



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências e
Tecnologias dos Materiais



Gabriella Teresinha Lima Teixeira

Deposição do peptídeo análogo à Jelleine-I (JI-2) na liga Ti-6Al-4V para aplicações
biomédicas

Uberaba
2023



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências e
Tecnologias dos Materiais



Gabriella Teresinha Lima Teixeira

Deposição do peptídeo análogo à Jelleine-I (JI-2) na liga Ti-6Al-4V para aplicações
biomédicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias dos Materiais, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, na área de concentração de Materiais Aplicados em Biociências como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientadora: Prof. Dra. Natália Bueno Leite Slade
Coorientador: Prof. Dr. Jéferson Aparecido Moreto

Uberaba

2023

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

T266d	<p>Teixeira, Gabriella Teresinha Lima</p> <p>Deposição do peptídeo análogo à Jelleine-I (JI-2) na liga Ti-6Al-4V para aplicações biomédicas / Gabriella Teresinha Lima Teixeira. -- 2023. 112 p. : il., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023 Orientadora: Profa. Dra. Dra. Natália Bueno Leite Slade Coorientador: Prof. Dr. Jéferson Aparecido Moreto</p> <p>1. Peptídeos antimicrobianos. 2. Ligas de titânio. 3. Polimerização. 4. Plasma. 5. Contensões ortodônticas I. Slade, Natália Bueno Leite. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p>CDU 604.4:615.331</p>
-------	--

GABRIELLA TERESINHA LIMA TEIXEIRA

Deposição do peptídeo análogo à Jelleine-I (JI-2) na liga Ti-6Al-4V para aplicações biomédicas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba-MG, 28 de abril de 2023

Banca Examinadora:

Professora Dra. Natália Bueno Leite Slade - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Professora Dra. Patrícia Andressa de Almeida Buranello
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Professor Dr. Alexandre Suman de Araújo
Universidade Federal de São Paulo



Documento assinado eletronicamente por **NATALIA BUENO LEITE SLADE, Professor do Magistério Superior**, em 04/05/2023, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexandre Suman de Araujo, Usuário Externo**, em 05/05/2023, às 05:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **PATRICIA ANDRESSA DE ALMEIDA BURANELLO, Professor do Magistério Superior**, em 24/05/2023, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0986252** e o código CRC **22E1CD1C**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente os meus orientadores, professora Dra. Natalia Bueno Leite Slade e professor Dr. Jéferson Aparecido Moreto pelas inúmeras oportunidades, apoio, paciência e amizade. Serei eternamente grata por todas as contribuições na minha formação acadêmica e pessoal.

Agradeço a minha família por todo apoio e por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço as contribuições dos integrantes do Núcleo de Estudos de Eletroquímica Superfície e Corrosão (NEESC) e do Laboratório de Biofísica Molecular Experimental da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Agradeço ao professor Dr. Rogério Valentim Gelamo do Laboratório de Filmes Finos e Processos de Plasma da UFTM pela deposição do filme fino e auxílio nas medidas de FTIR e AFM.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo auxílio nas análises de MEV e EDX.

Agradeço a Professora Marcia Perez dos Santos Cabrera da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) pela doação do peptídeo.

Agradeço o professor Dr. Marcos Vínícios da Silva e a MSc. Malu Mateus Santos Obata pela realização dos ensaios biológicos.

Agradeço a professora Dra. Idalina Vieira Aoki da Universidade de São Paulo (USP) pela realização dos ensaios de SVET.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fomento nessa pesquisa.

RESUMO

As ligas de titânio estão entre os materiais mais utilizados na área da saúde para a produção de dispositivos implantáveis. Atribuição que se dá em função de suas propriedades mecânicas e da elevada biocompatibilidade apresentada nos meios de interesse. A liga Ti-6Al-4V tem sido amplamente utilizada para aplicações ortodônticas (*brackets* e/ou implantes). No entanto, a permanência destes dispositivos, em meio fisiológico, desencadeia processos de oxirredução e de proliferação de microorganismos, que impactam tanto em sua vida útil quanto na qualidade de vida de seus usuários. A imobilização de moléculas biofuncionais na superfície desses materiais tem se mostrado uma forma eficaz de funcionalizá-las com diversas propriedades biológicas, a citar: antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes. Além disso, essa estratégia pode contribuir tanto para o aprimoramento da biocompatibilidade quanto das propriedades corrosivas desses materiais. Tendo em vista esses aspectos, essa pesquisa teve como objetivo imobilizar um novo peptídeo antimicrobiano JI-Chis-2 (JI-2), análogo da Jelleine-I, na liga Ti-6Al-4V. Para então, promover a melhoria das propriedades antimicrobiana do biomaterial. A imobilização do peptídeo ocorreu após a deposição de PAA via PECVD. As superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas foram caracterizadas por meio de AFM, FTIR, MEV e EDX. Os resultados indicam o sucesso da deposição de PAA e da imobilização do peptídeo na superfície metálica. Por meio das caracterizações morfológicas e topográficas, verificou-se que o peptídeo possui a tendência de formar aglomerados na superfície metálica. Adicionalmente, foi realizado um teste de imersão em meio agressivo, buscando explorar os efeitos desencadeados pelo tratamento de superfície em ambiente agressivo. Com esses ensaios, foi possível verificar que a deposição do filme fino de ácido acrílico age como uma barreira protetora de corrosão no material. Esse efeito também foi evidenciado por testes de corrosão localizada realizados via SVET em diferentes tempos de imersão. Entretanto, o processo de corrosão foi intensificado nas superfícies contendo JI-2 devido à interação eletrostática entre os aglomerados catiônicos de peptídeo e os íons agressivos do meio. Ademais, realizou-se uma investigação sobre o comportamento eletroquímico global do Ti-6Al-4V funcionalizado com PAA/JI-2 em meio agressivo. Para tal, foi utilizado as técnicas de OCP e EIS. A atividade antimicrobiana do JI-2 foi avaliada contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Além disso, ensaios biológicos mostraram que o material funcionalizado possui a capacidade de prevenir a formação de biofilme de *E. coli*. Esses achados evidenciam que a estratégia de imobilizar JI-2 na liga Ti-6Al-4V via PECVD de PAA resultou no desenvolvimento de um material funcional com propriedades antibiofilme.

Palavras-Chave: Peptídeo Antimicrobiano. Ti-6Al-4V. Polimerização a plasma. Dispositivos dentários.

