogenesis by controlling the assembly of laminin matrices*, Journal of Cell Science (2004) 117, 4067-4076
- 229 - Huang, Y. X.; Wu, Z. J.; Mehrishi, J.; Huang, B.T.; Chen, V. Y.; Zheng, X. J.; Luo, M. *Human red blood cell aging: correlative changes in surface charge and cell properties*, Journal of Cellular and Molecular Medicine 15 (2011) 2634-2642
- 230 - Mattotti, M.; Alvarez, Z.; Ortega, J.; Planell, J.A.; Elngel, E.; Alcántara, S. *Inducing functional radial glia-like progenitors from cortical astrocyte cultures using micropatterned PMMA*, Biomaterials 330 (2012) 6 1759-1770

## Referências Bibliográficas

- 231 - Yang, S.; Wang, G.; Huang, X.; Zhang, Q.; Wu, J.; Tang, C.; Yu, Que.; Liu, X. *Surface wettability of plasma SiOx: H nanocoating-induced endothelial cells migration and the associated FAK-Rho GTPases signaling pathways*, Journal of Royal Society Interface 9, 313-327
- 232 - Fan, Y. W.; Cui, F. Z.; Chen, L. N.; Zhai, Y.; Xu, Q. Y.; Lee, I. S. *Adhesion of neural cells on silicon wafer with nano-topographic surface*, Sensors and Actuators A 74 (1999) 139-142
- 233 - Fang, Y. W.; Cui, F. Z.; Hou, S. P.; Xu, Q. Y.; Chen, L. N. *Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topography*, Journal of Neuroscience Methods (2002) 120, 17-23
- 234 - Young T. H.; Chang H. H.; Lin, D. J.; Cheng, L. P. *Surface modification of microporous PVDF membranes for neuron culture*, J. Memb. Sci. 350 (2010) 32-41
- 235 - He, W.; Bellamhonda, R.V. *Nanoscale neuro-integrative coatings for neural implants*, Biomaterials 26 (2005) 2983-2990
- 236 - Lee, S. J.; Khang, G.; Lee, Y. M.; Lee, H. B. *The effect of surface wettability on induction and growth of neuritis from PC-12 cell on a polymer surface*, Journal of Colloidal Interface Science 259 (2003) 228-235.
- 237 - Engler, A.; Bacakova, L.; Newman, C.; Hategan, A.; Griffin, M.; Discher, D. *Substrate compliance versus ligand density in cell on gel response*, Biophysics Journal 86 (2004) 617-628
- 238 - Balgude, A. P.; Yu, X.; Szymanski, A.; Bellamkonda, R.V.; *Agarose gel stiffness determines rate of DRG neurite extensions in 3D cultures*, Biomaterials 22 (2001) 1077-1084.
- 239 - Flanagan, L. A.; Ju, Y. E.; Marg, B.; Osterfield, M.; Janmery, P. A *Neurite branching on deformable substrates*, Neuroreport 13 (2002) 2411-2415
- 240 - Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*, Cell 126 (2006) 677-689
- 241 - Buss, A.; Brook, G. A.; Kakulas, B.; Martin, D.; Franzen, R.; Schenen, J.; et al *Gradual loss of myelin and formation of an astrocyte scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord*, Brain 127 (2004) 34-44
- 242 - Chen, Y.; Swanson, R. A. *Astrocytes and brain injury*, Journal of cerebral blood flow & metabolism 23 (2003) 137-149
- 243 - Potter, S. M.; DeMarse, T. B. *A new approach to neural cell culture for long-term studies*, Journal of Neuroscience Methods 137 (2004) 257-263
- 244 - Koeneman, B. A.; Lee, K-K; Singh, A.; He, J.; Raupp, G.; Panitch, A.; Capco, D. G. *An ex vivo method for evaluating the biocompatibility of neural electrodes in rat brain slice cultures*, Journal of Neuroscience Methods 110 (2001) 17-25



- 245 - Raffa, V.; Pensabene, V. *Design criteria of neuron/electrode interface. The focused ion beam technology as an analytical method to investigate the effect of electrode surface morphology on neurocompatibility*, Journal of Neuroscience Methods 137 (2004) 257-263
- 246 - Zhong, Y.; Bellamkonda, R.V. *Controlled release of anti-inflammatory agent  $\alpha$ -MSH from neural implants* Journal of Neuroscience Methods 137 (2004) 257-263

## *Referências Bibliográficas*

## **Anexo 1 – Técnica de deposição: pulverização catódica**

A pulverização catódica consiste na ejeção de átomos ou partículas de um material, quando este é sujeito ao bombardeamento com iões que possuam energia suficiente para vencer a sua energia de ligação.

Numa câmara de deposição a pressão reduzida é estabelecida uma descarga elétrica, que leva à deposição de uma fina camada de material constituinte do cátodo sobre o material do ânodo e sobre as paredes da câmara de deposição. O cátodo é constituído pelo material que se pretende depositar, designado por alvo. No ânodo são colocadas as peças que serão revestidas, denominadas de substrato.

O processo de deposição por pulverização catódica apresenta três fases distintas:

- ejeção do material do alvo;
- transporte do material ejetado;
- formação e crescimento do filme.

A ejeção do material do alvo é conseguida por simples troca de quantidade de movimento entre os iões positivos de gás raro ionizado com o material constituinte do alvo. O argon é um dos gases raros mais utilizados. É um gás inerte pelo que apresenta a vantagem de não permitir que se formem compostos entre os iões do gás e o material do alvo. Tem um peso atómico que garante um coeficiente de pulverização adequado para a maioria dos elementos químicos, com um baixo custo e elevada disponibilidade no mercado, com elevada pureza.

No decurso da ionização no interior da câmara é formado um plasma que necessita de ser estável, para que o processo decorra de uma forma contínua. Para que os iões positivos do plasma colidam com o alvo, devem ser acelerados por um potencial negativo. No entanto, a ejeção só ocorre se a energia dos iões incidentes for superior à barreira de potencial de superfície dos átomos constituintes do alvo. Por este motivo, o potencial aplicado nos eléctrodos deve ser elevado, para que os iões possam adquirir energia suficiente para promoverem a ejeção de electrões secundários ao embater no substrato, contribuindo para a manutenção do plasma.

A pressão na câmara de deposição necessita de ser bem controlada pois se para promover maior número de colisões entre os electrões secundários e os átomos de gás, permitindo a manutenção do plasma, deve apresentar um valor elevado. Contudo não deverá ser excessivamente elevada para evitar que os iões sofram demasiadas colisões no seu percurso, levando à perda de energia.

Caso possuam energia suficiente, as partículas ejetadas do alvo são encaminhadas através do plasma para o substrato, onde acabam por se depositar. A trajetória das partículas ejetadas é aleatória, na sua direção, seguindo uma lei tipo cosseno.

Ao chegarem à superfície do substrato, os átomos ejetados do alvo transferem a sua energia cinética para o mesmo, tomando a designação de adátomos, isto é átomos não ligados que se movimentam na superfície do substrato. Estes sofrem difusão ao longo da superfície, acabando por se acomodar à rede do substrato em locais de baixa energia (Fig. A1.1).

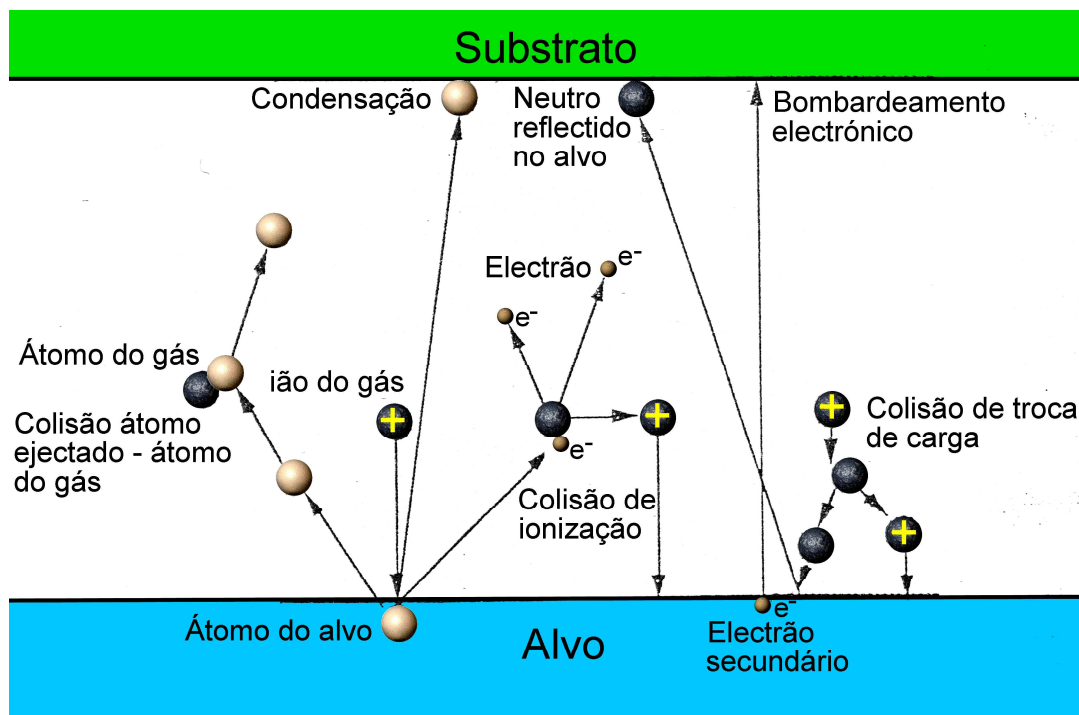
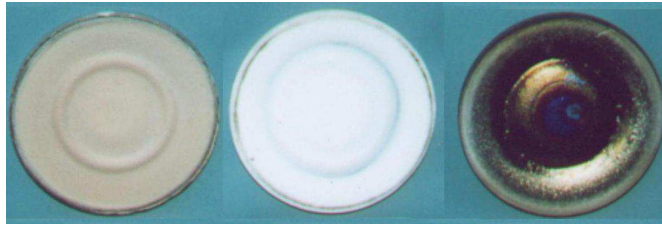


Figura A1.1- Esquema do processo de deposição por pulverização catódica.

As propriedades dos filmes depositados por esta técnica, assim como a sua taxa de deposição, dependem do material do alvo, do gás utilizado para o plasma, e dos parâmetros de deposição tais como a pressão, a distância alvo-substrato, a polarização do substrato e a composição dos gases presentes que, para além do gás de descarga, podem incluir outras espécies químicas. Neste caso a deposição tem a designação de reativa.

A utilização de um magnetrão associado ao cátodo permite obter taxas de deposição mais elevadas. O campo magnético criado impõe trajetórias obrigatórias aos elétrons ejetados pelo alvo. No entanto, provoca uma erosão preferencial no alvo, na zona que engloba essas trajetórias (Fig. A1.2)



**Figura A1.2-** Erosão preferencial em alguns alvos.

Uma polarização negativa do substrato provoca um bombardeamento iônico do substrato ou do filme em crescimento, diminuindo a velocidade de deposição. Pode originar espessuras diferentes quando o substrato tem uma geometria complexa, provocar alterações da composição química do filme e incorporação dos íons do gás de descarga no filme. No entanto, permite obter filmes com menor tamanho de partícula, maior densidade e com melhor adesão ao substrato.

### *Bibliografia*

Cavaleiro, A.; Vieira, M. T.; (1995) “*Textos de apoio às disciplinas de engenharia de superfícies e degradação e protecção de superfícies*”; pág. 6-43, Mestrado em Engenharia Mecânica, Mestrado Nacional em Engenharia de Materiais, Coimbra.

## **Anexo 2 – Técnicas de caracterização**

### **A2.1 – Microanálise por sonda eletrónica (EPMA )**

A microanálise por sonda eletrónica é um método experimental não destrutivo que permite a análise química elementar de uma amostra sólida.

O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se em espectrometria de raios X, quando emitidos por uma amostra depois de sujeita ao bombardeamento por um feixe de eletrões incidentes. O feixe é acelerado e finamente focado sobre o objeto, através de um sistema ótico-eletromagnético constituindo uma sonda fina o que permite uma análise localizada, à escala do micrómetro. Os comprimentos de onda dos raios X emitidos são independentes do estado da ligação química, dando origem a uma análise elementar.

Esta técnica está vocacionada para o estudo das características locais de um material. No entanto, é possível utilizá-la em modo de varrimento, possibilitando a análise em área das amostras.

Os elementos principais de qualquer microsonda são: o sistema de produção da sonda e o espectrómetro que deteta os raios X acoplado a um sistema de aquisição e tratamento de dados (Fig. A2.1).

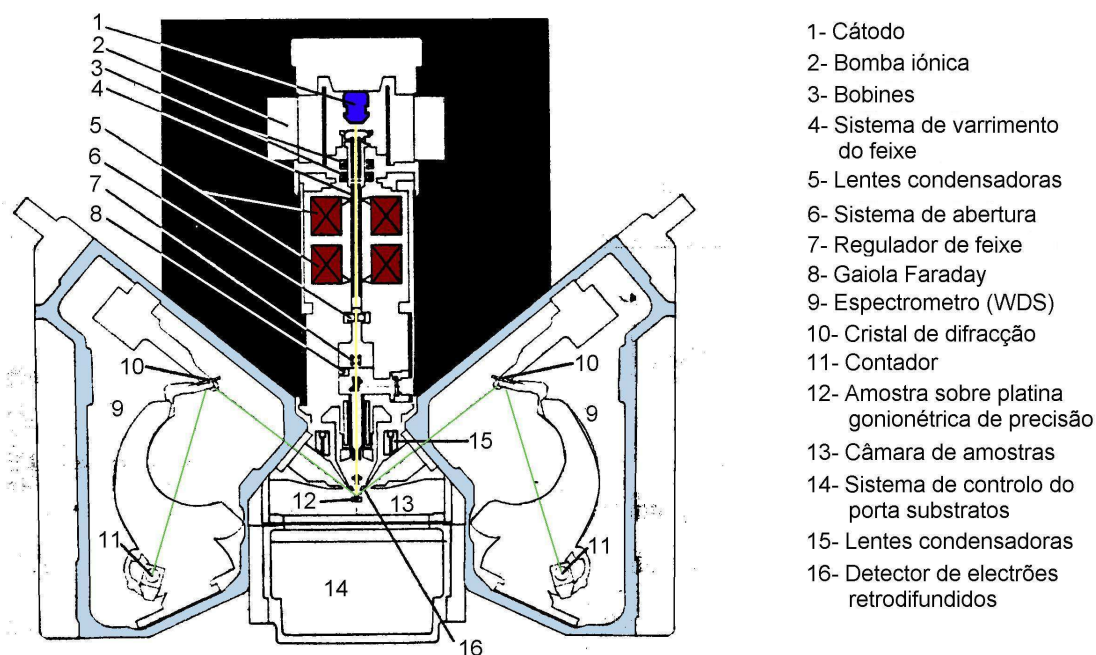


Figura A2.1- Esquema da microsonda utilizada [adaptado de Piedade AP].

Apesar do diâmetro da sonda depender da fonte de eletrões e do sistema ótico de focagem, deve-se ter em atenção as limitações praticas impostas pelo equipamento:

- a intensidade total do feixe incidente deve ser elevada de forma a permitir uma taxa de contagens fiável;
- o fluxo de eletrões por unidade de superfície depende da resistência da amostra ao bombardeamento eletrónico.

No entanto, o diâmetro do volume ativo analisado na amostra é determinado pela propagação de eletrões incidentes, não se restringindo unicamente ao diâmetro da sonda. Assim, devem ser analisadas amostras condutoras com espessura superior à profundidade do volume de emissão.

Esta técnica permite realizar uma caracterização da composição química elementar das amostras, tanto qualitativa como quantitativa.

Na análise qualitativa, o espectrómetro efetua o varrimento do espectro total de comprimentos de onda. Através da análise dos picos do espectro de Raios X, ou seja, as riscas características do número atômico e também do seu comprimento de onda, permite identificar o elemento emissor.

As ordens de grandeza dos limites de detecção, para uma amostra espessa, utilizando EPMA, numa análise qualitativa em modo de sonda fixa com um diâmetro de 1  $\mu\text{m}$ , são de:

- elementos detetados:  $Z \geq 5$  (Boro);
- massa detetável:  $M_{\text{min}}: 10^{-15} - 10^{-13}$  g;
- número mínimo de átomos detetáveis:  $N_{\text{min}}: 10^7 - 10^9$ .

Na análise quantitativa, a concentração de um elemento é determinada através da intensidade, sob a forma de uma taxa de contagens, de um Raio X característico. Compara-se a intensidade da amostra com a intensidade de um padrão, nas mesmas condições experimentais, que contem o elemento desejado numa concentração conhecida.

Há alguns modelos disponíveis para melhorar a precisão da análise quantitativa. O modelo P. & P. é um destes, recorre a uma função de distribuição de profundidade de radiação primária, que envolve cálculos computacionais dos parâmetros físicos tais como: distribuição da profundidade de radiação, ionização da superfície, profundidade última e máxima de ionização, trajeto percorrido pelo eletrão e o número de ionizações geradas pelo eletrão incidente. Este modelo é totalmente analítico e não requer tempos de cálculo muito longos, podendo ser usado como modelo de correção geral em microanálise quantitativa, sendo particularmente eficaz nas seguintes condições:

- análise de elementos leves e muito leves;
- análise de elementos com um número atômico médio através das linhas L;
- análise de elementos pesados através das suas linhas M;
- análise de amostras cujo do efeitos do número atômico se façam sentir intensamente.

Em condições adequadas, a precisão da análise do equipamento é da ordem de 100-200 ppm para elementos eletronicamente densos e quando os erros associados a este tipo de análise são atenuados. A amostra constitui a principal fonte de erro nas análises efetuadas por microsonda, porque para além de um excelente estado superficial deve estar isenta de defeitos.

*Bibliografia*

Piedade, Ana P.F.; (2000) “*A pulverização catódica e os biomateriais*”; pág. 26-29, Dissertação apresentada da Universidade de Coimbra para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Mecânica na especialidade de Ciências dos Materiais, Coimbra.

Pouchou, J. L. et Pichoir, F. (1984) “*A new model for quantitative X-ray microanalyses. Part I- Application to the analyses of homogeneous samples*”, La Recherché Aéropacial, 3, 13-38.

Eberhart, J. P.; (1989) “*Analyses structural et Chimique de Matériaux*”; Paris, Dunot.