ABSTRACT

Titanium alloys are among the most used materials in the health area for the production of implantable devices. Attribution that is due to its mechanical properties and the high biocompatibility presented in the media of interest. Ti-6Al-4V alloy has been widely used for orthodontic applications (brackets and/or implants). However, the permanence of these devices, in a physiological environment, triggers oxidation-reduction processes and the proliferation of microorganisms, which impact both their useful life and the quality of life of their users. The immobilization of biofunctional molecules on the surface of these materials has proven to be an effective way to functionalize them with various biological properties, namely: antimicrobial, antifungal and antioxidant. In addition, this strategy can contribute to both the improvement of the biocompatibility and the corrosive properties of these materials. In view of these aspects, this research aimed to immobilize a new antimicrobial peptide JI-Chis-2 (JI-2), analogue of Jelleine-I, in the Ti-6Al-4V alloy. To then promote the improvement of the antimicrobial properties of the biomaterial. Peptide immobilization occurred after PAA deposition via PECVD. Functionalized and non-functionalized surfaces were characterized using AFM, FTIR, SEM and EDX. The results indicated the successful deposition of PAA and immobilization of peptides on the metallic surface. Through the morphological and topographical characterizations, it was verified that the peptide tends to form agglomerates on the metallic surface. Additionally, an immersion test was carried out in an aggressive environment, seeking to explore the effects triggered by surface treatment in an aggressive environment. With these tests, it was possible to verify that the deposition of the acrylic acid thin film acts as a protective barrier against corrosion in the material. This effect was also evidenced by localized corrosion tests performed via SVET at different immersion times. However, the corrosion process was intensified on the surfaces containing JI-2 due to the electrostatic interaction between the cationic peptide clusters and the aggressive ions in the medium. Furthermore, an investigation was carried out on the electrochemical behavior of Ti-6Al-4V functionalized with PAA/JI-2 in aggressive media. For this, the techniques of OCP and EIS were used. The antimicrobial activity of JI-2 was evaluated against Gram-negative bacteria *E. coli*. Furthermore, biological assays have shown that the functionalized material has the ability to prevent the formation of *E. coli* biofilms. These findings show that the strategy of immobilizing JI-2 on the Ti-6Al-4V alloy via PAA PECVD resulted in the development of a functional material with antibiofilm properties.

Keywords: Antimicrobial Peptide. Ti-6Al-4V. Plasma polymerization. Dental devices.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação de células unitárias do titânio HC na fase α e CCC na fase β	18
Figura 2 – Esquema representativo da imobilização do peptídeo em Ti-6Al-4V	20
Figura 3 – Fórmulas estruturais dos aminoácidos e suas propriedades	21
Figura 4 – Esquema representativo da ação antimicrobiana de AMPs	24
Figura 5 – Mecanismo de ação dos AMPs (a) ripas de barril (b) modelo toroidal (c) modelo de carpete.....	24
Figura 6 – Prevenção contra a formação de biofilme dos AMPs	25
Figura 7 – Estrutura molecular do peptídeo JI-2 (a) estrutura peptídica da JI-2 (b) estrutura helicoidal da JI-2 em pH neutro	27
Figura 8 – Esquema representativo da imobilização de peptídeos em superfícies metálicas por silanização sem moléculas reticulantes e polimerização por plasma	35
Figura 9 – Detalhes do método de polimerização a plasma em superfícies metálicas	41
Figura 10 – Montagem experimental utilizada para a deposição de AA em Ti-6Al-4V	45
Figura 11 – Espectrômetro utilizado para as medidas de FTIR	47
Figura 12 – Microscópio de força atômica e seu princípio de funcionamento (a) Microscópio de força atômica utilizado para as análises topográficas das superfícies (b) funcionamento do equipamento baseado em Kaliva e Vamvakaki 2020 e de Oliveira et al. 2012	48
Figura 13 – Funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura.....	50
Figura 14 – Foto esquemática mostrando o arranjo experimental utilizado nos ensaios eletroquímicos globais: computador para aquisição dos dados, célula eletroquímica contendo um compartimento de três eletrodos e seus respectivos lugares e o potenciostato/galvanostato	52
Figura 15 – Características superficiais da liga Ti-6Al-4V antes e depois da deposição de filme fino de AA via PECVD (a) antes do tratamento (b) após a deposição de AA.....	56
Figura 16 – Espectro de FTIR de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA via PECVD	57
Figura 17 – Efeito da concentração de peptídeo Chitprobe-2 na imobilização.....	58
Figura 18 – Mudanças espectrais da superfície após a imobilização com o JI-2	59
Figura 19 – Imagens de AFM para as superfícies de Ti-6Al-4V (a) nas dimensões 20 μm x 20 μm (b) contraste de fase (c) topografia nas dimensões 5 μm x 5 μm e (d) imagem 3D da superfície	60

Figura 20 – Imagens de MEV para a superfície de Ti-6Al-4V (a) imagem de SE com magnitude de 1000x (b) imagem de BSE s com magnitude de 1000x (c) imagem de SE com magnitude de 10000x (d) imagem de BSE com magnitude de 10000x.....	61
Figura 21 – Análise da composição química de Ti-6Al-4V.....	62
Figura 22 – Imagens de AFM para as superfícies de Ti-6Al-4V/PAA (a) nas dimensões 20 µm x 20 µm (b) contraste de fase (c) topografia nas dimensões 5 µm x 5 µm (d) imagem 3D da superfície.....	63
Figura 23 – Imagens de MEV para a superfície de Ti-6Al-4V/PAA (a) imagem de elétrons secundários com magnitude de 1000x (b) imagem de elétrons retroespalhados com magnitude de 1000x (c) imagem de elétrons secundários com magnitude de 10000x (d) imagem de elétrons.....	64
Figura 24 – Análise da composição química de Ti-6Al-4V/PAA (a) imagem morfológica da superfície Ti-6Al-4V (b) composição química via espectros de EDX.....	65
Figura 25 – Imagens de AFM para as superfícies de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a) nas dimensões 20 µm x 20 µm (b) contraste de fase (c) topografia nas dimensões 5 µm x 5 µm (d) imagem 3D da superfície.....	66
Figura 26 – Imagens de MEV para a superfície de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a) imagem de elétrons secundários com magnitude de 1000x (b) imagem de elétrons retroespalhados com magnitude de 1000x (c) imagem de elétrons secundários com magnitude de 10000x (d) imagem de elétrons retroespalhados com magnitude de 1000x.....	68
Figura 27– Análise topográfica e de composição química do aglomerado de peptídeos presentes na liga metálica (a) imagem AFM (5 µm x 5 µm); (b) imagem 3D da superfície; (c) imagem MEV obtida por elétrons secundários e (d) Análise EDX do aglomerado.....	69
Figura 28 – Microscopia de Ti-6Al-4V em diferentes tempos de imersão (a) antes da imersão em aumento de 10x; (b) antes da imersão aumento de 50x; (c) 3 h de imersão com aumento de 10x; (d) 3 h de imersão com aumento de 50x; (e) 24 h de imersão com aumento de 10x e (f) 24 h de imersão com aumento de 50x.....	71
Figura 29 – Imagens de MEV e mapas de EDX das amostras não funcionalizadas expostas a 0.1 mol L ⁻¹ de NaF durante 3 h (a) aspectos morfológicos do substrato; (b) região com presença de Ti; (c) região com presença de Al; (d) região com presença de V.....	72
Figura 30 – Microscopia de Ti-6Al-4V/PAA em diferentes tempos de imersão (a) antes da imersão em aumento de 10x; (b) antes da imersão aumento de 50x; (c) 3 h de imersão com aumento de 10x; (d) 3 h de imersão com aumento de 50x; (e) 24 h de imersão com aumento de 10x e (f) 24 h de imersão com aumento de 50x.....	73

Figura 31– Imagens de MEV e mapas de EDX das amostras revestidas com ácido acrílico expostas a solução de 0,1 mol L ⁻¹ de NaF por 24 h (a-b) aspectos morfológicos do material funcionalizado; (c) região com presença de Ti; (d) região com presença de Al; (e) região com presença de V, e (f) região com presença de C	74
Figura 32 – Desenho esquemático do mecanismo de corrosão proposto para liga Ti-6Al-4V revestida e não revestida.....	74
Figura 33 – Microscopia de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 em diferentes tempos de imersão (a) antes da imersão ampliação de 10x; (b) antes da imersão aumento de 50x; (c) 3 h de imersão com aumento de 10x; (d) 3 h de imersão com aumento de 50x; (e) 24 h de imersão com aumento de 10x e (f) 24 h de imersão com aumento de 50x.....	76
Figura 34 – Distribuição de densidade de corrente para Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA (a-b) Ti-6Al-4V em 3 h de imersão e sua correspondente MO; (c-d) Ti-6Al-4V/PAA em 3 h de imersão e sua MO; (e-f) Ti-6Al-4V em 15 h de imersão e sua MO; (g-h) Ti-6Al-4V/PAA em 15 h de imersão e sua MO	78
Figura 35 – Distribuição de densidade de corrente para Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a-b) em 3 h de imersão e sua respectiva MO; (c-d) em 15 h de imersão e sua MO; (e) representação esquemática da interação eletrostática entre os aglomerado e íons de flúor	78
Figura 36 – Medidas de OCP em 0.6 mol L ⁻¹ de NaCl para as amostras de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA/JI-2.....	79
Figura 37 – Medidas de EIS em 0.6 mol L ⁻¹ de solução de NaCl para Ti-6Al-4V (a, b) Espectro de Bode, (c) diagrama de Nyquist e (d) circuito elétrico equivalente utilizado para simulação dos dados de EIS	81
Figura 38 – Valores dos parâmetros de EIS para a liga Ti-6Al-4V (a) R _Ω , (b) CPE _{bl} , (c) R _{bl} em função do tempo de imersão.....	83
Figura 39 – Características morfológicas das superfícies não revestidas antes e após ensaios de EIS (a-b) antes dos ensaios EIS, e (c-d) após os ensaios EIS	84
Figura 40 – Análise da composição química da superfície não revestida (a) antes dos testes EIS, e (b) após os testes EIS.....	84
Figura 41 – Medidas de EIS em 0.6 mol L ⁻¹ de solução de NaCl para Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a, b) Espectro de Bode, (c) diagrama de Nyquist.....	85
Figura 42 – Representação esquemática da corrosão (a) CEE proposto por Jüttner (1990), e (b) CEE utilizado para ajuste dos dados experimentais propostos por Kendig e Mansfeld (1982)	86

Figura 43 – Valores dos parâmetros de EIS de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a) R_{Ω} (b) CPE_{bl} (c) CPE_{pl} (d) R'_p (e) R_{bl} em função do tempo de imersão.....	87
Figura 44 – Ajustes obtidos em 3 h de imersão em 0.6 mol L ⁻¹ de NaCl (a) ângulo de fase (b) Z em função da frequência.....	88
Figura 45 – Variações nos valores do módulo de impedância obtidos em 0.01 Hz para material funcionalizado e não funcionalizado em função do tempo de imersão.....	88
Figura 46 – Características morfológicas de superfícies revestidas (a) antes dos ensaios de EIS, (b) após os ensaios de EIS, (c) mecanismo de corrosão proposto para amostras funcionalizadas	90
Figura 47 – Comportamento do C_{bl} e da espessura da camada de óxido nativo em função do tempo de imersão para os corpos de prova Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a) C_{bl} em função do tempo de imersão e (b) evolução da espessura da camada de óxido nativo em função do tempo de imersão	92
Figura 48 – Atividade antibiofilme dos materiais não funcionalizados e funcionalizados	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura dos aminoácidos presentes em proteínas e peptídeos e suas respectivas abreviaturas.....	22
Tabela 2 – Características dos peptídeos da família das Jelleines.....	26
Tabela 3 – Propriedades do peptídeo JI-2	27
Tabela 4 – Métodos de deposição de peptídeos bioativos em superfícies metálicas e os principais resultados obtidos pela literatura	32
Tabela 5 – Parâmetros tridimensionais de rugosidade	49
Tabela 6 – Grupos funcionais associados a deposição de PAA em Ti-6Al-4V	57
Tabela 7 – Parâmetros de rugosidade das superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas.....	67
Tabela 8 – Valores dos parâmetros EIS obtidos pelo CEE para a liga Ti-6Al-4V.....	82
Tabela 9 – Valores dos parâmetros EIS obtidos pelo CCE para Ti-6Al-4V/PAA/JI-2.....	87
Tabela 10 – Valores de MIC em ensaios realizados em triplicatas	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido Acrílico
AFM - Atomic Force Microscopy
AMPs - Antimicrobial Peptides
APD - Antimicrobial Peptide Database
APTES - (3-aminopropil)trietoxisilano
BSE - Elétrons Retroespalhados
CE - Counter Electrode
CEE – Circuito Elétrico Equivalente
CCC - Cúbica de Corpo Centrado
cp - titânio comercialmente puro
CPE - elemento de fase constante
CPE_{bl} - elemento de fase constante da camada barreira
CPE_{pl} - elemento de fase constante da camada porosa
CPTES - 3-(cloropropil)-trietoxisilano (CPTES)
DC - Direct Current
DO - Densidade Óptica
DOPA - 3,4-Dihidroxi-L-fenilalanina
EDC - 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDX - Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIS - Electrochemical Impedance Spectroscopy
ESCA - Electron Spectroscopy for Chemical Analysis
FTIR - Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
HC - Hexagonal Compacta
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC - Minimum Inhibitory Concentration
MO - Microscopia Óptica
NaCl – Cloreto de Sódio
NaF - Fluoreto de Sódio
NHS - N-hidroxissuccinimida
OCP - Open Circuit Potential