## **A2.2 – Difração de raios X**

A técnica de difração de raios X permite determinar a estrutura e a composição física de um material. Os raios X são gerados por bombardeamento de um alvo metálico com um feixe de elétrons de elevada energia cinética. A aceleração do feixe de elétrons é produzida por uma diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo.

Os raios X são radiação invisível muito penetrante de natureza semelhante aos raios luminosos, fazendo parte do espectro eletromagnético. O que os diferencia são os comprimentos de onda muito pequenos, que se estendem numa vasta gama de valores (0,05-0,25 nm).

Os raios X têm as seguintes propriedades:

- penetram a matéria opaca à luz visível;
- ativam emulsões fotográficas e alvos fluorescentes;
- não são afetadas por campos elétricos ou magnéticos;
- são refletidas, difratadas, refratadas e polarizadas, tal como a radiação visível;
- são absorvidas diferentemente pela matéria;
- ionizam gases, entre outros.

Considerando os dois aspetos complementares da radiação (natureza ondulatória e corpuscular), os raios X podem representar-se quer por ondas com um certo comprimento de onda ( $\lambda$ ), ou frequência ( $\nu$ ), quer por um feixe de fótons que se propagam com a velocidade da luz e em que cada fóton possui uma energia:

$$\nu = \frac{c}{h\lambda} \quad (\text{A2.2.1})$$



em que  $h$  é a constante de Planck e  $c$  a velocidade da luz.

Um feixe de raios X ao atravessar matéria absorvente é em parte absorvido e em parte transmitido. A matéria interage com os raios X por dois processos distintos:

- uma absorção verdadeira, que corresponde ao efeito fotoelétrico, o qual envolve transferência de energia de raios X em energia cinética de elétrons ejetados. Deste modo resulta a emissão de dois tipos de radiação: eletrônica (fotoelétrons) e radiação X característica de fluorescência;
- difusão que corresponde a um desvio de alguns raios incidentes pelos átomos de matéria absorvente, de tal modo que emergem em direções diferentes das do feixe transmitido. Este desvio pode dar-se sem perda de energia, originando uma radiação difusa coerente, ou com ligeira perda de energia da qual resulta uma radiação incoerente.

O equipamento de difração de raios X é constituído por um detetor montado sobre um braço móvel dum goniómetro, ligado ao porta-amostras por um sistema de engrenagens que comunica a um contador uma velocidade angular dupla da do porta-amostras. Desta maneira efetua-se automaticamente a focalização das radiações difratadas. Um conjunto de fendas próprias permite limitar a divergência vertical e angular da radiação incidente e difratada.

Ao goniómetro imprime-se uma velocidade escolhida designada por velocidade de exploração. O número de fotões que o tubo conta por unidade de tempo (velocidade de contagem) é uma medida da intensidade difratada numa estrita zona angular.

Os impulsos fornecidos pelo contador são transmitidos a um painel registador por intermédio dum circuito de amplificação, obtendo-se os registos da difração que traduzem diretamente as intensidades das riscas de difração (os picos) em função do ângulo de difração  $2\theta$ . A intensidade registada e a forma dos picos dependem das constantes de tempo do circuito eletrónico e da sensibilidade do circuito registador.

Um registo correto e reproduzível exige uma estabilidade ótima do gerador de raios X. Em determinações precisas da distribuição da intensidade numa risca de difração, pode ser utilizado um dispositivo automático de contagem por passos (“Step-Counting”) que permite o registo das intensidades para incrementos fixos do valor angular de reflexão. A eficiência do difratómetro pode ser melhorada utilizando radiação monocromática

## *Anexos e Apêndices*

conseguida com um  $2 d_{hkl} \sin \theta = n \lambda$  monocromador de cristal curvo, colocado no trajeto do feixe de raios X difratados.

Quando um feixe de raios X monocromático interage com a superfície de um material cristalino ocorre a difusão coerente da radiação pelos átomos do material. Parte da radiação incidente é refletida no primeiro plano estrutural e a restante penetra na estrutura sendo refletida nos planos sucessivos ( $hkl$ ), originando um reforço da onda inicial caso se verifique igualdade entre as diferenças de percursos óticos e um múltiplo inteiro do comprimento de onda do feixe incidente. Este modelo traduz as condições geométricas necessárias para ocorrência de difração de raios-X, postuladas pela lei de Bragg (A2.2.2), sendo  $d_{hkl}$  a distância entre planos cristalinos,  $\theta$  o ângulo de difração que corresponde ao ângulo descrito pelos raios incidentes e os planos difractantes e  $n$  a ordem de difração que respeita à diferença de percursos entre as ondas difratadas por dois planos consecutivos, tomando sempre valores inteiros positivos.

$$(A2.2.2) \quad n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta$$

A difração de raios X oferece importantes vantagens, tais como: não ser um método destrutivo, exigir uma pequena quantidade de amostra, permitir a identificação das espécies cristalinas presentes no material analisado e ter a capacidade de distinção das diferentes variedades alotrópicas ou polimórficas de um composto.

A identificação dos planos de difração presentes na amostra analisada é realizada comparando as fichas padrão do “*International Center for Diffraction Data*” (ICDD) com os resultados experimentais.

### *Bibliografia*

Piedade, Ana P.F. (2000) “*A pulverização catódica e os biomateriais*”; pág. 45-47, Dissertação apresentada da Universidade de Coimbra para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Mecânica na especialidade de Ciências dos Materiais, Coimbra.

Whan, R. E.; et al, “*ASM Handbook Vol. 10: Materials Characterization*”; 5<sup>th</sup> edition, (1998);ASM International; pp. 663-868.

### A2.3 – Microscopia Eletrônica

A existência de um limite máximo para a resolução de uma lente depende da sua abertura e do comprimento de onda da radiação, segundo a lei de *Ernst Abbe* (equação A2.3.1).

$$\delta = \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \text{sen}\beta} \quad (\text{A2.3.1})$$

onde  $\delta$  corresponde à distância mínima de resolução (como definiu Lorde Rayleigh),  $\lambda$  ao comprimento de onda da radiação,  $n$  ao índice de refração e  $\beta$  ao ângulo de abertura da lente. Desta maneira, uma das formas de aumentar a resolução de um instrumento ótico corresponde à utilização de radiações com o menor comprimento de onda possível.

A teoria da dualidade da onda - partícula, formulada por *de Broglie*, associava a cada partícula em movimento uma onda eletromagnética dada pela equação A2.3.2.

$$\lambda = \frac{h}{p} \quad (\text{A2.3.2})$$

em que  $h$  é a constante de *Planck* e  $p$  o momento linear da partícula. Ignorando os efeitos relativísticos, o comprimento de onda dos elétrons acelerados pelo potencial  $U_e$  (em Volt), é dado pela equação A1.3.3.

$$\lambda(\text{nm}) = \frac{1,226}{\sqrt{U_e}} \quad (\text{A2.3.3})$$

A um potencial de aceleração da ordem dos 200 kV corresponde um comprimento de onda de 0,0027 nm, sendo teoricamente uma resolução ( $\delta$ ) da ordem dos 0,21 nm, no limiar da resolução atômica. Porém, consoante o comportamento do feixe em relação à amostra poderá dar resultados completamente diferentes, como no caso da microscopia de varrimento ou de transmissão.

#### *Bibliografia*

Malkusch, W.; Baush, H.; Schäfer, L.(2001) “*Digital light microscopy: Prerequisite for optimum contrast enhancement and increase of resolution*”; *Experimental Gerontology* 36 1199-1217.

Williams, D. B., Carter, C. B.; “*Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science.*; Plenum Press (1996) New York and London.

### A2.3.1 Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

O princípio de funcionamento do SEM consiste no varrimento superficial da amostra por um feixe de elétrons finamente focado, fazendo sincronizadamente o varrimento de um ecrã de visualização. Deste modo, obtém-se uma correspondência pontual entre a imagem e a zona da amostra observada (Fig. A2.3.1).

Esta correspondência pontual pode ser proveniente da emissão de elétrons secundários, como resultado da interação entre os elétrons incidentes e as orbitais dos átomos constituintes da amostra, ou de elétrons retrodifundidos, dependendo da natureza da informação contida na imagem, do tipo de elétrons emitidos e do detetor utilizado.

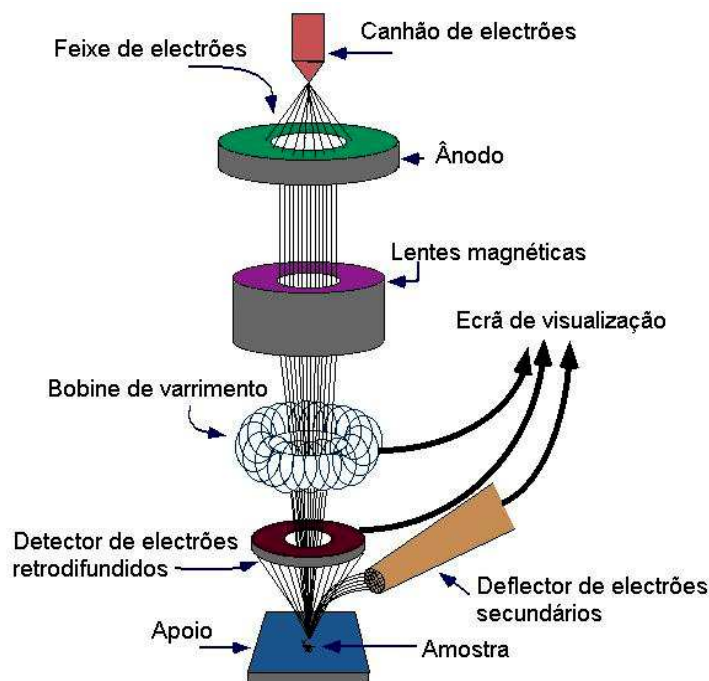


Figura A2.3.1 - Esquema de funcionamento do equipamento SEM.

### Bibliografia

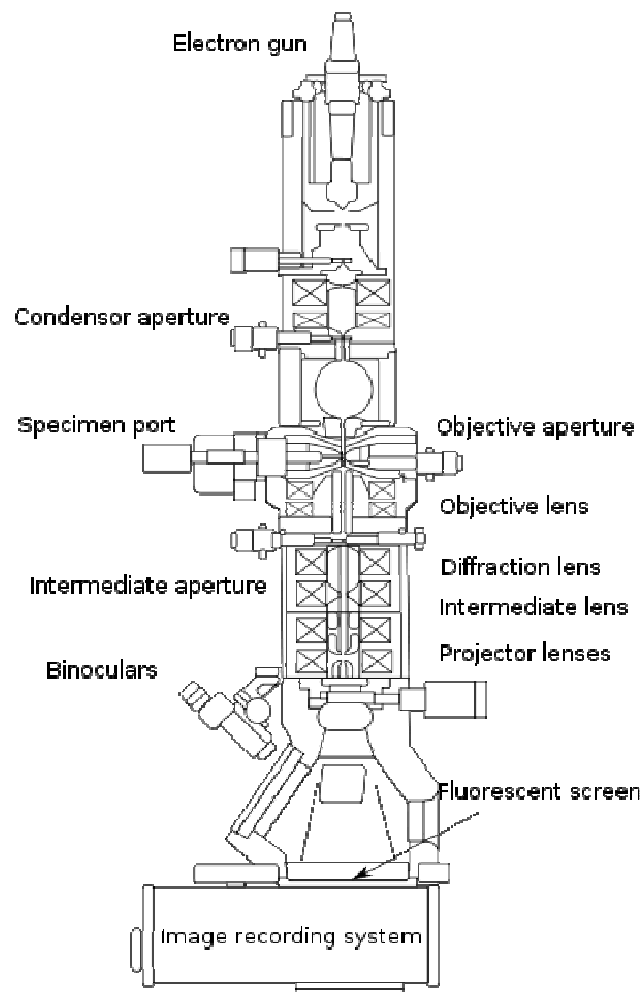
<http://www.adpc.purdue.edu/PhysFac/rem/rs/sem.htm>, em novembro 2007.

Whan, R. E.; et al, “ASM Handbook Vol. 10: Materials Characterization”; 5<sup>th</sup> edition, 1998;ASM International; pp. 886-997.

### A2.3.2 – Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Em microscopia eletrônica de transmissão o feixe de elétrons é produzido de uma forma análoga à da microscopia eletrônica de varrimento. Contudo, neste caso, não se pretende somente analisar o que resulta da incidência do feixe, mas o que acontece ao feixe ao atravessar a amostra.

Por um lado, a densidade atômica da amostra, ou a presença de defeitos irá refletir-se na intensidade do feixe, revelando áreas mais escuras ou mais claras. Desta maneira, é possível identificar defeitos nos cristais, assim como fronteiras de grão, na chamada imagem de campo claro. Por outro, à semelhança da difração de raios X, parte do feixe irá ser difratado pelos planos atômicos, e assim permitir a identificação da estrutura de cada fase presente na amostra. A identificação das fases é feita à mesma pelas fichas ICDD da difração de raios X. Também é possível iluminar apenas alguns grãos que tenham uma determinada orientação ou que sejam de uma determinada fase, através do chamado campo escuro.



**Figura A2.3.2** - Esquema de funcionamento do equipamento TEM.

No entanto, para que o feixe de elétrons seja transmitido através da amostra e resulte numa imagem, é necessário que a espessura da amostra seja muito fina, inferior a 50nm. Mais ainda, a própria preparação, desde a deformação plástica causada pela diminuição da espessura, ou algum aquecimento causado pelo polimento iónico, pode introduzir artefactos na amostra. Deste modo, uma boa preparação das amostras é a condição fundamental para uma boa observação, com o mínimo de interferência possível. O processo de preparação de amostras é moroso e deve ser efetuado com muito cuidado.

### *Bibliografia*

[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Scheme\\_TEM\\_en.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Scheme_TEM_en.svg), em fevereiro 2013.

Williams, D. B., Carter, C. B.; *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science.*; Plenum Press. New York and London, 1996.

## **A2.4 – Propriedades mecânicas**

A dureza ( $H$ ) pode ser definida como a capacidade de um material resistir à deformação plástica por penetração. O ensaio de dureza consiste na aplicação de uma carga, num indentador, que atua na superfície plana da amostra. A dureza determina-se como a razão entre o valor da carga máxima aplicada durante o ensaio ( $P_{max}$ ) e a área de contacto entre o indentador e a amostra no início da descarga, projetada na superfície da amostra ( $A_c$ ) (equação A2.4.1).

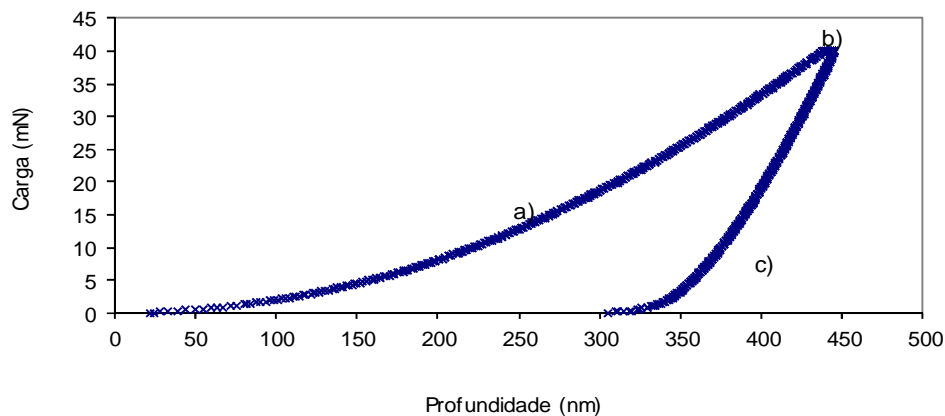
$$H = \frac{P_{max}}{A_c} \quad (A2.4.1)$$

Num ensaio de dureza, a determinação da área de contacto na carga máxima é dependente da correta avaliação da profundidade de contacto  $h_c$ , que pode ser estabelecida diretamente a partir da curva de carga-descarga, através da equação de Oliver e Pharr (equação A2.4.2).

$$h_c = h_{max} - h_s = h_{max} - \epsilon CP_{Max}. \quad (A2.4.2)$$

onde  $C$  é a complacência total do sistema, isto é, o inverso da derivada da curva de indentação no início da descarga,  $\epsilon$  um fator de correção geométrico do indentador e  $h_{max}$  a profundidade de indentação à carga máxima. O ensaio de dureza tem, normalmente, três fases distintas: a aplicação da carga, a manutenção à carga máxima ou fluência e a

descarga, de onde resulta uma curva da carga em função da profundidade de indentação (fig. A2.4.1).

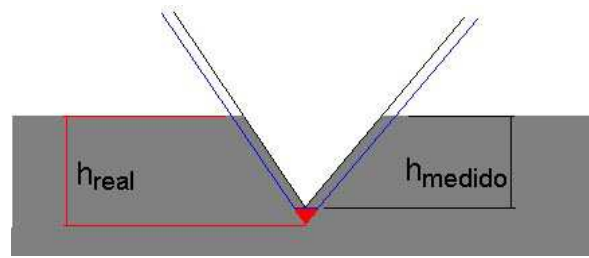


**Figura A2.4.1** - Gráfico típico de um ensaio de dureza. a) fase de carga; b) fase de fluência; c) fase de descarga.

Os indentadores mais utilizados nestes ensaios são os indentadores piramidais em diamante, Vickers e Berkovich. O indentador Vickers consiste numa pirâmide de base quadrangular possuindo um ângulo entre o eixo da pirâmide e as suas faces de  $68^\circ$ . O indentador Berkovich consiste numa pirâmide de base triangular em que aquele ângulo é de  $65,27^\circ$ . No caso de indentadores Vickers e Berkovich, sem defeitos, existe uma relação entre a altura de pirâmide ( $h$ ) e a respetiva área de secção transversal ( $A$ ), dada pela equação A2.4.3.

$$(A2.4.3) \quad A=24,5h^2$$

Contudo, esta relação só poderá ser transposta para a área e profundidade de contacto no caso de cargas suficientemente elevadas, onde o defeito da ponta do indentador é pouco relevante. Quanto menor a carga utilizada, maior é a influência da ponta do indentador, e é necessário recorrer a uma função de área para efetuar a correção. O defeito do indentador consiste num arredondamento da ponta, que faz com que ocorra uma diferença entre a profundidade real, e a profundidade medida (Fig. A2.4.2). É possível corrigir este defeito através de uma função de área, recorrendo a diferentes propostas feitas por diversos autores.



**Figura A2.4.2** - Diferença entre a profundidade de indentação corrigida e a real.

Um ensaio de dureza também permite calcular o módulo de elasticidade ( $E$ ) através do respetivo módulo de elasticidade reduzido ( $E_r$ ) dado pela equação A2.4.4

$$E_r = \frac{1}{2h_c} \times \frac{1}{\beta} \times \sqrt{\frac{\pi}{24.5}} \times \frac{1}{C - C_0} \quad (\text{A2.4.4})$$

onde  $C_0$  é o valor de complacência associada à estrutura da máquina de dureza e ao dispositivo de montagem da amostra e  $\beta$  um fator de correção geométrico (no caso do indentador Berkovich, o valor geralmente utilizado é  $\beta = 1.034$ ).

O módulo de elasticidade reduzido é, geralmente, dependente dos módulos de elasticidade do material ensaiado e do indentador e pode ser obtido através da equação da equação A2.4.5

$$\frac{1}{E_r} = \frac{1 - \nu^2}{E} + \frac{1 - \nu_i^2}{E_i} \quad (\text{A2.4.5})$$

onde  $E_r$ , representa o módulo de elasticidade reduzido,  $\nu$  o coeficiente de Poisson da amostra,  $E_i$  e  $\nu_i$  designam, respetivamente, o módulo de elasticidade e o coeficiente de Poisson do indentador.

Assim, o módulo de elasticidade é determinado através da equação A2.4.6:

$$E = \frac{(1 - \nu^2)}{2 \times h_c \times \beta \times (C - C_0) \times \sqrt{\frac{24.5}{\pi} - \frac{(1 - \nu_i^2)}{E_i}}} \quad (\text{A2.4.6})$$

### Bibliografia

Antunes, J. M.; *et al*; (2002) “Ultra-microhardness testing procedure with Vickers indenter”; Surface and Coatings Technology 149 27-35.



Fernandes, J. V.; Trindade, A. C.; Menezes, L. F.; Cavaleiro, A.; (2000) “A model for coated surface hardness”; Surface and Coatings Technology 131 457-461.

Gong, J.; Miao, H.; Peng, Z.; (2004) “On the contact area for nanoindentation tests with Berkovich indenter: case study on soda-lime glass”; Materials Letters 58 1349– 1353.

Trindade, A. C.; Cavaleiro, A.; (1994) “Estimation of Young modulus and of hardness by ultra-low hardness test with a Vickers indenter”; Journal of Testing and Evaluation 22(4) 365-369.

## **A2.5 – Microscopia de força atómica**

A microscopia de força atómica (AFM – do inglês “Atomic Force Microscopy”) opera através do varrimento de uma superfície com uma ponta integrada num braço em balanço, enquanto avalia, através de um detetor fotodíodo, a variação do feixe laser focado na superfície do braço em balanço. O varrimento da superfície pode ser efetuado em contacto direto com ela (modo de contacto), a algumas décimas de nanómetro de distância (modo de não contacto) ou em contacto intermitente (*tapping*). A força estabelecida entre os átomos da superfície do material e os da ponta obriga à deflexão desta. A magnitude da deflexão depende do tipo de força entre os átomos da superfície e os da ponta (forças de Van der Waals, forças de exclusão de Pauli, etc.). No entanto, estas forças não dependem das propriedades elétricas da amostra, sendo possível analisar as superfícies de materiais não condutores.

O deslocamento da ponta pela superfície da amostra produz a deflexão do braço em balanço, permitindo calcular a respetiva força de deflexão, que é também a força de interação entre a ponta e a superfície. Numa análise topográfica, o valor da força de deflexão é pré-selecionado. A deflexão no braço em balanço é detetada por um fotodetector que envia a informação ao sistema piezoelétrico que, por sua vez, a converte em diferentes valores de voltagem proporcionais à deflexão. Este sinal é utilizado para produzir uma imagem da topografia da superfície em análise, com resoluções que podem chegar à escala atómica.

A partir dos dados recolhidos por AFM pode-se caracterizar a superfície em termos de parâmetros de rugosidade, tais como a rugosidade média,  $S_a$ , e valor quadrático

médio da altura da superfície em relação ao valor médio,  $S_{ms}$ , entre outros. A rugosidade média,  $S_a$ , é determinada a partir da média aritmética do desvio da altura da superfície em relação a uma linha média do perfil (eq. A2.5.1). A rugosidade quadrática média,  $S_{ms}$ , é a raiz quadrada do desvio à linha média (eq. A2.5.2) sendo esta definida de modo a que as áreas do perfil traçadas acima e abaixo dela sejam idênticas.

$$S_a = \frac{1}{L} \int_0^L |z| dx \quad (A2.5.1)$$

$$S_{ms} = \sqrt{\left[ \frac{1}{L} \cdot \int_0^L (z(x))^2 \right]} \quad (A2.5.2)$$

onde,  $z$  é a altura da superfície acima da linha média;  $x$  é a origem da linha média e  $L$  o comprimento total do perfil analisado.

#### Bibliografia

Vansteenkiste, S.O., Davies, M.C., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B. e Williams, P.M. (1998). *Scanning probe microscopy of biomedical interfaces*, Progress in Surface Science, 57(2), 95-136.

B. Cappella, G. Dietler (1999). *Force-distance curves by atomic force microscopy*, Surface Science Reports 34, 1-104.

## A2.6 – Ângulos de contato

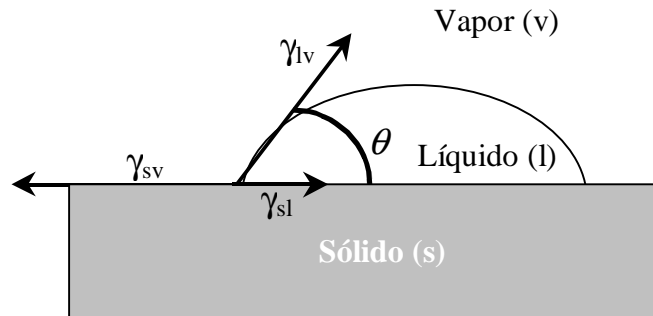
Quando uma gota de líquido é colocada sobre uma superfície sólida atinge-se um estado de equilíbrio definido pela equação de Young:

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta \quad (A2.6.1)$$

onde  $\gamma_{SV}$ ,  $\gamma_{SL}$  e  $\gamma_{LV}$  são, respetivamente, as tensões de superfície das interfaces sólido-vapor, sólido-líquido e líquido-vapor e  $\theta$  o ângulo de contacto. Este ângulo é formado pela tangente no ponto onde a interface líquido-vapor encontra a interface sólido-vapor e o plano da superfície sólida (Fig. A2.6.1).

Se  $\theta > 0^\circ$  o líquido não se espalha pela superfície, que oferece uma resistência a ser molhada tanto maior quanto maior o ângulo formado na interface. Quando  $\theta = 0^\circ$ , o líquido molha completamente o sólido espalhando-se livremente a uma velocidade que depende da viscosidade do líquido e da rugosidade da superfície. No entanto pode afirmar-

se que, genericamente, todos os líquidos molham, em alguma extensão, as superfícies sobre as quais são colocados, ou seja  $\theta \neq 180^\circ$ , existindo assim sempre alguma adesão entre o líquido e o sólido.



**Figura A2.6.1** – Ângulo de contacto entre uma gota de líquido e uma superfície sólida.

### Bibliografia

Vogler E.A. (1998) *Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces*, Advances in Colloid and Interface Science, 74, 69-117.

## A2.7 – Potencial zeta

O potencial zeta ( $\zeta$ ) de uma superfície é uma medida da magnitude das cargas superficiais quando um sólido se encontra em contacto com um líquido. A presença de cargas induz uma dupla camada eletroquímica: a camada imóvel e a camada móvel. Na primeira, também conhecida por “camada de Stern”, é considerado que as cargas estão fixas na interface sólido/líquido, contrariamente à segunda, onde estão móveis ou difusas. O potencial na interface entre estas duas camadas é a medida do potencial-zeta.

Há várias técnicas para avaliar o potencial zeta, sendo o utilizado neste trabalho a medição do potencial criado pela passagem de um eletrólito, a uma determinada pressão, na célula de medição. Este potencial pode ser calculado tanto pela medida direta do potencial de fluxo (“*Streaming Potential*”) como pela da corrente de fluxo (“*Streaming Current*”) induzida pela passagem do eletrólito. A relação entre o valor da corrente, usado neste trabalho, e o potencial zeta é dada pela equação de Helmholtz-Smoluchowski (A2.7.1).

$$\zeta = \frac{dl}{dp} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \frac{L}{A} \quad (\text{A2.7.1})$$

onde  $dl/dp$  é o declive da curva dos valores da corrente em função da pressão;  $\eta$  representa a viscosidade do eletrólito;  $\varepsilon$  é a constante dielétrica do eletrólito;  $\varepsilon_0$  é a permitividade em vácuo;  $L$  representa o comprimento do canal de medição e  $A$  a respetiva secção transversal.

### *Bibliografia*

Myllymaa, S., Myllymaa, K., Korhonen, H., Lammi, M., Tiitu, V. (2010), “*Surface characterization and in vitro biocompatibility assessment of photosensitive polyimide films*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76, 505-511.

### **Anexo 3 – Testes celulares para pré-seleção de superfícies**

Nos testes celulares preliminares foi averiguado o crescimento e maturação de neurónios sobre as superfícies escolhidas. Para o isolamento dos neurónios foram sacrificadas fêmeas de rato (estirpe Wistar) grávidas, com 17/18 dias de gestação, por deslocação cervical, tendo-se removido os embriões e, em seguida, foram dissecados os cérebros. Os cérebros foram colocados numa caixa de Petri contendo solução de Hank (HBSS<sup>12</sup>: KCl 5,36 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44 mM, NaCl 137 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4,16 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,34 mM, glicose 5 mM, piruvato de sódio 1mM, HEPES 10mM e vermelho de fenol 0,001%) e foi depois dissecada toda a região cortical. O tecido foi colocado num volume final de 7 cm<sup>3</sup> e a esta suspensão foram adicionados 3 cm<sup>3</sup> de uma solução de tripsina (2 mg.cm<sup>-3</sup> em HBSS). durante 15 minutos, a 37°C. Após sedimentação o sobrenadante foi aspirado e o tecido foi lavado 4-5 vezes com 4-6cm<sup>3</sup> de HBSS, para terminar a ação da tripsina. Após agitação suave e repouso, de forma a permitir a sedimentação dos tecidos, o sobrenadante foi de novo aspirado e foram adicionados 5 cm<sup>3</sup> de HBSS ao sedimento. As células foram dissociadas pipetando a suspensão repetidamente com uma pipeta de vidro de 5 ml e os agregados celulares foram removidos por filtração através de um filtro com um poro de 70 µm. A contagem de células na suspensão final foi feita num hemocitómetro para determinar a densidade celular, e as células foram posteriormente diluídas, e plaqueadas, em meio de plaqueamento neuronal (MEM suplementado com 10% soro de cavalo, 0,6% glicose and 1 mM ácido pirúvico) de modo a obter uma concentração de 94,7 x 10<sup>3</sup> células.cm<sup>-3</sup> num volume final de 1 cm<sup>3</sup>/poço numa placa “*multiwell*” com 24 poços, onde em cada poço foi colocada uma das amostras revestidas, com a face para cima. Previamente, as amostras foram deixadas imersas em soro fisiológico durante 24 h, a 37°C, antes da esterilização com uma solução de etanol 75% (v/v) durante 30 minutos e condicionamento com MNB.. durante 2-3 horas. A cultura foi mantida numa incubadora humidificada na presença de 5% CO<sub>2</sub>/95% ar, a 37°C e durante o período indicado na legenda das figuras.

No final do tempo de incubação as amostras foram processadas para observação em microscopia eletrónica de varrimento de acordo com o procedimento descrito para as estirpes bacterianas.

---

<sup>12</sup> do inglês Hank's Balanced Salt Solution

## Anexo 4 – Soluções utilizadas nos testes *in vitro*

### 1. Solução piranha

Ácido sulfúrico 96-97% (v/v)	75 cm <sup>3</sup>
Péroxido de Hidrogénio a 30% (v/v)	25 cm <sup>3</sup>

### 2. Meio de cultura Luria Bertani

Triptona (caseína enzimática hidrolisada)	10 g.dm <sup>-3</sup>
Estrato de levedura	5 g.dm <sup>-3</sup>
Cloreto de sódio	5 g.dm <sup>-3</sup>
Agarose	15 g.dm <sup>-3</sup>

### 3. Solução Salina Balanceada de Hank (HBSS)

Cloreto de potássio (KCl)	5,36 mM
Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,44 mM
Cloreto de sódio (NaCl)	137,0 mM
Hidrogeno carbonato de sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	4,16 mM
Fosfato de sódio dibásico dihidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O)	0,34 mM
Glucose	5,0 mM
Piruvato de sódio (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>3</sub> Na)	1,0 mM
HEPES*	10,0 mM
Vermelho de fenol	0,001% (v/v)

\*HEPES - 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etano ácido sulfónico

### 4. Meio Neurobasal com Glutamina

22 cm<sup>3</sup> de meio Neurobasal (comercial da GIBCO).  
40,2 mg de Glutamina (27) (MM=146,15 g.mol<sup>-1</sup>)

## **5. Meio Neurobasal Suplementado**

Para um volume final de **50 cm<sup>3</sup>** de volume final adicionar:

47 cm<sup>3</sup> de meio Neurobasal (25 cm<sup>3</sup> + 22 cm<sup>3</sup>)

1 cm<sup>3</sup> de suplemento B27 (GIBCO)

2 cm<sup>3</sup> de meio Neurobasal com glutamina (conc. final 0,5 mM)

0,120 cm<sup>3</sup> de gentamicina (conc. final 50 µg.cm<sup>-3</sup>)

0,125 cm<sup>3</sup> de glutamato estéril 10 mM (conc. final 25 µM)

## **6. Solução Tampão Fosfato (PBS)**

Para um volume final de 100 cm<sup>3</sup> de volume final adicionar

80 cm<sup>3</sup> de H<sub>2</sub>O miliQ

8 g de NaCl (conc. final 137 mM)

0,2 g de KCl (conc. final 2,5 mM)

1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (conc. final 10 mM)


0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (conc. final 1,8 mM)

pH ajustado para 7,4 com HCl 0,1 M.


Adicionar H<sub>2</sub>O suficiente para perfazer 100cm<sup>3</sup>.

## Anexo 5 – Fichas ICDD

04-0783		Wavelength= 1.54184				i
Ag	d(A)	Int	h	k	l	
Silver	2.359	100	1	1	1	
	2.044	40	2	0	0	
	1.445	25	2	2	0	
Silver-3C, syn	1.231	26	3	1	1	
	1.1796	12	2	2	2	
Rad.: CuKα1 λ: 1.54056 Filter: Ni Beta d-sp:	1.0215	4	4	0	0	
Cut off: Int.: Diffract. I/Icor.: 5.20	.9375	15	3	3	1	
Ref: Swanson, Tatge, Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, I, 23 (1953)	.9137	12	4	2	0	
	.8341	13	4	2	2	
Sys.: Cubic	S.G.: Fm3m (225)					
a: 4.0862	b:	c:	A:	C:		
α:	β:	γ:	Z: 4	mp: 960.6		
Ref: Ibid.						
Dx: 10.501 Dm: 10.500 SS/FOM: F <sub>g</sub> = 65(.0153 , 9)						
εα: ηωβ: 0.181 εγ: Sign: 2V:						
Ref: Winchell, Elements of Optical Mineralogy, II, 17						
Color: Light gray metallic						
Pattern taken at 27 C. Sample obtained from Johnson Matthey Company, Ltd. CAS #: 7440-22-4. Spectrographic analysis indicated faint traces of Ca, Fe and Cu. Purity >99.999%. Opaque mineral optical data on specimen from Great Bear Lake, Canada: RR2Re=94.1, Disp.=16, VHN100=55-63, Color values .314, .321, 94.2, Ref.: IMA Commission on Ore Microscopy QDF, Cu type. Gold group, gold subgroup. PSC: cF4. Mwt: 107.87. Volume[CD]: 68.23.						

 © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

04-0836		Wavelength= 1.54184				*
Cu	d(A)	Int	h	k	l	
Copper	2.088	100	1	1	1	
	1.808	46	2	0	0	
	1.278	20	2	2	0	
Copper, syn	1.090	17	3	1	1	
	1.043	5	2	2	2	
Rad.: CuKα1 λ: 1.5405 Filter: Ni Beta d-sp:	.9038	3	4	0	0	
Cut off: Int.: Diffract. I/Icor.:	.8293	9	3	3	1	
Ref: Swanson, Tatge, Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, I, 15 (1953)	.8083	8	4	2	0	
Sys.: Cubic	S.G.: Fm $\bar{3}$ m (225)					
a: 3.6150	b:	c:	A:	C:		
α:	β:	γ:	Z: 4	mp: 1083		
Ref: Ibid.						
Dx: 8.935 Dm: 8.950 SS/FOM: F <sub>g</sub> = 89(.0112 , 8)						
Color: Red						
Pattern taken at 26 C. Sample from metallurgical laboratory of NBS, Gaithersburg, MD, USA. CAS #: 7440-50-8. It had been heated in an H <sub>2</sub> atmosphere at 300 C. Impurities from 0.001-0.01%, Ag, Al, Bi, Fe, Si, Zn. Measured density and color from Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., I 99. Cu type. Gold group, gold subgroup. PSC: cF4. See ICSD 64699 (PDF 85-1326). Opaque mineral optical data on specimen from unspecified locality, R3R%=60.65, Disp.=Std. VHN100=96-104, Mwt: 63.55. Volume[CD]: 47.24.						

 © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1



04-0784					Wavelength= 1.54184					*
Au			d(A)	Int	h	k	l			
Gold			2.355	100	1	1	1			
			2.039	52	2	0	0			
			1.442	32	2	2	0			
Gold, syn			1.230	36	3	1	1			
Rad.: CuKα1	λ: 1.54056	Filter: Ni	Beta	d-sp:						
Cut off:	Int.: Diffract.		I/Icor.:							
Ref: Swanson, Tatge, Natl. Bur. Stand. (U.S.), Circ. 539, I, 33 (1953)			.9358	23	3	3	1			
			.912	22	4	2	0			
			.8325	23	4	2	2			
Sys.: Cubic		S.G.: Fm3m (225)								
a: 4.0786	b:	c:	A:	C:						
α:	β:	γ:	Z: 4	mp: 1061.6-1063.2						
Ref: Ibid.										
Dx: 19.283	Dm: 19.300	SS/FOM: F	g = 129(.0078	, 9)						
εα:	ηαβ: 0.366	εγ:	Sign: 2V:							
Ref: Winchell, Elements of Optical Mineralogy, 17										
Color: Yellow metallic										
Pattern taken at 26 C. Sample purified at NBS, Gaithersburg, MD, USA and is about 99.997% Au. CAS #: 7440-57-5. Spectrographic analysis (%): Si 0.001, Ca 0.001, Ag 0.001(?). Opaque mineral optical data on specimen from unspecified locality: RR2Re=71.6, Disp.=16, VHN100=53-58, Color values=.384, .391, 72.7. Ref.: IMA Commission on Ore Microscopy QDF. Cu type. Gold group, gold subgroup. PSC: cF4. Mwt: 196.97. Volume[CD]: 67.65.										