PAA - Ácido Poliacrílico
PBS - Tampão fosfato-salino
PECVD - Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
PEG - Polietilenoglicol
 R_{Ω} - Resistência da solução
 R_{bl} - Resistência de polarização da camada de barreira
 R_{bl} - Resistência da camada de barreira
 R'_p - Resistência adicional da solução dentro dos poros
RE - Reference Electrode
RMS - Rugosidade Quadrática Média
 S_a - rugosidade média
SAMs - Self-assembled monolayers
SE - Elétrons Secundários
 S_{sk} – Assimetria
SVET - Scanning Vibrating Electrode Technique
UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UNESP - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
USP - Universidade de São Paulo
WE - Working Electrode
XPS - X-ray Photoelectron Spectroscopy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 PEPTÍDEOS BIOATIVOS	21
2.2 AMPs	22
2.3 JELLEINES	25
2.4 PANORAMA DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES METÁLICAS COM PEPTÍDEOS BIOATIVOS	28
2.5 MÉTODOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES METÁLICAS COM PEPTÍDEOS BIOATIVOS	31
2.5.1 Método de silanização	33
2.5.2 SAMs	36
2.5.3 Adsorção física	37
2.5.4 Eletrodeposição de PEG	39
2.5.5 Polimerização a plasma	39
2.5.6 Dopamina	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 OBJETIVOS GERAIS	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 MATERIAIS	44
4.2 PREPARAÇÃO DAS SUPERFÍCIES	44
4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES	44
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES	46
4.5 TESTES DE IMERSÃO	51
4.6 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS	51
4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS	53
4.7.1 Bioensaio de atividade antimicrobiana do peptídeo	53
4.7.2 Atividade antibiofilme das superfícies	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1 ANÁLISE DA DEPOSIÇÃO DO FILME FINO DE PAA NA SUPERFÍCIE METÁLICA VIA PECVD	55
5.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DA IMOBILIZAÇÃO DO PEPTÍDEO JI-2 NA SUPERFÍCIE METÁLICA	57

5.3 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA, MORFOLOGIA E DE RUGOSIDADE DAS SUPERFÍCIES FUNCIONALIZADAS E NÃO FUNCIONALIZADAS	59
5.4 TESTES DE IMERSÃO EM MEIO AGRESSIVO	70
5.5 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS LOCALIZADOS	76
5.6 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS GLOBAIS	78
5.6.1 Potencial de Circuito Aberto (OCP)	78
5.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	80
5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO JI-2	92
5.8 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DAS SUPERFÍCIES NÃO FUNCIONALIZADAS E FUNCIONALIZADAS	93
6 CONCLUSÕES	94
AGÊNCIA DE FOMENTO	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
APÊNDICE A - ARTIGOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO	108

1 INTRODUÇÃO

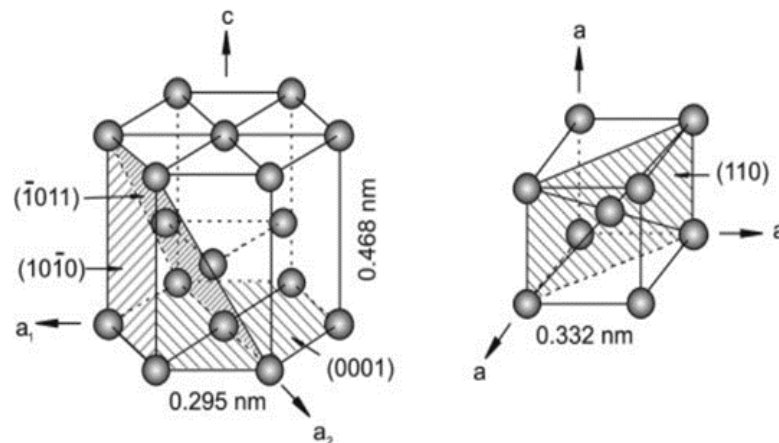
As superfícies metálicas são amplamente utilizadas em diversas áreas, tais como na indústria aeronáutica, indústria de alimentos, engenharia naval e engenharia biomédica. Na área da saúde, o uso de metais é imprescindível na fabricação de dispositivos para aplicações ortopédicas, odontológicas e cardiovasculares. De fato, as aplicabilidades dessas superfícies se concentram na produção de *stents* vasculares, implantes dentários, ortopédicos ou de córnea, entre outros (CASTELLANOS et al., 2017b; KASTELLORIZIOS, et al., 2012; SEO et al., 2010; HUANG et al., 2003; PARK et al., 2011). Nessa perspectiva, dentre os biomateriais metálicos mais utilizados para as finalidades terapêuticas citadas, destacam-se as ligas de titânio, o aço inoxidável de grau médico e ligas de cobalto-crômio (PANAYOTOV et al., 2015; MAHAPATRO et al., 2006; CASTELLANOS et al., 2017b). Uma consequência das propriedades mecânicas e da elevada biocompatibilidade apresentadas por esses materiais no meio de interesse (BEKMURZAYEVA et al., 2018).

De acordo com Panayotov et al. (2015), o titânio é o material mais utilizado para a fabricação de implantes dentários. Esse material pode ser usado como titânio comercialmente puro (cp) ou como ligas de titânio (Ti-6Al-4V). Além das propriedades mecânicas e compatibilidade com o corpo humano, o incessante uso desse material na odontologia e ortodontia é justificado por sua resistência aos processos corrosivos em comparação a outros metais (LEYENS; PETERS, 2006). Em uma perspectiva estrutural desse material, Leyens e Peters (2006) salientam que a estrutura cristalina do titânio e suas ligas são dependentes de intervalos específicos de temperatura. Em baixas temperaturas, o titânio puro e a maioria de suas ligas apresentam estrutura cristalina do tipo hexagonal compacta (HC), conhecida como fase α . Entretanto, em altas temperaturas ($882 \pm 2^\circ\text{C}$) a estrutura cristalina apresentada é do tipo cúbica de corpo centrado (CCC), conhecida como fase β . Portanto, as ligas de titânio podem ser classificadas em fases do tipo α , β , $\alpha + \beta$ e quase α (CALLISTER; RETHWISCH, 2018).

Os fatores estruturais do titânio e suas ligas impactam diretamente na diversidade de suas propriedades, tais como: na deformação plástica, na taxa de difusão e em propriedades mecânicas (LEYENS; PETERS, 2006). A taxa de difusão e a deformação plástica estão relacionadas com a estrutura cristalina do material. Como os átomos da fase α estão densamente empacotados, os materiais na fase α apresentam menores taxas de difusão em comparação àqueles na fase β (LEYENS; PETERS, 2006). Na perspectiva das propriedades mecânicas, a liga Ti-6Al-4V apresenta limite de resistência à tração de 947 MPa, limite de escoamento de 877 MPa e ductilidade de 14% AL em 50 mm (CALLISTER; RETHWISCH, 2018). As ligas

de titânio bifásicas do tipo $\alpha + \beta$ possuem a capacidade de produzir dispositivos com propriedades terapêuticas de alta resistência. Nesse sentido, a liga Ti-6Al-4V é uma liga do tipo $\alpha + \beta$ amplamente utilizada na ortodontia e em dispositivos dentários (ZORN et al., 2007). Nessa liga, o vanádio é utilizado como um estabilizador da fase β e o alumínio como estabilizador da fase α . Assim, o uso da Ti-6Al-4V em dispositivos dentários é justificado pela sua alta resistência mecânica e menor módulo de Young em comparação a outros materiais (NICHOLSON, 2020). Segundo Niinomi (2008), os valores baixos de módulo de Young são considerados uma vantagem para a cicatrização e remodelação óssea em dispositivos implantáveis. A **Figura 1**, representa a estrutura cristalina do titânio nas distintas fases, α e β .

Figura 1 – Representação de células unitárias do titânio HC na fase α e CCC na fase β



Fonte: Leyens e Peters, 2006

Os materiais implantáveis a base de titânio são considerados bioinertes, isto é, não ocorre nenhuma interação ativa entre esses materiais metálicos e o tecido hospedeiro (MUTREJA et al., 2020). Em princípio, a natureza bioinerte desses biomateriais pode ser uma grande vantagem devido a sua estabilidade química. No entanto, o fato de ser bioinerte pode dificultar o crescimento de células ósseas na região dos dispositivos, podendo acarretar em falhas cirúrgicas e afetar a estabilidade a longo prazo do implante no corpo (CHEN et al., 2013).

Desta forma, pesquisas apontam sobre a necessidade de realizar modificações em materiais metálicos utilizados para implantes dentários e *brackets* visando melhorar a integração aos tecidos circundantes e propriedades antimicrobianas (CHEN et al., 2017; HUANG et al., 2003; ROESSLER et al., 2001). Nesse sentido, uma das formas eficazes de obter materiais biocompatíveis é via imobilização de moléculas biofuncionais, como: peptídeos, proteínas e lipossomas carregados com drogas específicas (PARK et al., 2011;

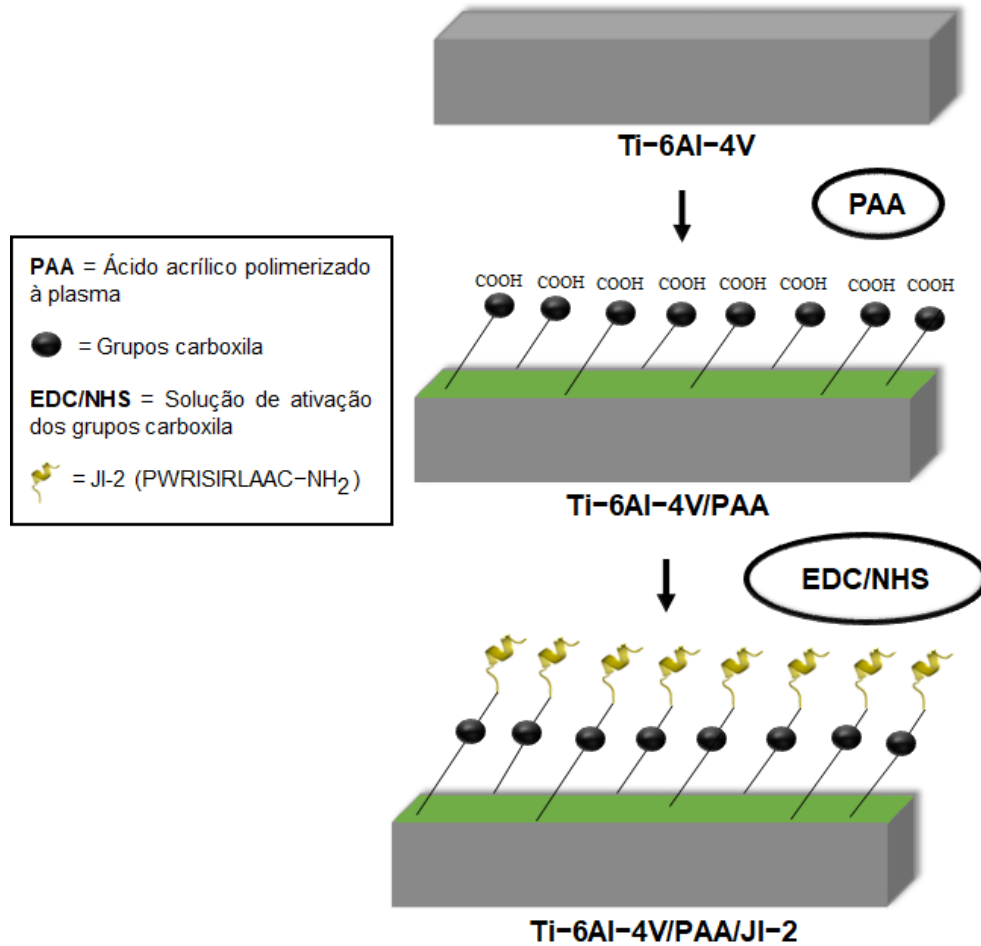
KASTELLORIZIOS, et al., 2012; HARVEY, et al., 2012). Panayotov et al. (2015) mencionam alguns efeitos que as funcionalizações de ligas de titânio com biomoléculas podem proporcionar em implantes dentários, entre elas estão: melhorar as propriedades de osseointegração de implantes dentários e aumentar as propriedades antibacterianas e antibiofilme das superfícies.

Em vista disso, esse trabalho teve o intuito de imobilizar um novo peptídeo antimicrobiano JIChis-2 (JI-2) análogo da Jelleine-I na liga Ti-6Al-4V. Para tal, foi realizada a deposição de ácido acrílico, que é um ácido monocarboxílico, com o intuito de formar um filme fino polimérico e biocompatível via Deposição Química a Vapor Assistida por Plasma, do inglês, *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition* (PECVD). Assim, foi possível realizar a ligação covalente da superfície metálica com um dos terminais do peptídeo. A **Figura 2** representa as etapas que foram realizadas para a imobilização do JI-2 em Ti-6Al-4V.

O **capítulo 1** desse trabalho apresenta as propriedades estruturais dos peptídeos bioativos com enfoque nos peptídeos antimicrobianos, do inglês, *Antimicrobial Peptides* (AMPs) e as Jelleines. Além disso, é apresentada uma contextualização dos estudos pioneiros envolvendo a funcionalização de superfícies metálicas com peptídeos bioativos, bem como as potencialidades e os desafios dos principais métodos utilizados atualmente. O **capítulo 2** envolve o objetivo geral e os objetivos específicos desse trabalho. O **capítulo 3** discorre sobre os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento desta pesquisa. Em suma, as superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas com o JI-2 foram caracterizadas estruturalmente e morfologicamente via Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês, *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), Microscopia de Força Atômica, do inglês, *Atomic Force Microscopy* (AFM), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia dispersiva de energia de raios-X, do inglês, *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy* (EDX). A resistência ao processo de corrosão da liga Ti-6Al-4V com e sem revestimento foi verificada inicialmente através de testes de imersão em solução contendo íons cloreto. As morfologias das superfícies, após os testes de imersão, foram acessadas via a técnica de microscopia ótica (MO) e MEV/EDX. Com o intuito de verificar a estabilidade termodinâmica dos materiais com e sem revestimento e a natureza do filme passivo e/ou de qualquer outro filme na superfície da liga Ti-6Al-4V utilizou-se as técnicas de Potencial de Circuito Aberto, do inglês, *Open Circuit Potential* (OCP) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica, do inglês, *Electrochemical Impedance Spectroscopy* (EIS). Por fim, ensaios biológicos foram realizados para determinar a Concentração Inibitória Mínima, do inglês, *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) do peptídeo e atividade antibiofilme do revestimento, ambos contra a bactéria gram-negativa *E. Coli*. O **capítulo 4** envolve os

resultados obtidos e, por fim, as conclusões alcançadas no decorrer dessa pesquisa são apresentadas no **capítulo 5**.