ICDD © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1


44-0706					Wavelength= 1.54184					0		
CuO			d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
Copper Oxide			3.6255	19				1.0742	23			
			3.4420	18								
			2.7752	24								
			2.7047	19								
Rad.: CuKα	λ: 1.5418	Filter:	d-sp: Diff.									
Cut off:	Int.: Diffract.		I/Icor.:									
Ref: Nair, C., Mathew, S., Ninan, K., J. Therm. Anal., 37, 2325 (1991)			2.5444	87								
			2.3380	100								
			2.1396	21								
			2.0474	20								
			1.9649	21								
			1.8722	42								
			1.7814	19								
Sys.:		S.G.:	1.7168	26								
a:	b:	c:	A:	C:								
α:	β:	γ:	Z:	mp:								
Ref:			1.5877	31								
			1.5592	21								
			1.5102	36								
			1.4164	32								
			1.3801	35								
			1.3077	26								
Dx:	Dm:	SS/FOM: F	=									
			1.2661	28								
			1.1968	23								
			1.1693	25								
			1.1586	24								
O assigned because unindexed. Prepared by heating copper tris(ethylenediamine) sulfate to 800 C. A mixture of monoclinic Cu O, see 48-1548. Mwt: 79.55.			1.1248	22								
			1.0922	25								

ICDD © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

Anexos e Apêndices


74-1230		Wavelength= 1.54184					C
Cu2O		d(A)	Int	h	k	l	
Copper Oxide		3.006	54	1	1	0	
		2.4548	999*	1	1	1	
		2.1260	347	2	0	0	
Cuprite, syn		1.7358	11	2	1	1	
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter: d-sp: Calculated		1.5033	266	2	2	0	
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/lor.: 8.28		1.4173	1	2	2	1	
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12+, (1997)		1.3446	3	3	1	0	
Ref: Neuburger, M.C., Z. Phys., 67, 845 (1930)		1.2820	198	3	1	1	
		1.2274	43	2	2	2	
		1.1363	2	3	2	1	
Sys.: Cubic S.G.: Pn $\bar{3}$ m (224)							
a: 4.252(2)	b:	c:	A:	C:			
α:	β:	γ:	Z: 2	mp:			
Ref: Ibid.							
Dx: 6.182		Dm: 5.920		ICSD #: 026963			

Peak height intensity. Ag2 O type. PSC: cP6. See PDF 5-667.  
 No R value given. At least one TF missing. Calc. density unusual  
 but tolerable. Mwt: 143.09. Volume[CD]: 76.87.

 © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
 PCPDFWIN v. 2.1

78-1588		Wavelength= 1.54184					C
Cu8O		d(A)	Int	h	k	l	
Copper Oxide		6.02	8	0	1	0	
		4.7201	8	1	0	1	
		4.6700	4	0	0	2	
		3.7144	8	1	1	1	
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter: d-sp: Calculated		3.6899	5	0	1	2	
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/lor.: 4.97		3.0100	1	0	2	0	
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12+, (1997)		2.735	1	2	0	0	
Ref: Guan, R., Hashimoto, H., Kuo, K.H., Acta Crystallogr., Sec. B: Structural Science, 40, 560 (1984)		2.7057	1	1	0	3	
		2.5300	999*	0	2	2	
		2.4679	4	1	1	3	
Sys.: Orthorhombic S.G.: Bmm2 (38)		2.3600	796	2	0	2	
a: 5.47	b: 6.02	c: 9.34	A: 0.9086	C: 1.5515			
α:	β:	γ:	Z: 2	mp:			
Ref: Ibid.							
Dx: 5.662		Dm:		ICSD #: 062764			
		2.3350	362	0	0	4	
		2.1972	1	2	1	2	
		2.1769	1	0	1	4	
		2.0241	422	2	2	0	
		1.8572	1	2	2	2	
		1.8467	1	1	3	1	
		1.8467	0	2	4		
		1.7895	1	3	0	1	
		1.7758	1	2	0	4	
		1.7677	1	1	0	5	
		1.7153	1	3	1	1	
		1.7032	1	2	1	4	
		1.6961	1	1	1	5	
		1.6179	1	2	3	0	
		1.6117	1	1	3	3	
		1.5733	1	3	0	3	
		1.5566	1	0	0	6	
		1.5294	296	2	2	4	
		1.5294	2	3	2		
		1.5243	157	1	2	5	
		1.5050	69	0	4	0	
		1.4338	1	1	4	1	
		1.3943	1	3	2	3	
		1.3827	86	0	2	6	
		1.3675	43	4	0	0	
		1.3528	77	2	0	6	
		1.3355	1	3	3	1	
		1.3335	1	4	1	0	
		1.3298	1	2	3	4	
		1.3264	1	1	3	5	
		1.3199	1	2	1	6	
		1.3152	1	1	4	3	
		1.3123	1	4	0	2	
		1.3048	1	3	0	5	
		1.2962	1	1	0	7	
		1.2822	1	4	1	2	
		1.2689	114	2	4	2	
		1.2650	85	0	4	4	
		1.2450	1	4	2	0	

d(A)	Int	h	k	l
1.2381	1	3	3	3
1.2339	1	2	2	6
1.2299	1	0	3	6
1.2030	87	4	2	2
1.1905	1	1	2	7
1.1800	37	4	0	4
1.1675	20	0	0	8
1.1675	1	5	1	
1.1579	1	4	1	4
1.1518	1	3	4	1
1.1481	1	2	4	4
1.1459	1	0	1	8
1.1459	1	4	5	
1.1300	1	4	3	0
1.1217	1	2	3	6
1.1019	1	2	5	0
1.1000	1	1	5	3
1.0986	1	4	2	4
1.0986	4	3	2	
1.0938	1	3	3	5

 © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
 PCPDFWIN v. 2.1

71-0579		Wavelength= 1.54184						C			
Au2O3		d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
Gold Oxide		4.0671	22	2	2	0	1.5337	123	8	2	0
		3.4710	999*	1	1	1	1.5068	172	2	4	2
		3.2067	140	4	0	0	1.4978	104	5	5	1
		2.7563	370	3	1	1	1.4956	81	7	3	1
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter: d-sp: Calculated		2.7380	850	4	2	0	1.4280	4	6	0	2
Cut off: 17.7 Int.: Calculated I/ICor.: 8.57		2.6300	323	0	4	0	1.3956	8	4	4	2
Ref: Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)		2.5376	502	1	3	1	1.3911	63	1	7	1
Ref: Jones, P.G et al., Acta Crystallogr., Sec. B, 35, 1435 (1979)		2.4333	4	2	4	0	1.3781	168	6	2	2
S.G.: Orthorhombic S.G.: Fdd2 (43)		2.2145	340	3	3	1	1.3690	41	8	4	0
a: 12.827(3)	b: 10.52(3)	c: 3.838(1)	A: 1.2193	C: 0.3648			2.0902	246	5	1	1
α:	β:	γ:	Z: 8	mp:			2.0335	62	4	4	0
Ref: Ibid.		1.9805	6	6	2	0	1.3254	53	9	1	1
Dx: 11.336	Dm: 11.330	ICSD #: 008014					1.8384	174	2	0	2
Peak height intensity. R-factor: 0.058. Au2 O3 type. C.D.		1.8261	77	1	5	1	1.3150	33	0	8	0
Cell: a=10.520, b=12.827, c=3.838, a/b=0.8201, c/b=0.2992.		1.8222	123	5	3	1	1.3001	44	7	5	1
S.G.=Fdd2(43). PSC: oF40. Mwt: 441.93. Volume[CD]: 517.90.		1.8027	8	0	2	2	1.2944	7	0	6	2
		1.7355	123	2	2	2	1.2882	4	2	8	0
		1.6939	135	3	5	1	1.2638	27	1	1	3
		1.6912	78	2	6	0	1.2549	3	6	4	2
		1.6589	8	6	4	0	1.2485	30	9	3	1
		1.6335	96	7	1	1	1.2461	16	10	2	0
		1.6033	40	8	0	0	1.2285	12	5	7	1
		1.5714	1	4	2	2	1.2174	32	3	1	3
		1.5384	114	4	6	0	1.2174	4	8	0	0

d(A)	Int	h	k	l
1.2003	2	4	6	2
1.1966	25	1	3	3
1.1832	23	8	6	0
1.1570	15	3	3	3
1.1381	22	5	1	3
1.1278	13	9	5	1
1.1200	6	6	8	0
1.1139	9	8	4	2
1.1139	1	9	1	
1.1121	12	7	7	1
1.1095	25	11	1	1
1.1072	65	6	6	2

ICDD © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

35-1357		Wavelength= 1.54184						*
AuCu3		d(A)	Int	h	k	l		
Copper Gold		3.751	17	1	0	0		
		2.6513	11	1	1	0		
		2.1652	100	1	1	1		
Auricupride, syn		1.8747	41	2	0	0		
Rad.: CuKα1 λ: 1.54060 Filter: Ni Beta d-sp: Diff.		1.6767	6	2	1	0		
Cut off: Int.: Diffract. I/ICor.:		1.5307	4	2	1	1		
Ref: Cannon, J., Humphreys, Brigham Young Univ., Provo, UT, USA, ICDD Grant-in-Aid, (1983)		1.3257	21	2	2	0		
		1.2498	3	3	0	0		
		1.1857	2	3	1	0		
		1.1306	22	3	1	1		
S.G.: Cubic S.G.: Pm3m (221)		1.0824	7	2	2	2		
a: 3.7493(1)	b:	1.0397	1	3	2	0		
c:	A:	1.0020	3	3	2	1		
α:	β:	.9374	3	4	0	0		
	γ:	.9093	2	4	1	0		
	Z: 1	.8636	2	3	3	0		
	mp:	.8602	13	3	3	1		
Ref: Ibid.		.8384	12	4	2	0		
Dx: 12.212	Dm:	.8182	3	4	2	1		
							SS/FOM: F <sub>19</sub> = 107(.0094, 19)	

Sample was prepared by arc-melting the pure elements in a Zr-gettered Ar atmosphere. There was a 0.04% weight loss during arc-melting. Powder was annealed for 24 days at 350 C. σ(I obs)= ±0.01. Au Cu3 type. Gold group, awaruite subgroup. PSC: cP4. Mwt: 387.60. Volume[CD]: 52.70.

ICDD © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

# Anexos e Apêndices


38-0741		Wavelength= 1.54184															
AuCu	d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l							
Copper Gold	4.46	1	2	0	0	1.42	u	0	0	2							
	4.05	6	1	1	0	1.41	25u	6	1	0							
	3.18	48	2	1	0	1.40	u	5	2	0							
	2.83	14	0	0	1	1.39	25u	4	2	1							
Rad.: CoKa	λ: 1.7902	Filter:	d-sp: Diff.			2.49	5	3	1	0	1.35	55	2	0	2		
Cut off:	Int.: Diffract.	I/lor.:	2.39	3	2	0	1	1.35	3	3	0	2	3	0			
Ref: Dirand, M et al., C. R. Seances Acad. Sci., Ser. C, 280, 559 (1975)	2.32	14	1	1	1	1.33	u	1	1	2	19u	1	3	1			
	2.26	54u	0	2	0	1.32	u	6	0	1	1.32	u	6	0	1		
	2.23	u	4	0	0	2.19	27	1	2	0	2.12	100	2	1	1		
Sys.: Orthorhombic	S.G.: Pbam (55)	2.00	9	4	1	0	1.87	9	3	1	1	1.80	7	3	2	0	
a: 8.92	b: 4.52	c: 2.83	A: 1.9735	C: 0.6261	1.80	7	3	2	0	1.77	13u	0	2	1			
α:	β:	γ:	Z: 4	mp:	1.74	u	4	0	1	1.73	6	1	2	1			
Ref: Ibid.	1.73	6	1	2	1	1.64	2	2	2	1	1.64	4	1	1			
Dx: 15.165	Dm:	SS/FOM: F <sub>29</sub> = 6(0.154 , 34)	1.59	15	4	2	0	1.52	1	3	2	1	1.49	3	6	0	0
Pseudo-hexagonal. Phase III. Au <sub>2</sub> Cu Zn type. C.D. Cell:	1.49	1	3	0	0	1.43	25u	5	1	1	1.43	25u	5	1	1		
a=4.520, b=8.920, c=2.830, a/b=0.5067, c/b=0.3173,																	
S.G.=Pbam(55). PSC: oP8. Mwt: 260.51. Volume[CD]: 114.10.																	

ICDD © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

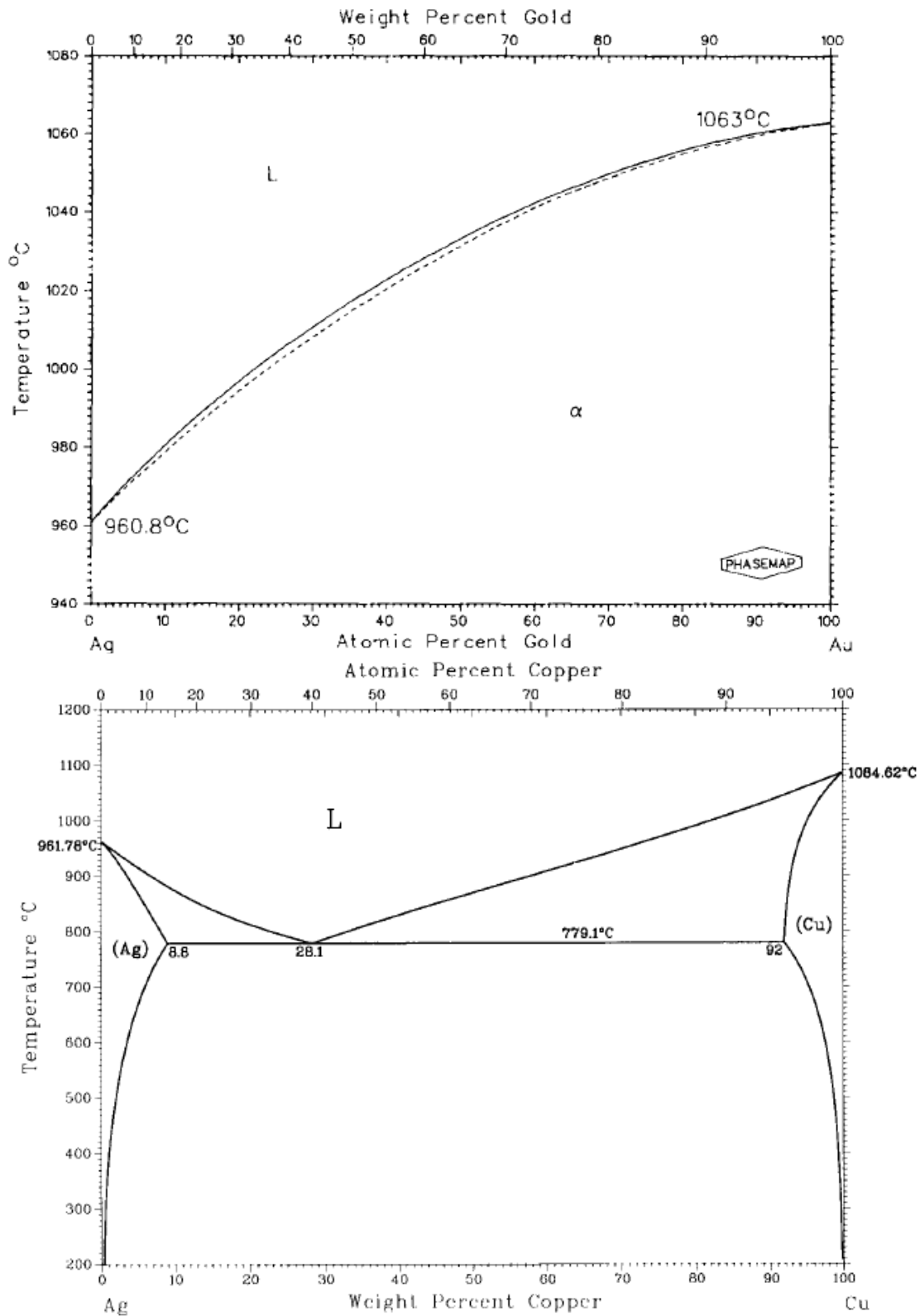
27-0156		Wavelength= 1.54184															
CuAu	d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l							
Copper Gold	3.657	80	0	1	1	1.119	100	1	10	3							
	3.529	40	0	3	1	1.112	100	3	16	1							
	3.245	60	1	7	0	1.057	60	1	29	2							
	2.946	60	1	9	0	1.055	40	1	16	3							
Rad.: FeKa	λ: 1.9373	Filter:	d-sp:			2.671	60	1	11	0	1.041	60	3	9	2		
Cut off:	Int.:	I/lor.:	2.220	100	1	10	1	1.039	40	2	1	3	1.982	80	2	0	0
Ref: Johannson, Linde, Ann. Phys. (Leipzig), 25, H1 (1936)	1.829	80	0	0	2	1.025	40	0	21	3	1.816	60	0	19	1		
	1.736	60	2	1	1	1.014	40	1	31	2	1.680	40	0	21	1		
Sys.: Orthorhombic	S.G.: Imam (74)	1.552	40	1	9	2	1.506	60	1	11	2	1.403	80	2	20	0	
a: 3.962	b: 39.74	c: 3.659	A: 0.997	C: 0.921	1.344	80	2	0	2	1.295	20	1	29	0			
α:	β:	γ:	Z: 20	mp:	1.280	60	2	21	1	1.264	40	3	9	0			
Ref: Ibid.	1.254	20	1	28	1	1.239	40	3	2	1	1.218	40	0	1	3		
Dx: 15.018	Dm:	SS/FOM: F <sub>30</sub> = 2(0.091 , 201 )	1.188	100	1	30	1	1.184	100	3	10	1	1.184	100	3	10	1
Pseudotetragonal subcell: a=b/10. Au Cu type. PSC: oI40. Mwt: 260.51. Volume[CD]: 576.11.																	

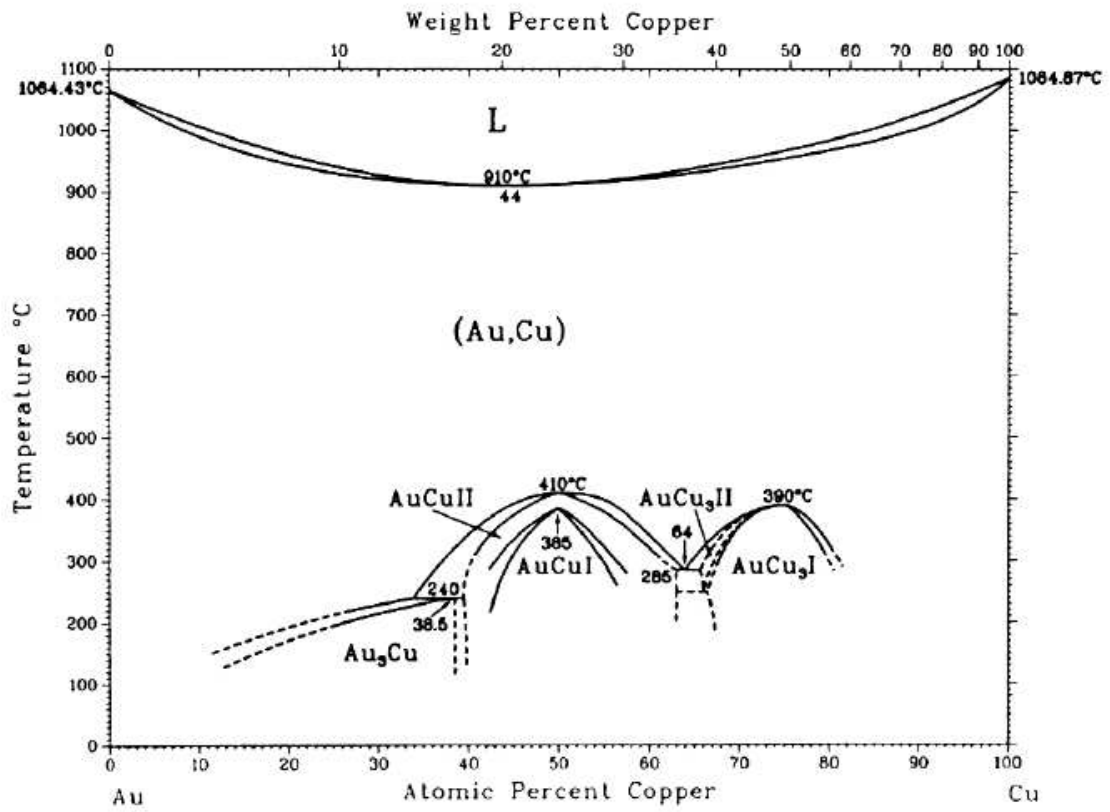
ICDD © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

27-0157		Wavelength= 1.54184							i		
Cu <sub>3</sub> Au <sub>2</sub>		d(A)	Int	h	k	l	d(A)	Int	h	k	l
Copper Gold		3.68	80	0	1	1	1.016	20	3	26	0
		2.878	60	1	10	0					
		2.631	60	1	3	1					
		2.203	100	1	11	1					
Rad.: FeKα λ: 1.9373 Filter: d-sp:		1.943	80	1	19	0					
Cut off: Int.: l/lor.: Ref: Johannson, Linde, Ann. Phys. (Leipzig), 25, H1 (1936)		1.848	60	0	20	1					
		1.781	20	0	21	1					
		1.715	60	2	1	1					
		1.664	40	1	1	2					
		1.553	40	1	10	2					
Sys.: Orthorhombic S.G.:		1.513	60	1	26	0					
a: 3.881 b: 42.69 c: 3.688 A: 0.909 C: 0.864.		1.374	60	2	22	0					
α: β: γ: Z: 8.8 mp:		1.336	80	2	20	1					
Ref: Ibid.		1.314	20	2	6	2					
		1.262	40	1	32	0					
		1.240	60	1	23	2					
		1.216	60	3	12	0					
		1.194	20	1	32	1					
Dx: 13.980 Dm: SS/FOM: F <sub>24</sub> = (0.077 , 446 )		1.167	100	1	3	3					
		1.124	80	0	38	0					
Tetragonal subcell: a=b/11. Also called: auricupride.,Mwt: 584.57. Volume[CD]: 611.03.		1.102	100	0	37	1					
		1.040	20	1	19	3					
		1.030	20	2	5	3					

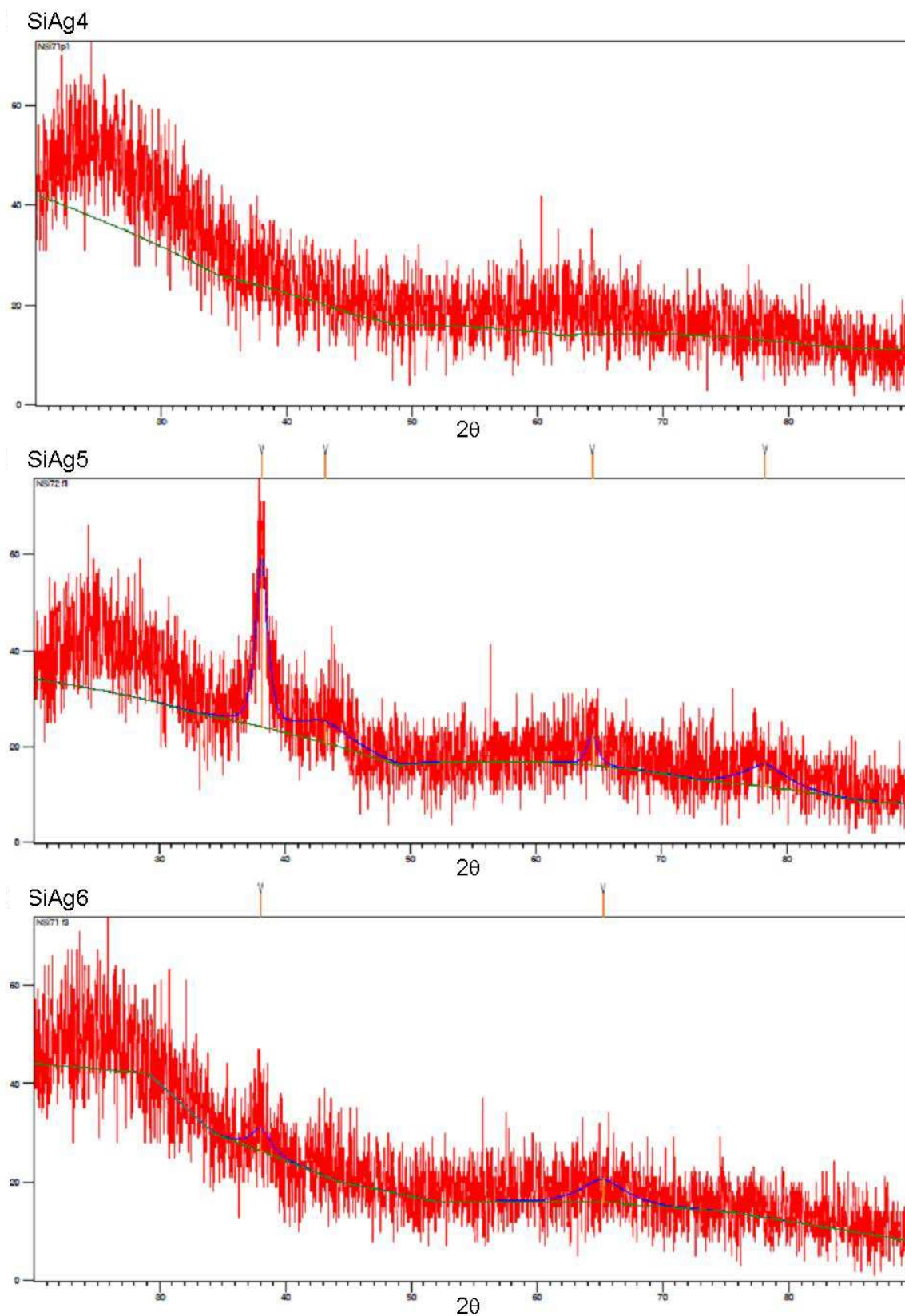
 © 2000 JCPDS-International Centre for Diffraction Data. All rights reserved  
PCPDFWIN v. 2.1

## Anexo 6 – Diagramas de Fase

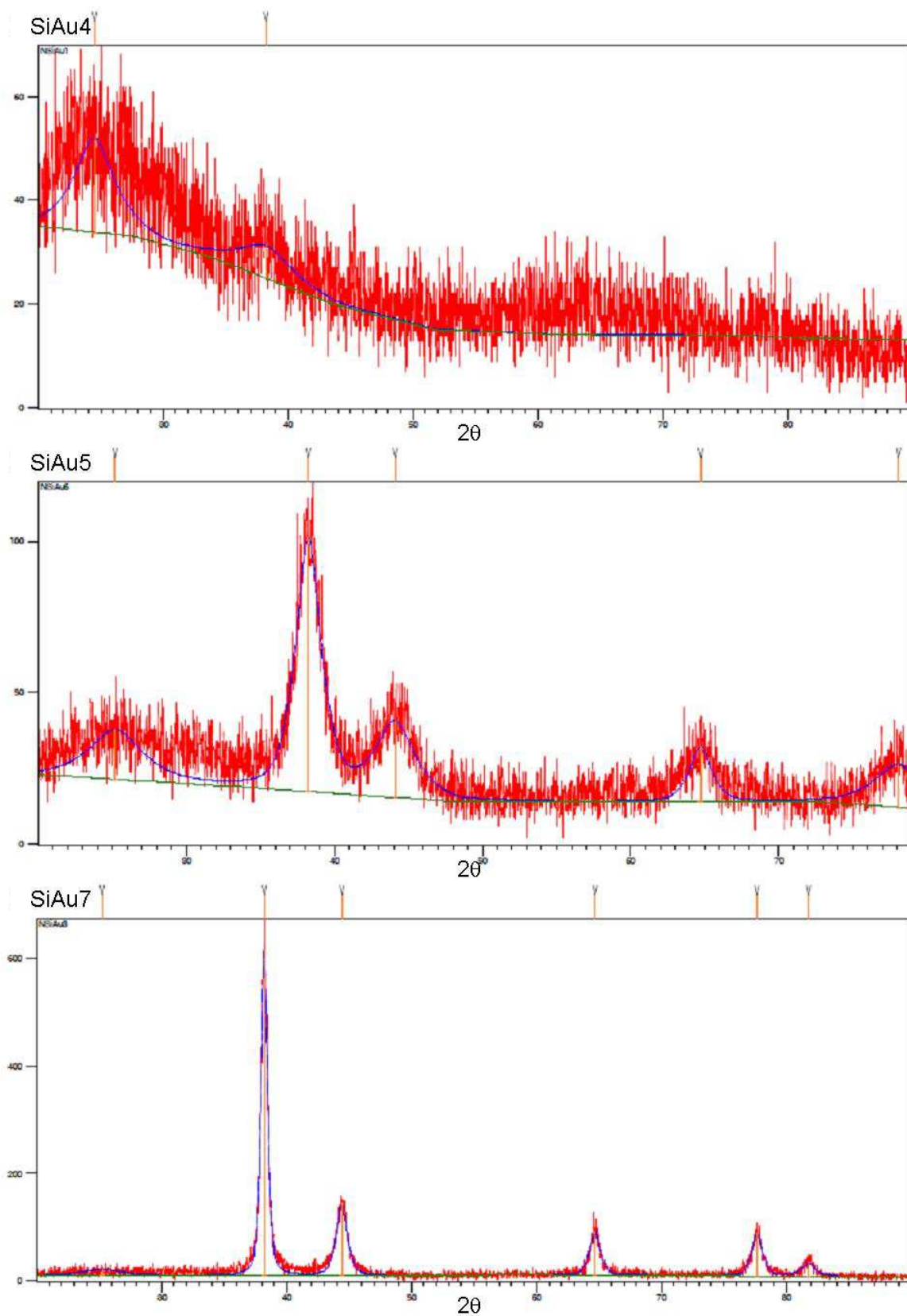


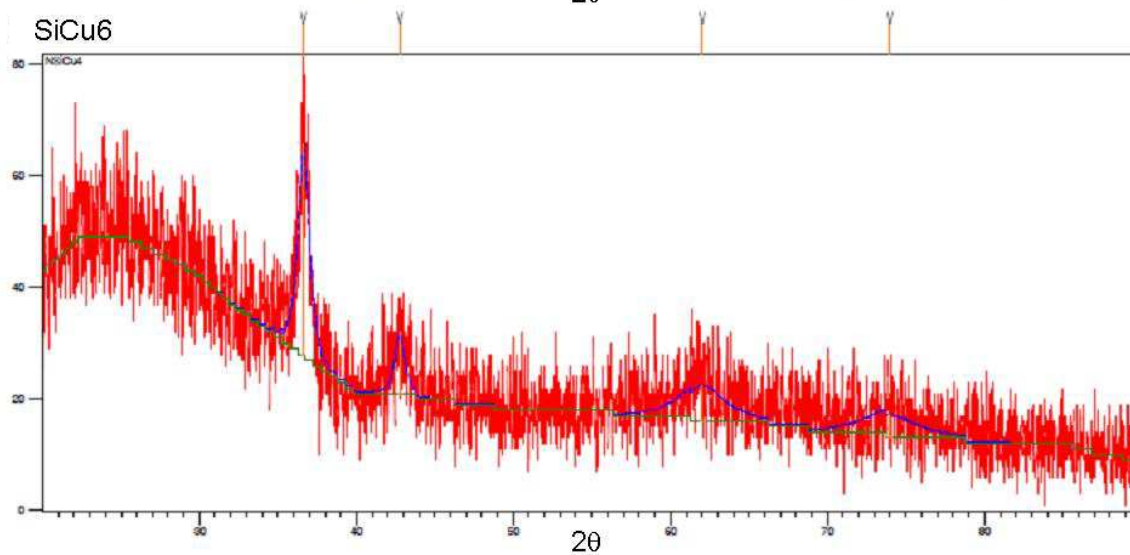
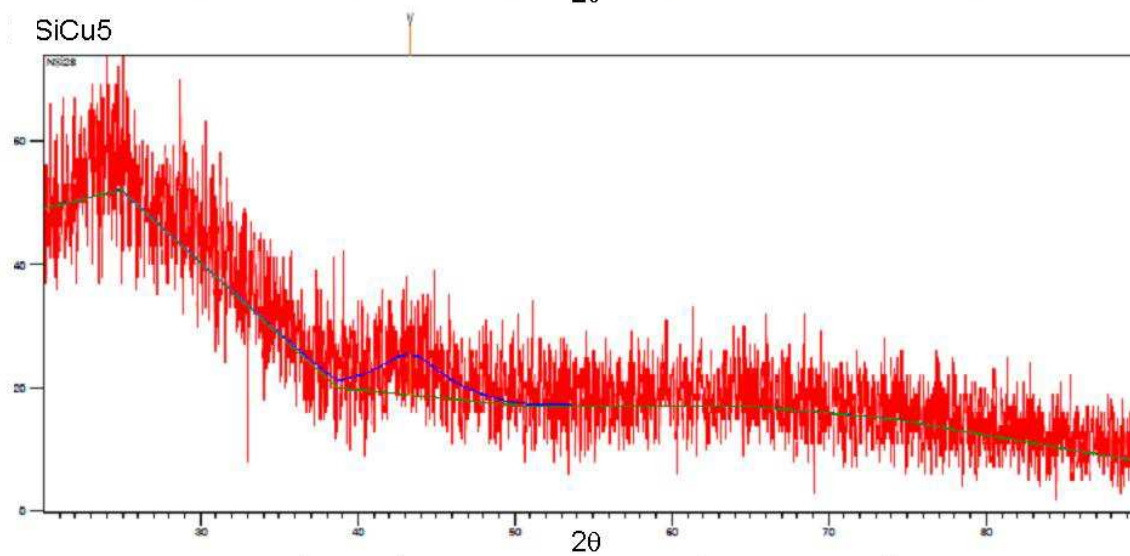
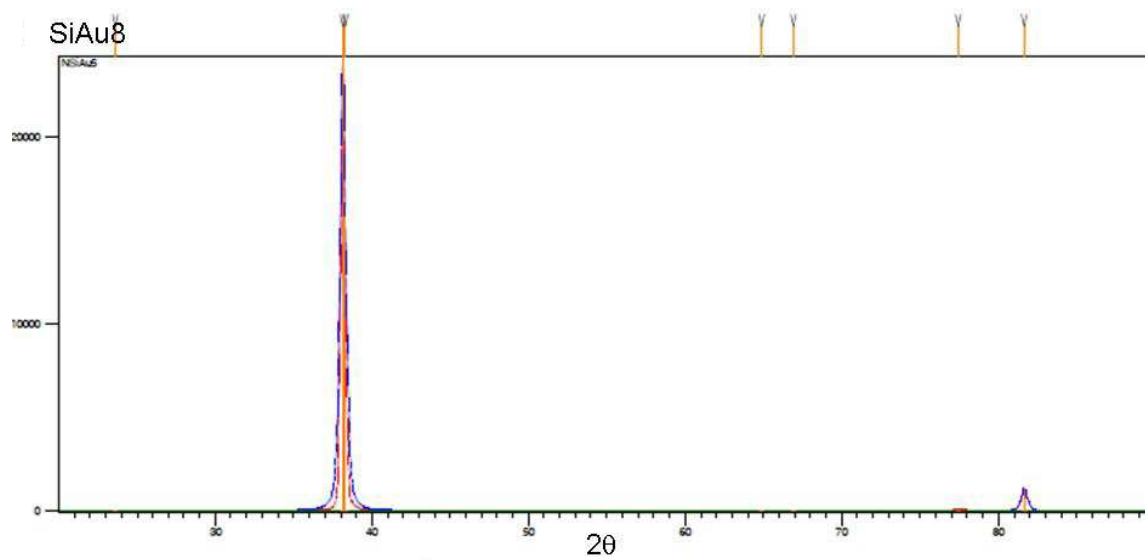