Figura 2 – Esquema representativo da imobilização do peptídeo em Ti-6Al-4V



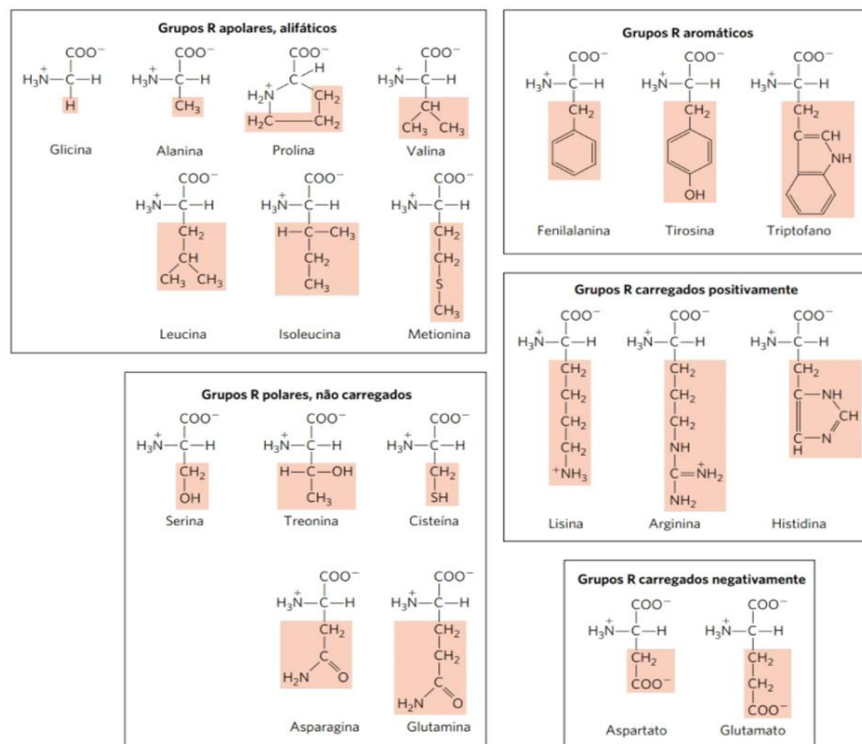
Fonte: da autora, 2023

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

A imobilização de peptídeos bioativos em superfícies é um dos métodos mais promissores funcionalização (HUANG et al., 2003). Basicamente, os peptídeos são cadeias de aminoácidos que compõem proteínas e possuem atividades biológicas (BHANDARI et al., 2020). As proteínas e os peptídeos podem ser constituídos por até 20 aminoácidos distintos ligados covalentemente por meio de ligações peptídicas. De acordo com Nelson e Cox (2019), os aminoácidos possuem propriedades estruturais semelhantes entre si, no qual cada um é composto de um grupo amina e um grupo carboxila ligados a um carbono central, conhecido como carbono α . Entretanto, o que difere cada um dos aminoácidos é a sua cadeia lateral, que possui um papel crucial na determinação de aspectos físico-químicos dos aminoácidos, tais como: tamanho, carga elétrica e estrutura (NELSON; COX, 2019; SLADE, 2014). Desta forma, as extremidades da cadeia polipeptídica são denominadas de aminoterminal (N-terminal) e carboxiterminal (C-terminal). A **Figura 3** representa a classificação estrutural, distinções das cadeias laterais e as propriedades dos 20 aminoácidos presentes em proteínas e peptídeos.

Figura 3 – Fórmulas estruturais dos aminoácidos e suas propriedades



Fonte: Nelson e Cox, 2019

Os aminoácidos podem ser representados por abreviaturas de uma ou três letras. Desta forma, a **Tabela 1** representa a nomenclatura dos aminoácidos e suas abreviações.

Tabela 1 – Nomenclatura dos aminoácidos presentes em proteínas e peptídeos e suas respectivas abreviaturas

Aminoácidos	Abreviatura com três letras	Abreviatura com uma letra	Aminoácidos	Abreviatura com três letras	Abreviatura com uma letra
Alanina	Ala	A	Metionina	Met	M
Cisteína	Cys	C	Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D	Prolina	Pro	P
Ácido glutâmico	Glu	E	Glutamina	Gln	Q
Fenilalanina	Phe	F	Arginina	Arg	R
Glicina	Gly	G	Serina	Ser	S
Histidina	His	H	Treonina	Thr	T
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V
Lisina	Lys	K	Triptofano	Trp	W
Leucina	Leu	L	Tirosina	Tyr	Y

Fonte: adaptado de Voet e Voet, 2013

2.2 AMPs

Os AMPs possuem a função de proteger seres humanos de diversos patógenos bacterianos, incluindo atividade contra um amplo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (TOKE, 2005; GODOY-GOLARDO et al., 2014; KAZEMZADEH-NARBAT et al., 2021). De acordo com o banco de dados de peptídeos antimicrobianos, do inglês *Antimicrobial Peptide Database (APD)*¹, existem 3.569 AMPs relatados nos reinos dos seres vivos, dos quais 32 deles foram imobilizados na superfície. Esses peptídeos apresentam atividade membranolítica contra células bacterianas (TOKE, 2005; BHANDARI et al., 2020; KAZEMZADEH-NARBAT et al., 2021) e a seletividade para as membranas alvo é atribuída à presença de fosfolipídios ácidos em sua composição lipídica (SHAI, 1999; KAZEMZADEH-NARBAT et al. 2021).

¹ Antimicrobial Peptide Database. University of Nebraska Medical Center. Disponível em: <https://aps.unmc.edu/>. Acesso em: 27 de fevereiro de 2023.