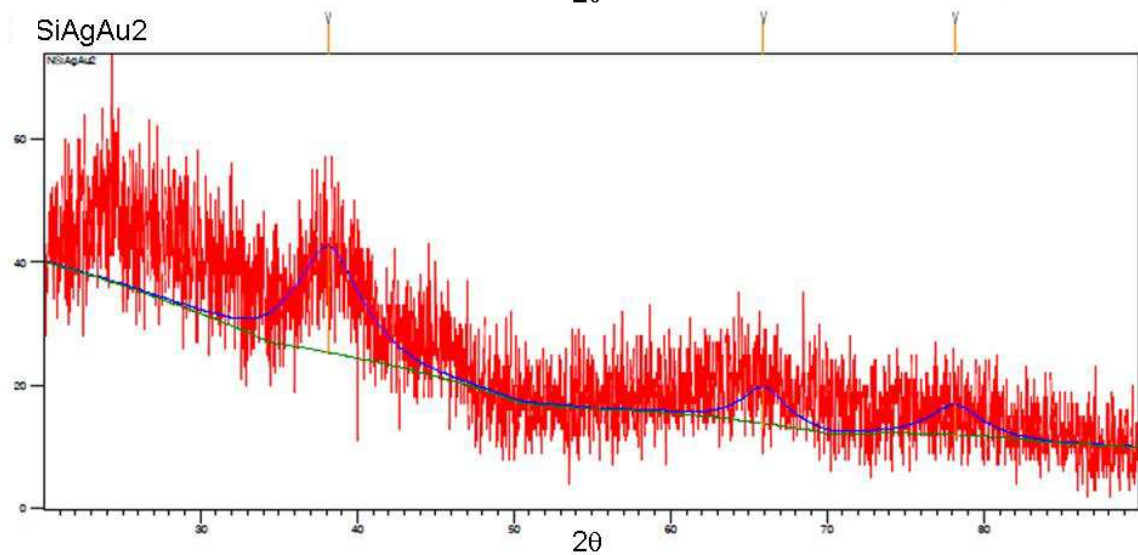
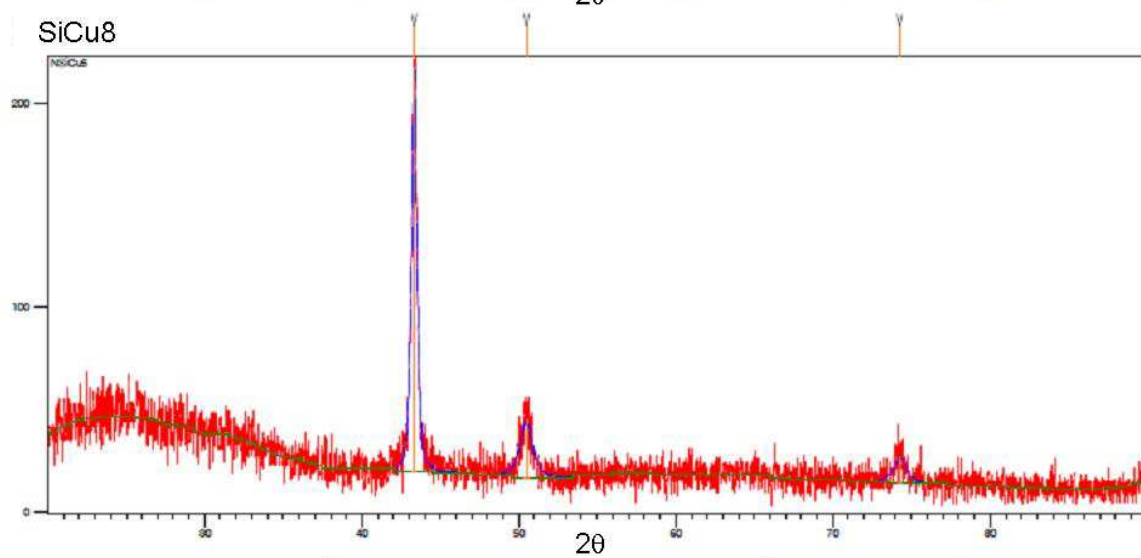
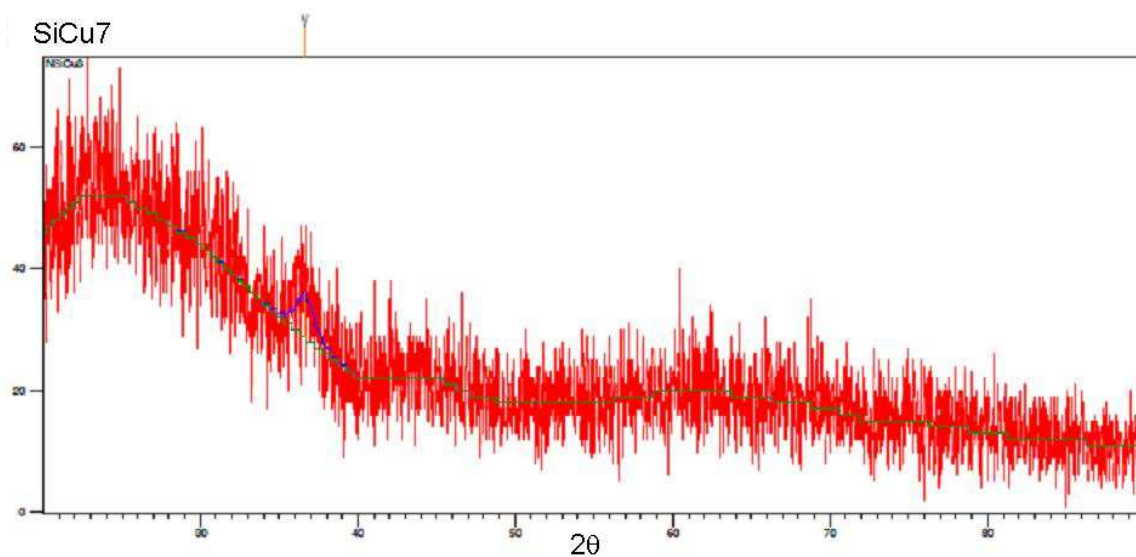
## Apêndice 1 – Desconvolução dos difratogramas

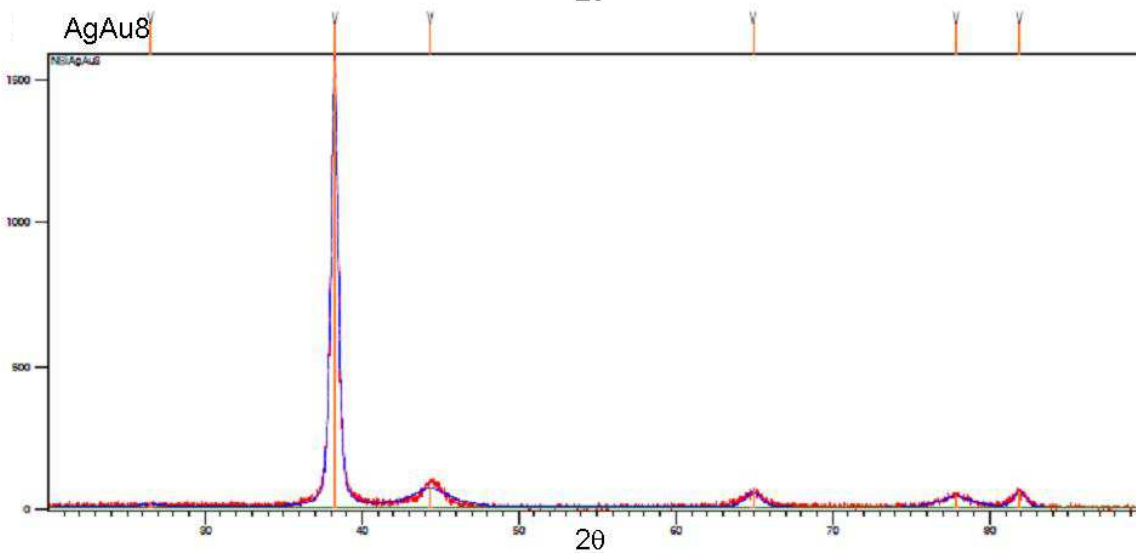
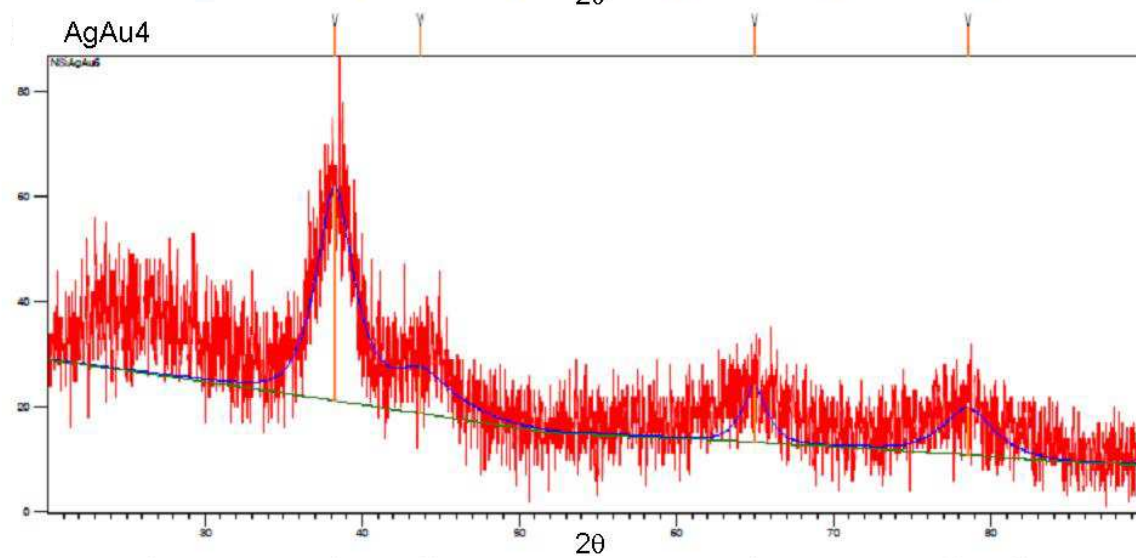
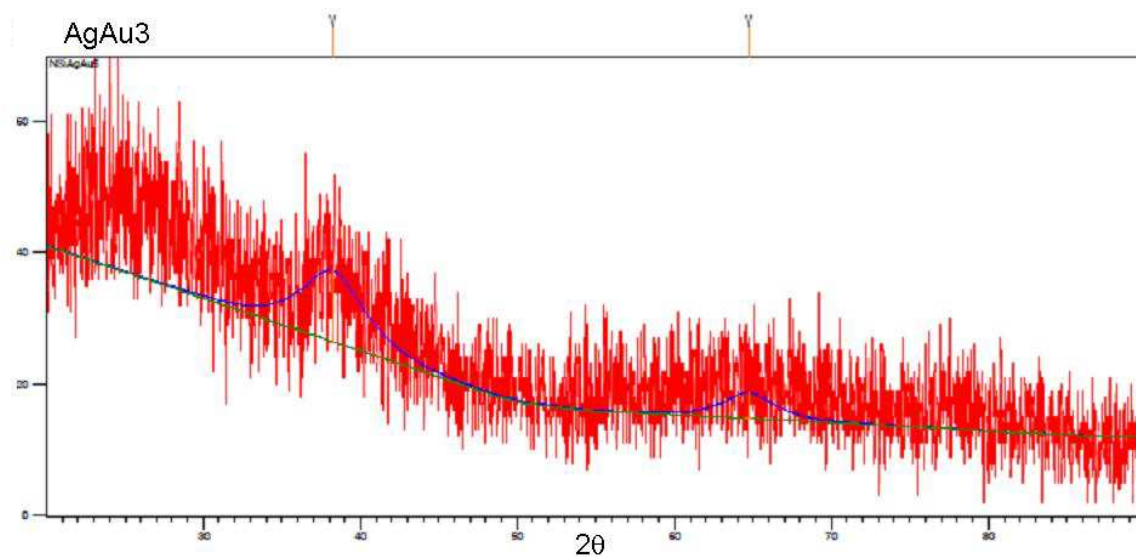




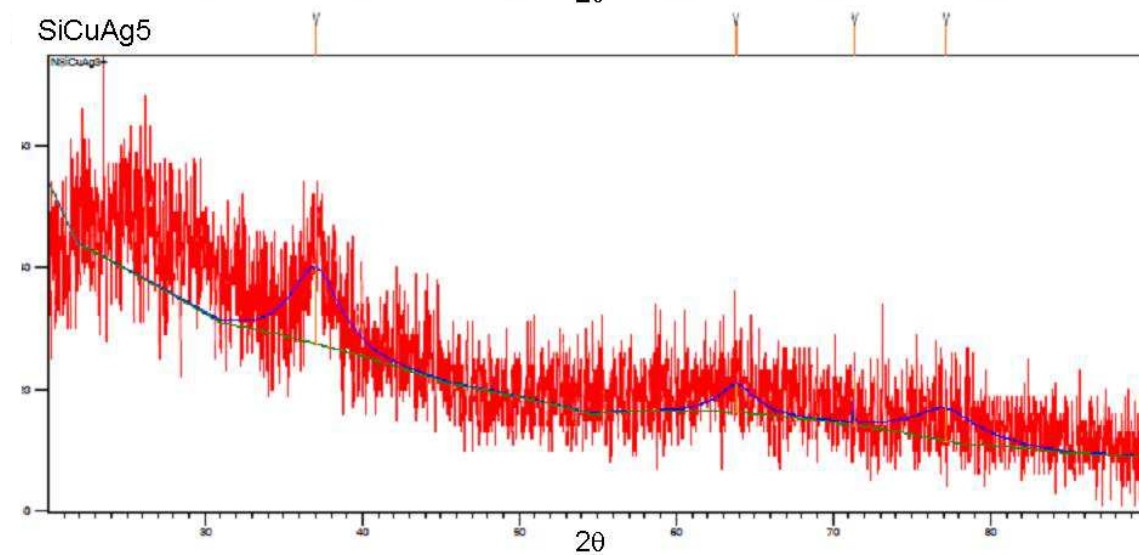
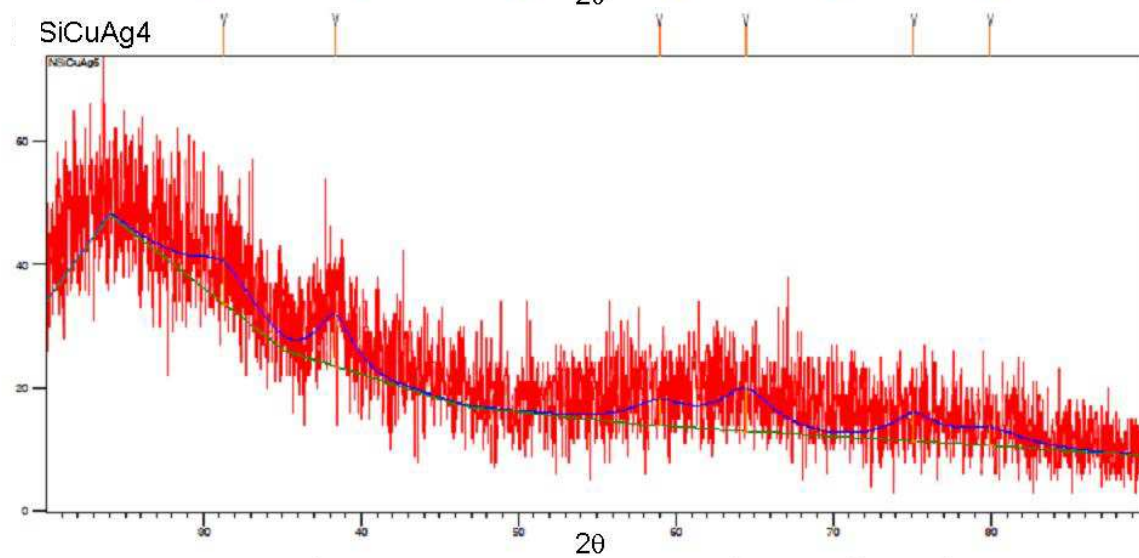
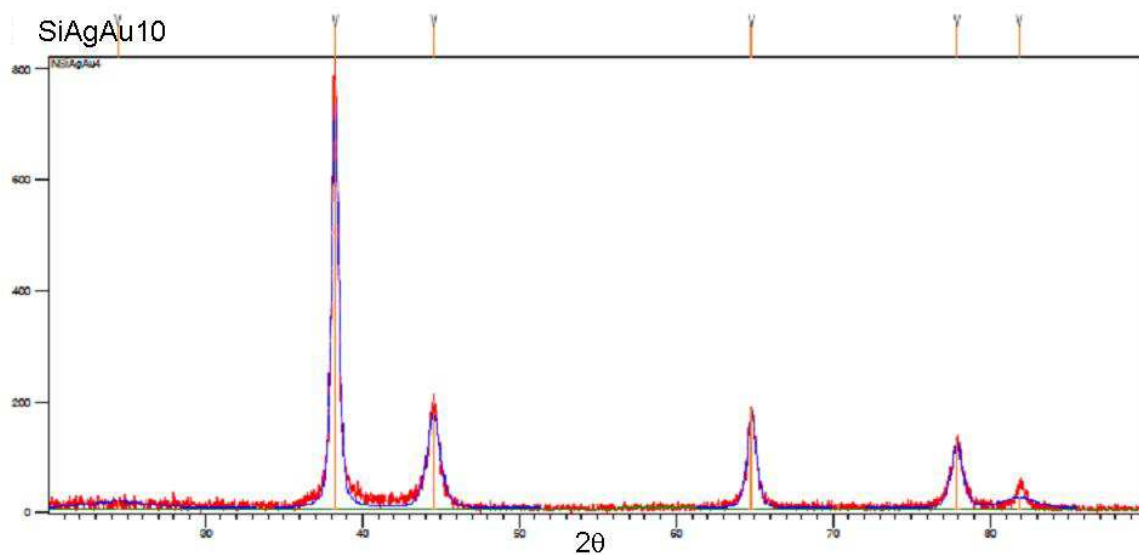


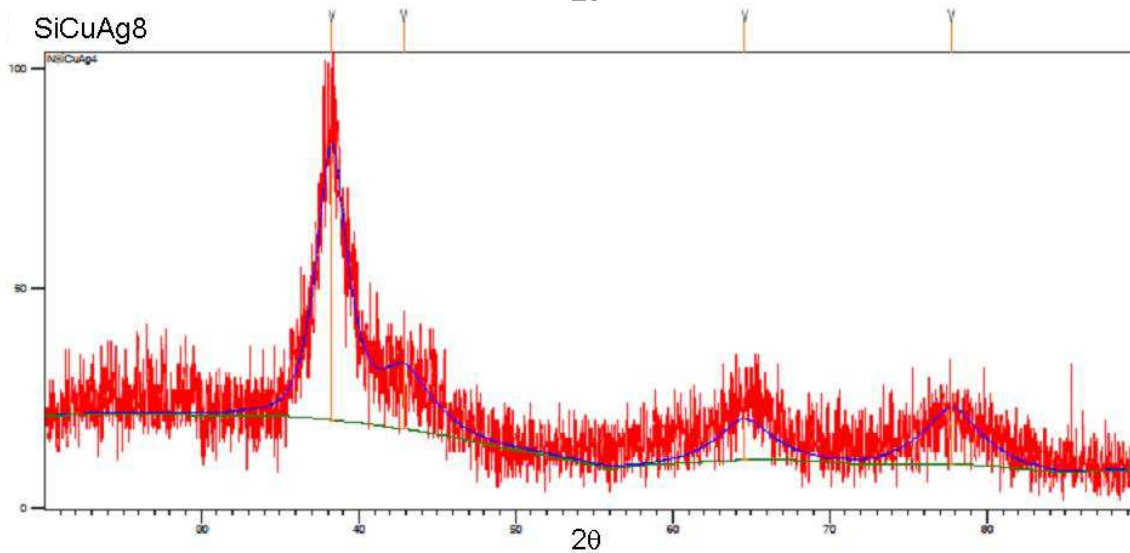
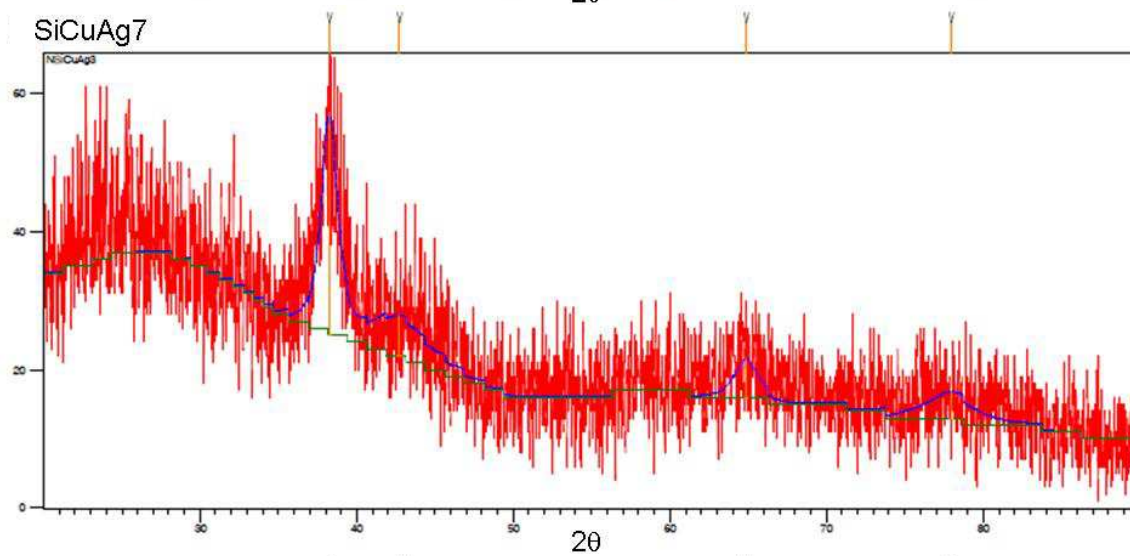
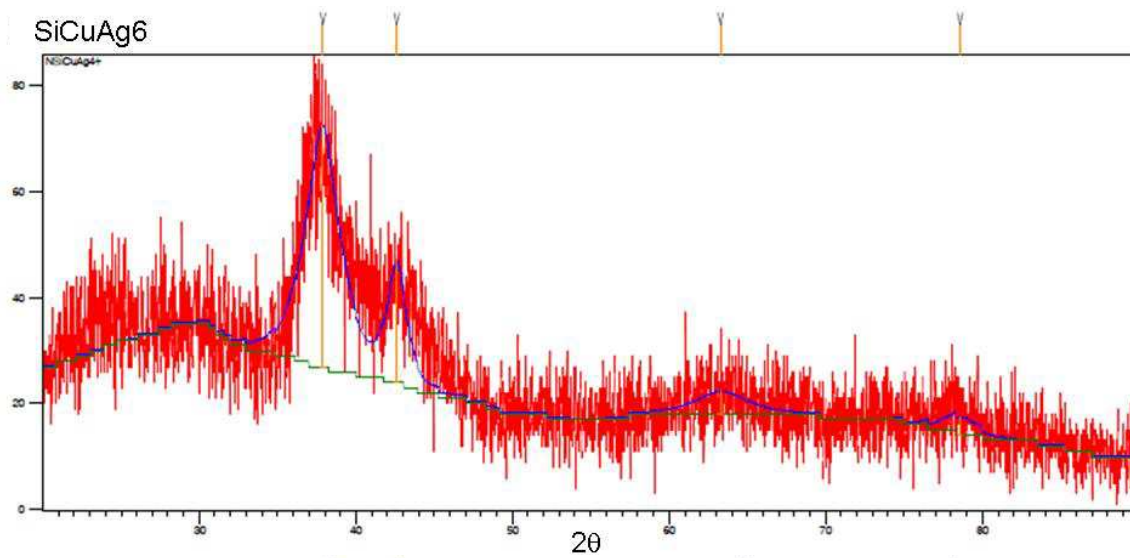


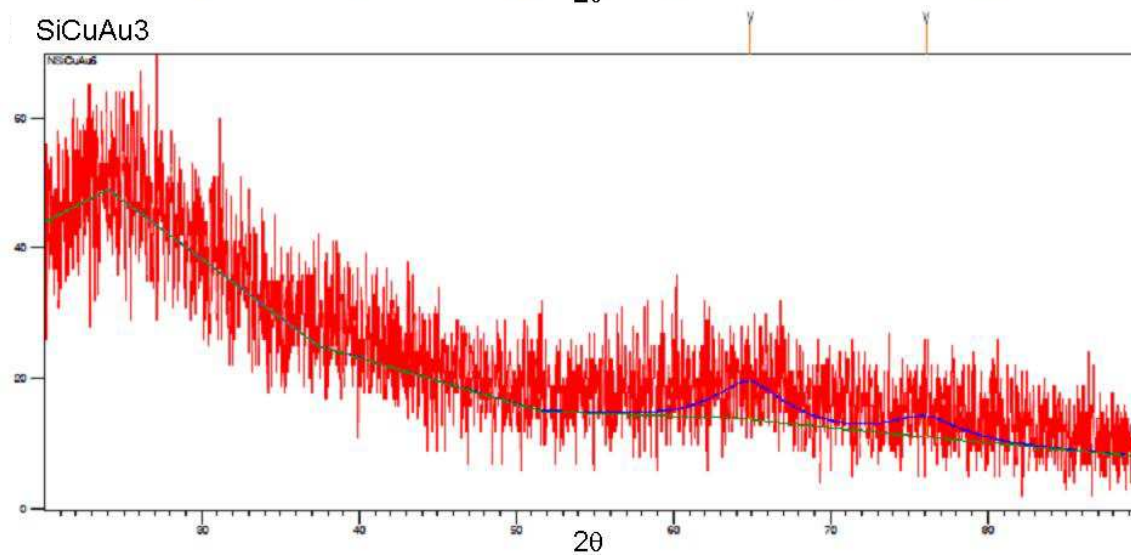
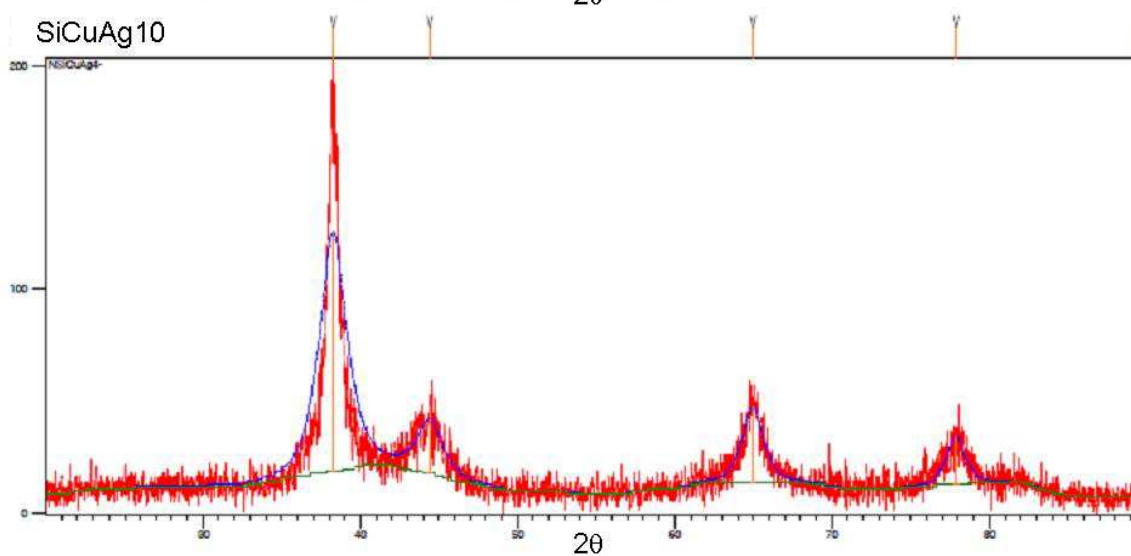
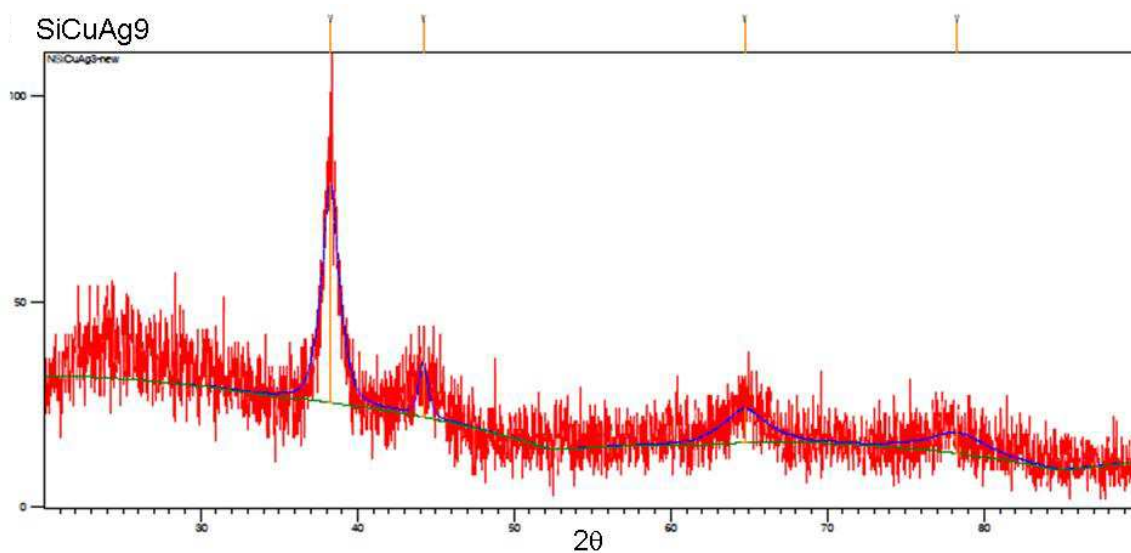


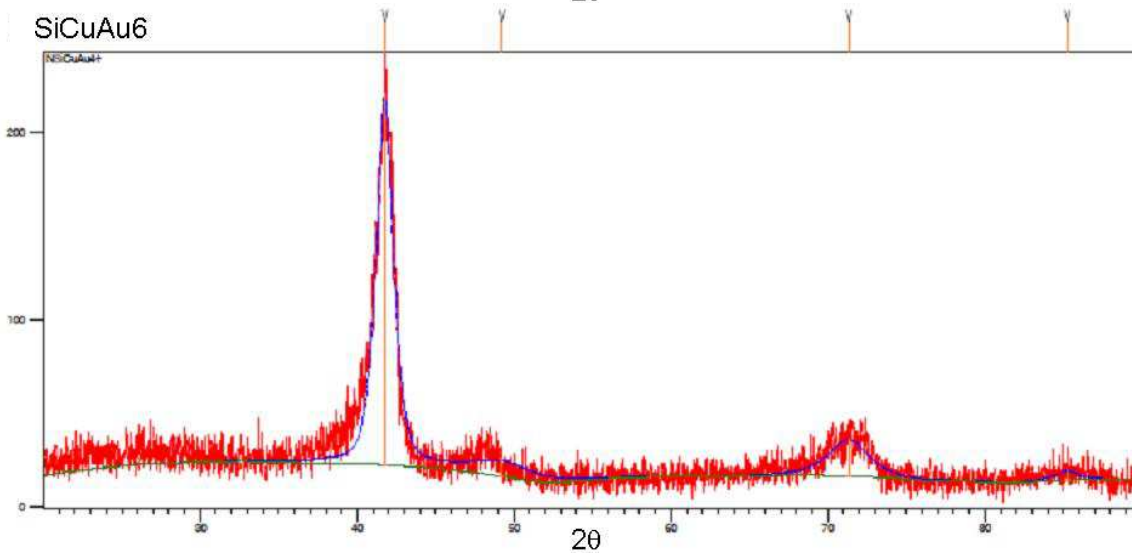
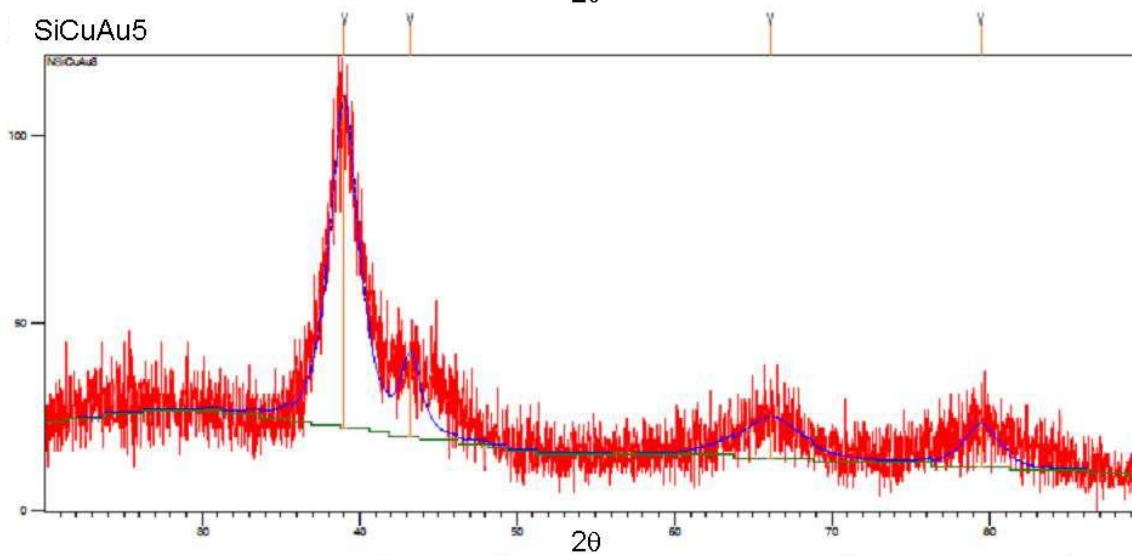
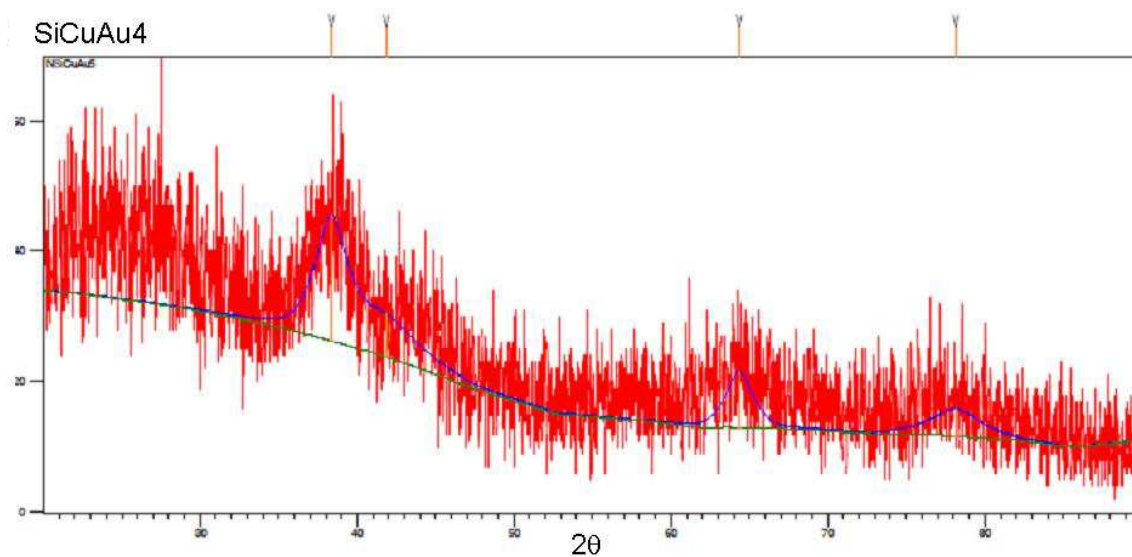