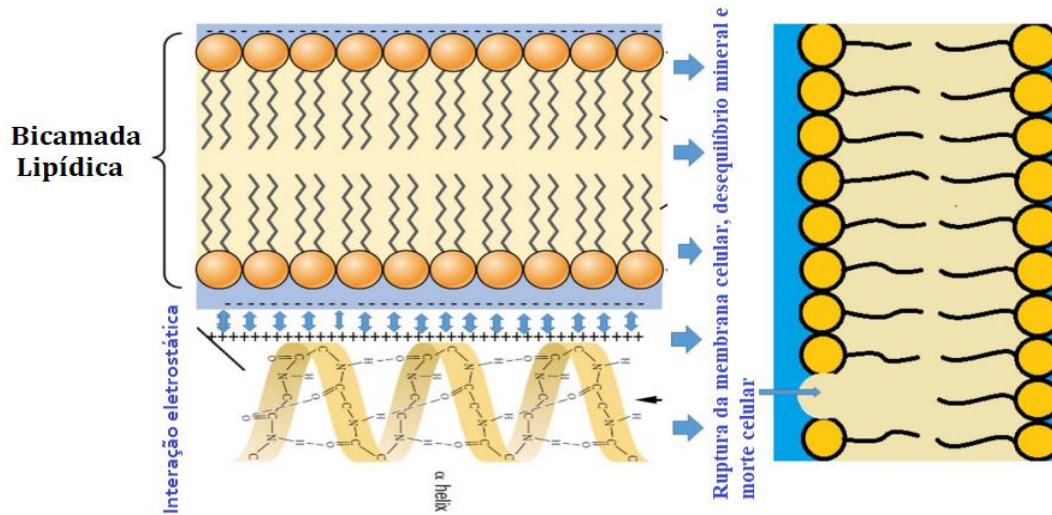
Desta forma, uma característica crucial dos AMPs é a presença de grupos catiônicos e anfipaticidade estrutural (PETRIN et al., 2019). A carga positiva dos AMPs é devido ao excesso dos aminoácidos arginina, lisina e histidina que possuem grupos R carregados positivamente, conforme visto na **Figura 3** (KAZEMZADEH-NARBAT et al., 2021). A amidação do C-terminal também contribui para o aumento da cationicidade dos AMPs, o que proporciona maior estabilidade *in vivo* e favorece a interação entre esses peptídeos e as membranas bacterianas (ZHU et al., 2021; MARTINS et al., 2020). Tendo em vista esses aspectos, as atividades biológicas dos AMPs estão relacionadas com a sua interação com a bicamada lipídica. Portanto, as interações eletrostáticas são responsáveis pela atração entre o peptídeo e a interface lipídica. Os peptídeos catiônicos assumem uma estrutura helicoidal nas proximidades da membrana e se acumulam na superfície da membrana bacteriana (SEO et al. 2012; KAZEMZADEH-NARBAT et al. 2021; BHANDARI et al. 2020). Esse acúmulo induz desequilíbrio, formação de poros e, finalmente, lise celular (SEO et al. 2012; BHANDARI et al. 2020).

Além disso, algumas propriedades biofísicas dos AMPs influenciam na sua ação antimicrobiana, entre elas estão: a hidrofobicidade média, a carga elétrica líquida e o ângulo da face polar (SLADE, 2014). Em contrapartida, as membranas celulares de mamíferos possuem colesterol e fosfatidilcolina, em que a característica zwitteriônica desses fosfolipídios diminui a interação com os AMPs (KAZEMZADEH-NARBAT et al. 2021). A **Figura 4** representa a interação eletrostática entre a bicamada lipídica e os AMPs e a formação de poros na membrana celular. O mecanismo de ação dos AMPs em solução é representado na **Figura 5**, sendo eles: ripas de barril (**Figura 5(a)**), poro toroidal (**Figura 5(b)**) e carpete (**Figura 5(c)**).

Apesar das inúmeras potencialidades descritas anteriormente de utilizar materiais a base de titânio como dispositivos implantáveis, existem alguns riscos de falha biológica do implante a longo prazo que propicia resultados clínicos negativos. Nesse sentido, uma das principais causas de falhas associadas a estes dispositivos é a infecção bacteriana (GODOY-GALLARDO et al., 2014). Em vista disso, os materiais implantáveis podem ser revestidos com os AMPs para proporcionar uma ação antimicrobiana no local do implante, no qual eles podem contornar problemas envolvidos com os processos imunológicos na interface implante/tecido que estão relacionados com a formação de biofilme bacteriano na superfície metálica (KAZEMZADEH-NARBAT et al., 2021). Resumidamente, o biofilme bacteriano pode ser definido como um conjunto de agregação de células bacterianas ligados a um substrato (GODOY-GALLARDO et al., 2014). De acordo com Kazemzadeh-Narbat et al. (2021) os AMPs são capazes de inibir a adesão de bactéria em estágios iniciais em uma superfície. Desta forma, os mecanismos

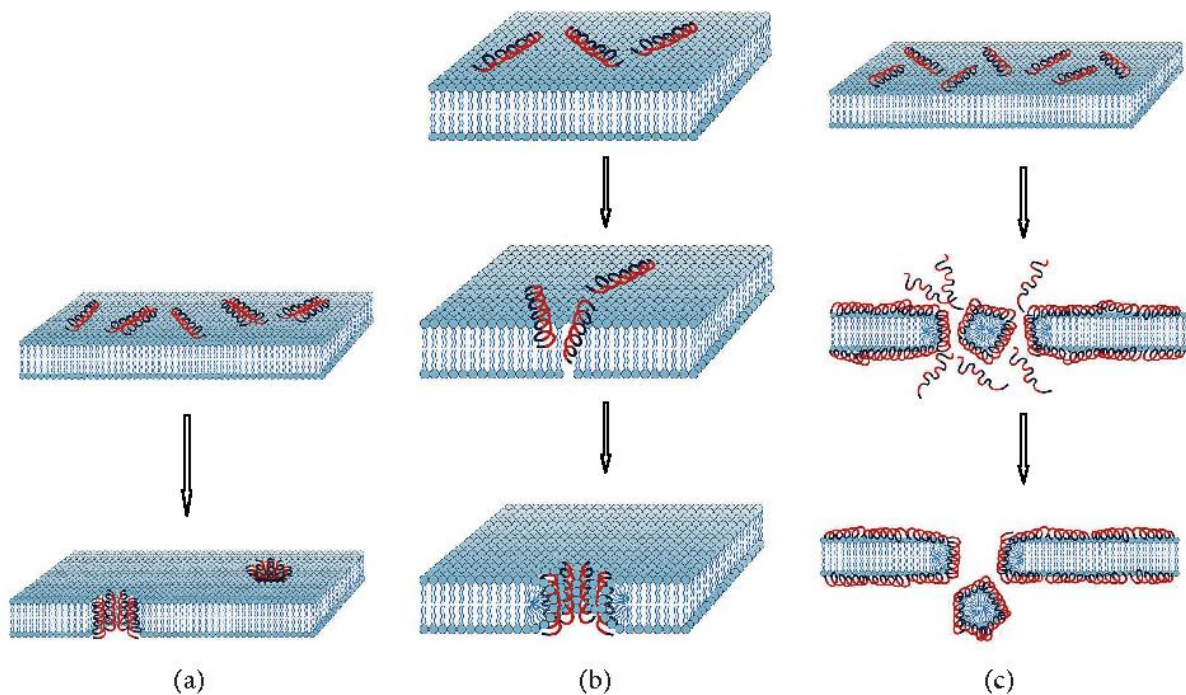
celulares envolvidos na prevenção contra a formação de biofilmes bacterianos proporcionados pelos AMPs estão representados na **Figura 6**.