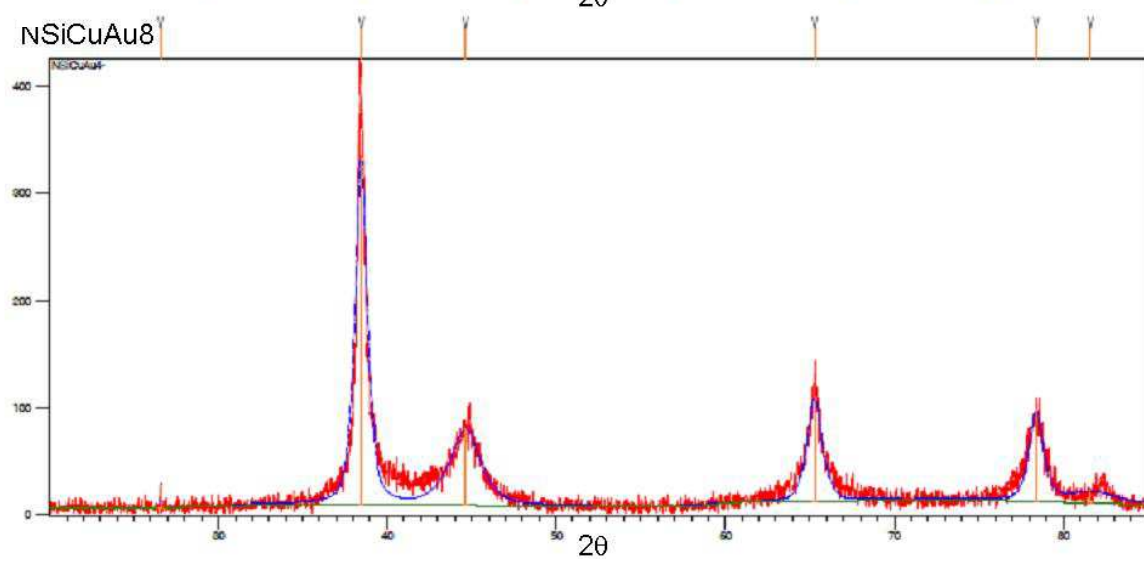
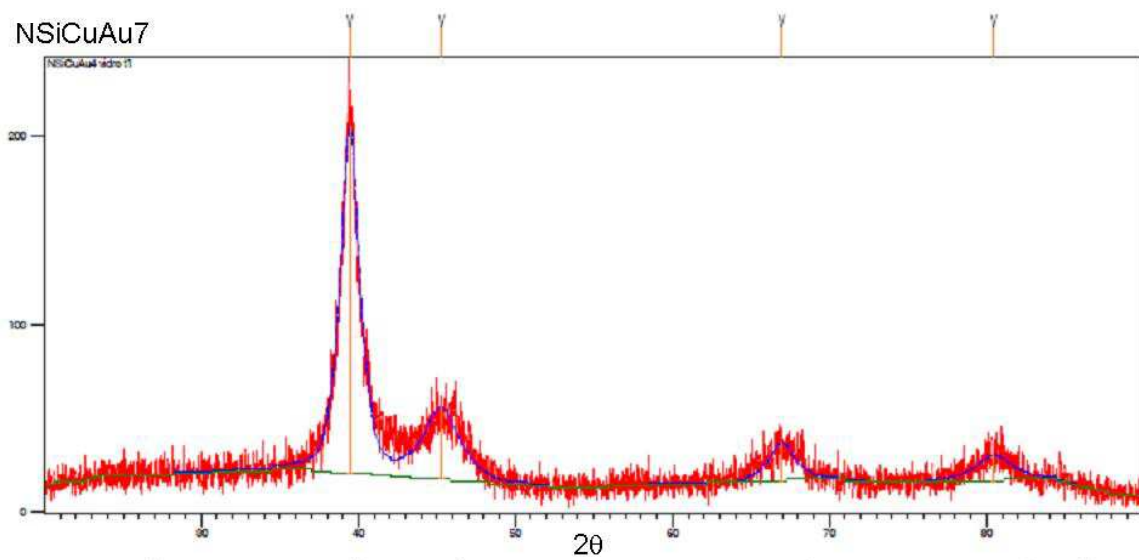








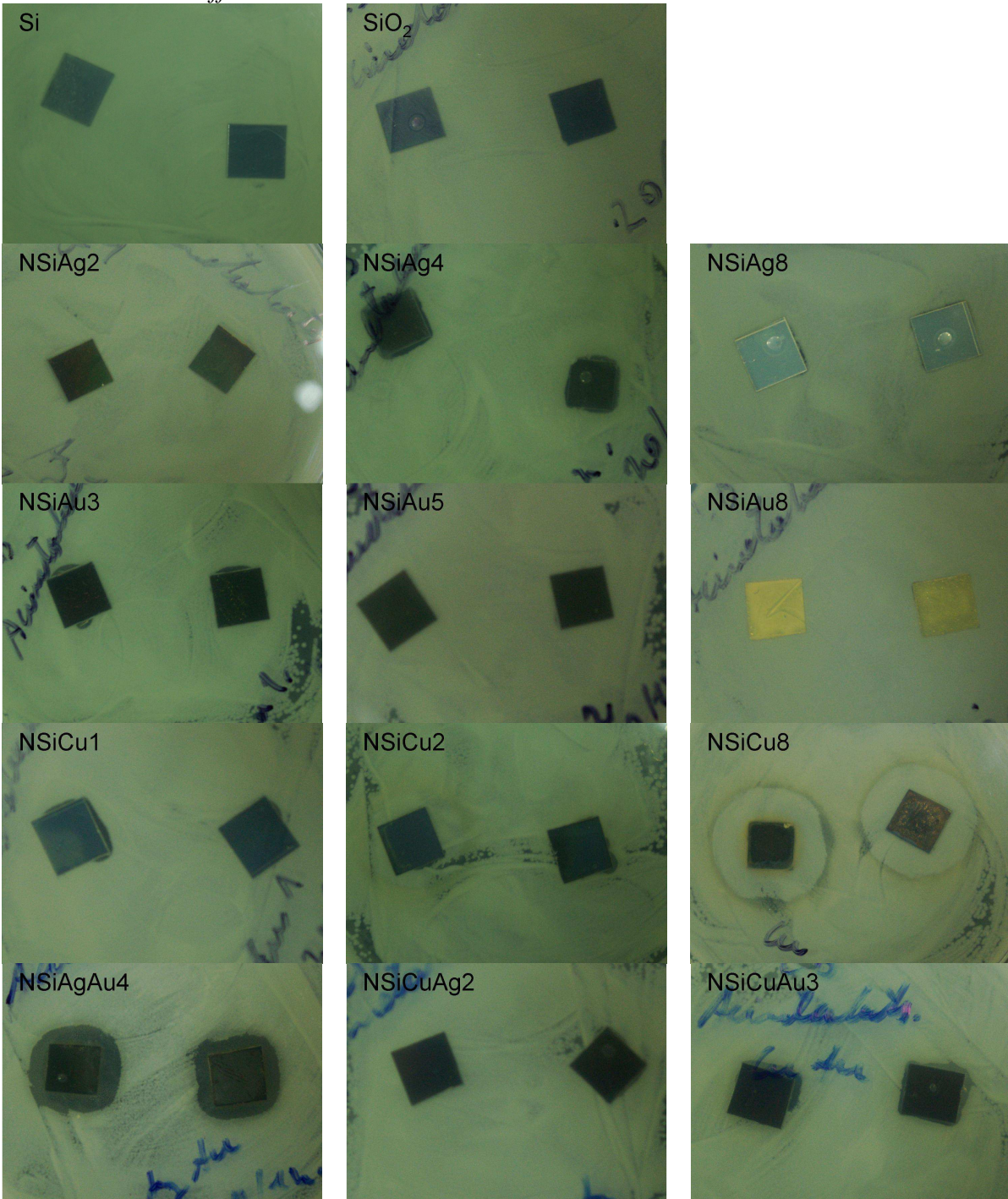




## Apêndice 2 – Testes microbiológicos

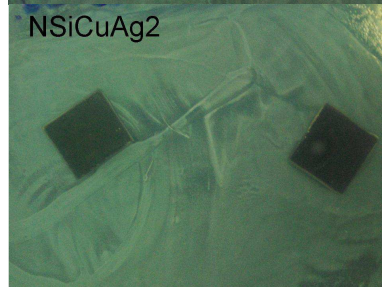
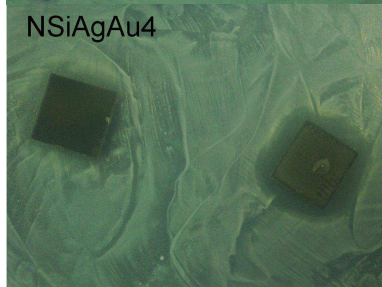
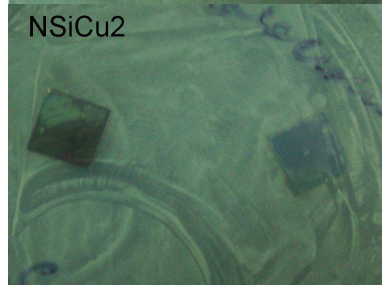
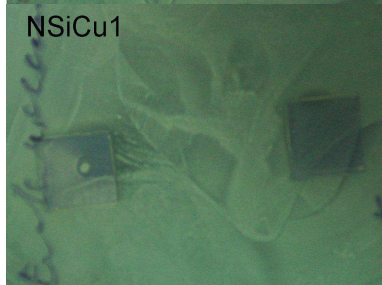
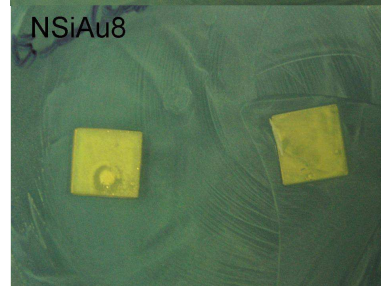
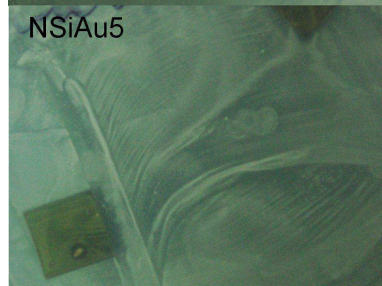
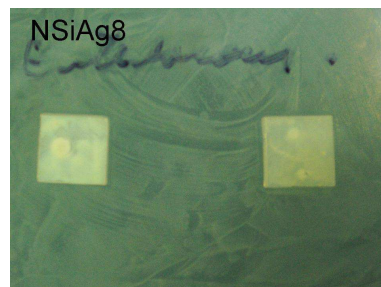
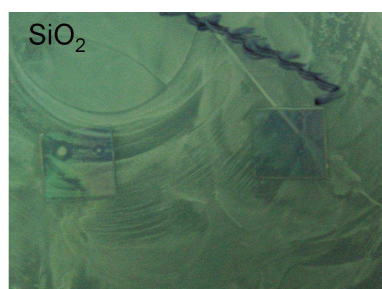
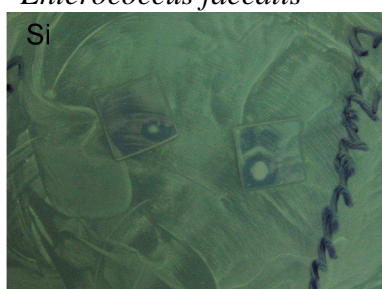
### A2.1 – Formação do halo de inibição de crescimento

*Acinetobacter lwoffii*



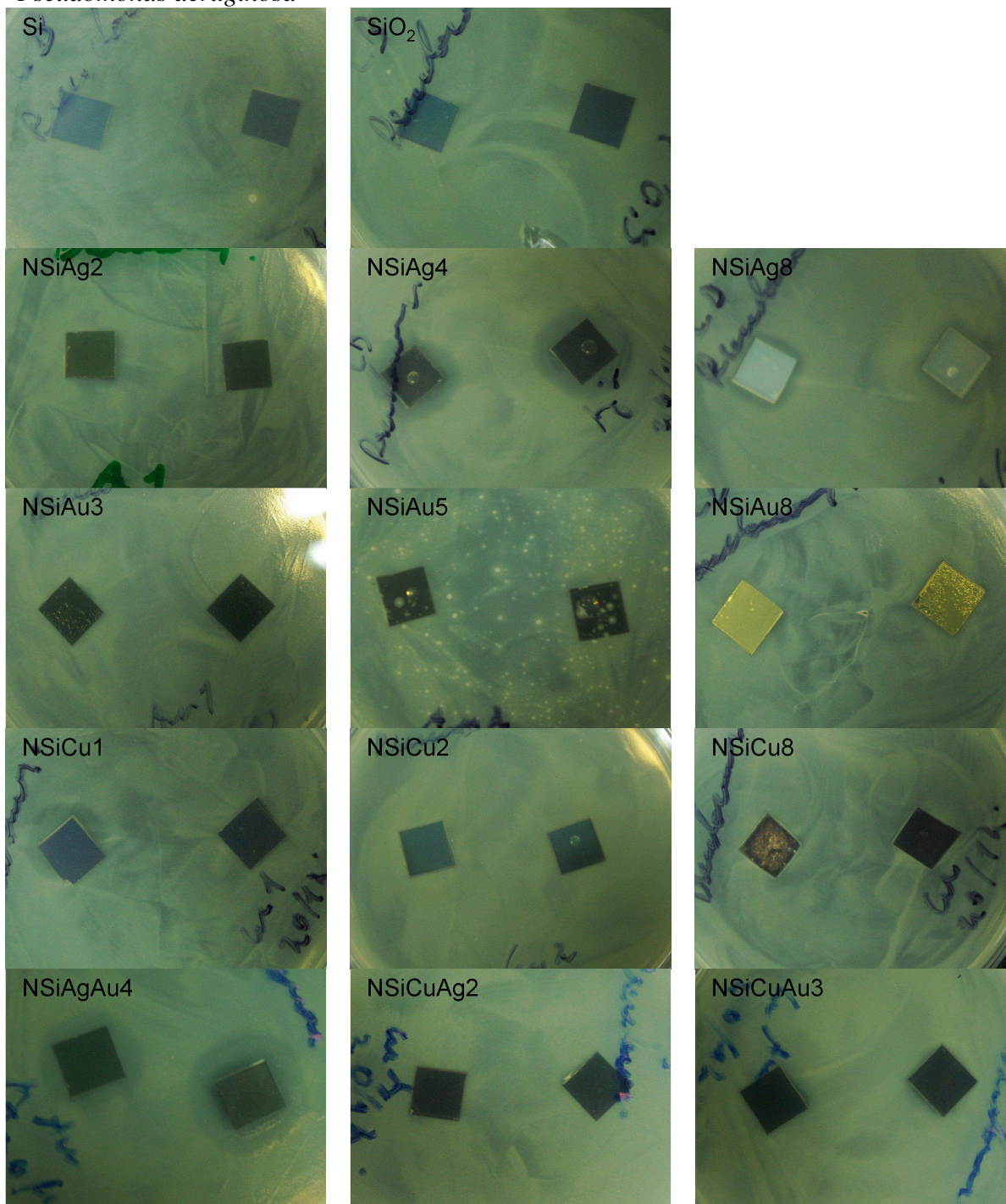


*Enterococcus faecalis*



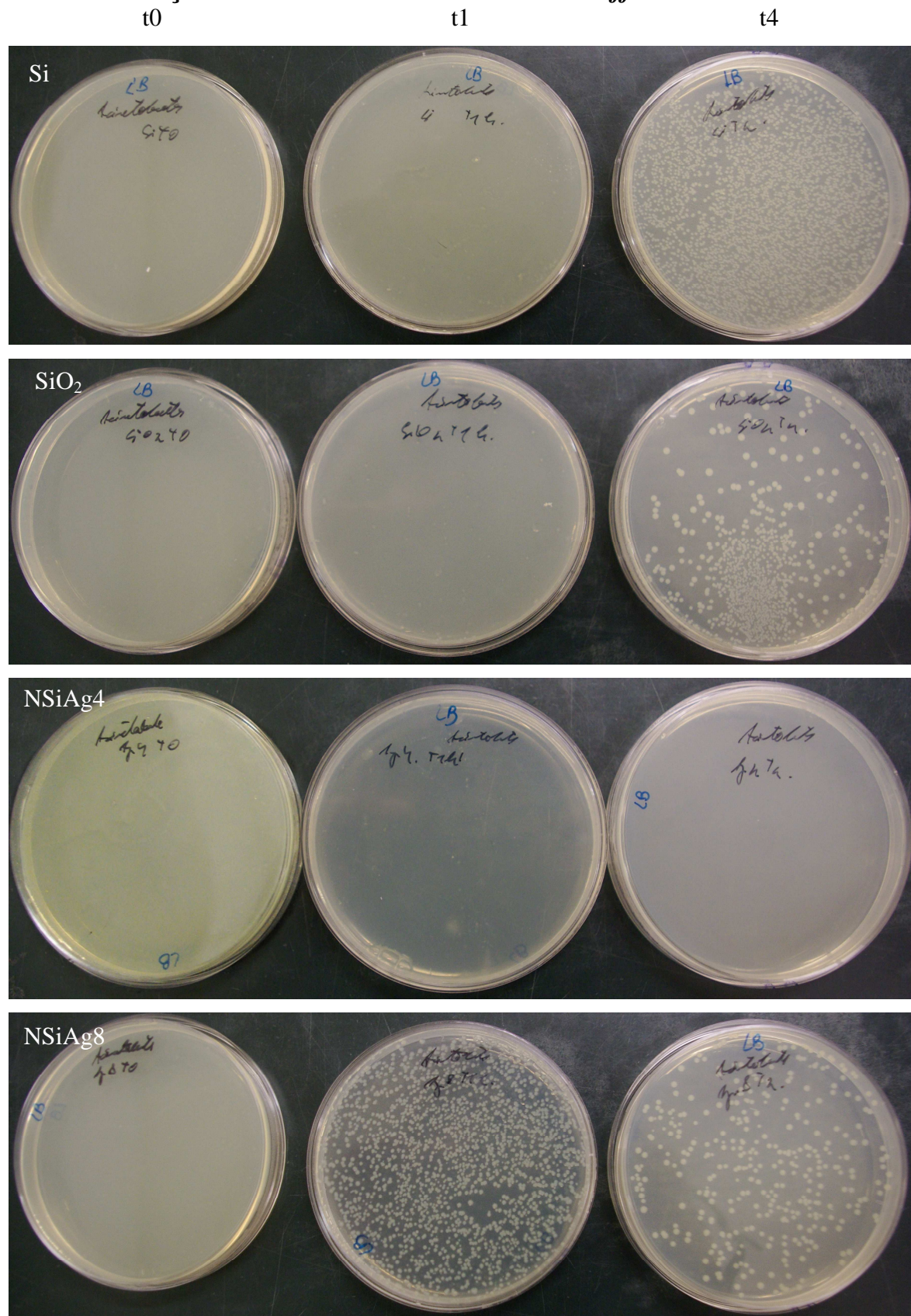


*Pseudomonas aeruginosa*





**A2.2 – Avaliação da viabilidade celular de *A. Lwoffii***





Anexos e Apêndices