Figura 4 – Esquema representativo da ação antimicrobiana de AMPs



Fonte: adaptado de Bhabdaril et al. 2019

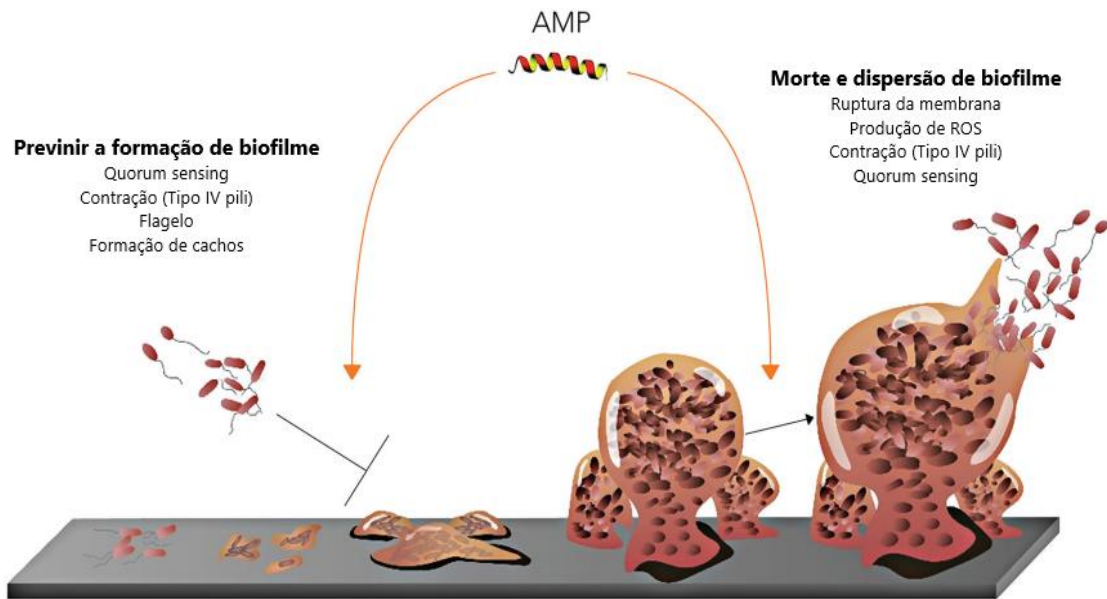
Figura 5 – Mecanismo de ação dos AMPs (a) ripas de barril (b) modelo toroidal (c) modelo de tapete



Fonte: Ebenhan et al. 2014

Nota: As regiões peptídicas de cor vermelha são hidrofílicas e as azuis hidrofóbicas.

Figura 6 – Prevenção contra a formação de biofilme dos AMPs



Fonte: adaptado de Kazemzadeh-Narbat et al. 2021

2.3 JELLEINES

Dentre os AMPs existem as Jelleines que compõem uma família de peptídeos, encontrada na geleia real, dotada de elevada ação antimicrobiana. A geleia real é uma secreção ácida produzida pelas abelhas operárias jovens. Especificamente, a geleia real é produzida nas glândulas hipofaríngea e mandibular desse animal (RAMANATHAN et al., 2018). Além disso, essa secreção é bastante nutritiva e rica em proteínas, vitaminas, minerais, entre outros (FONTANA et al., 2004). De acordo com Martins et al. (2020), a geleia real possui diversas outras propriedades terapêuticas além da atividade antimicrobiana, tais como: antitumoral, anti-inflamatória, cicatrização de feridas, entre outras. Desta forma, as quatro Jelleines originais isoladas da geleia real por Fontana et al. (2004) estão indicadas na **Tabela 2** abaixo, bem como as respectivas massas moleculares e sequências dessas biomoléculas.

Petrin et al. (2019) apresentaram uma estratégia de funcionalização de quitosana com diferentes peptídeos de cadeia de aminoácidos curta por meio de duas estratégias distintas, via grupos tiol e glutationa. Nesse sentido, um dos peptídeos utilizados neste estudo foi análogo ao AMP Jelleine-I (JI). Desta forma, ao utilizar membranas modelo que mimetizam bactérias de *S. aureus* e *E. coli*, os autores observaram que a funcionalização com os peptídeos aumentou a atividade antimicrobiana da quitosana, em relação ao material não funcionalizado. Outro aspecto importante, foi de que ao final dessa pesquisa obteve-se um biopolímero contendo a espinha dorsal da quitosana, Jelleine-I e glutationa.

Tabela 2 – Características dos peptídeos da família das Jelleines

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Massa Molecular (g mol ⁻¹)
Jelleine-I	PFKISIH _L -NH ₂	953.24
Jelleine-II	TPFKISIH _L -NH ₂	1054.30
Jelleine-III	EPFKISIH _L -NH ₂	1082.32
Jelleine-IV	TPFKISIH-NH ₂	942.13

Fonte: adaptado de Fontana et al. 2004

O peptídeo JIChis-2 (JI-2) é um análogo da Jelleine-I e sua sequência de aminoácidos foi desenhada pelo grupo da Professora Doutora Marcia Perez dos Santos Cabrera da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). A sequência de aminoácidos que compõe o JI-2 e a previsão de sua estrutura molecular simulada pelo PEP-FOLD² e visualizada pelo *software* PyMOL pode ser observada na **Figura 7**. A **Tabela 3** apresenta algumas propriedades físico-química deste peptídeo. Em suma, a modificação na sequência de AMPs geralmente é utilizada para reduzir a citotoxicidade e melhorar as propriedades antimicrobianas dessas biomoléculas. Substituições de lisinas para resíduos de arginina e de fenilalanina para triptofano tem se mostrado estratégias interessantes para o aprimoramento das propriedades dos AMPs. A arginina propicia interações mais fortes com os fosfolipídios aniônicos do que os resíduos de lisina, enquanto a presença do triptofano auxilia na fixação e inserção do peptídeo nas bicamadas lipídicas (CHAN et al., 2006).

As modificações que deram origem ao peptídeo JI-2 tiveram início com o estudo realizado por Martins e colaboradores (2020). Estes autores realizaram o desenho de dois análogos da JI, JIF2W (PWKISIH_L-NH₂) e JIF2WR (PWRISIRL-NH₂). Em ambos houve a substituição da Phe2 por Trp2 e, adicionalmente, foram realizadas as substituições com Lys3 e His7 resultando no peptídeo JIF2W e com Arg3 e Arg7 para resultar no JIF2WR. Em concordância com Chan et al. (2006), os autores verificaram que a presença das argininas e do triptofano propiciaram uma atividade biológica aumentada do peptídeo JIF2WR em relação aos outros peptídeos analisados. Além disso, Petrin et al. (2019) realizaram o desenho de outro análogo da JI, JIChis-1 (PWKISIH_LLAAC-NH₂), com o intuito de conjugá-lo com quitosana. Nesse caso, a modificação se baseou na inserção de um resíduo de Trp2, dois espaçadores de

² PEP-FOLD server. Disponível em: <https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>. Acesso em: 29 de maio de 2023.

Ala9 e Ala10 seguida de um resíduo de Cys11. A conjugação desse peptídeo com quitosana apresentou melhoras nas propriedades antimicrobianas em comparação com outros peptídeos. Tendo em vista esses aspectos, a sequência JI-2 foi obtida com a inserção dos dois espaçadores de Ala e a Cys11 no JIF2WR. Para então, alcançar uma atividade antimicrobiana ainda mais expressiva que a apresentada pela Jelleine-I e os análogos citados. A **Tabela 3** abaixo apresenta as propriedades de carga elétrica líquida e hidrofobicidade média do JI-2.

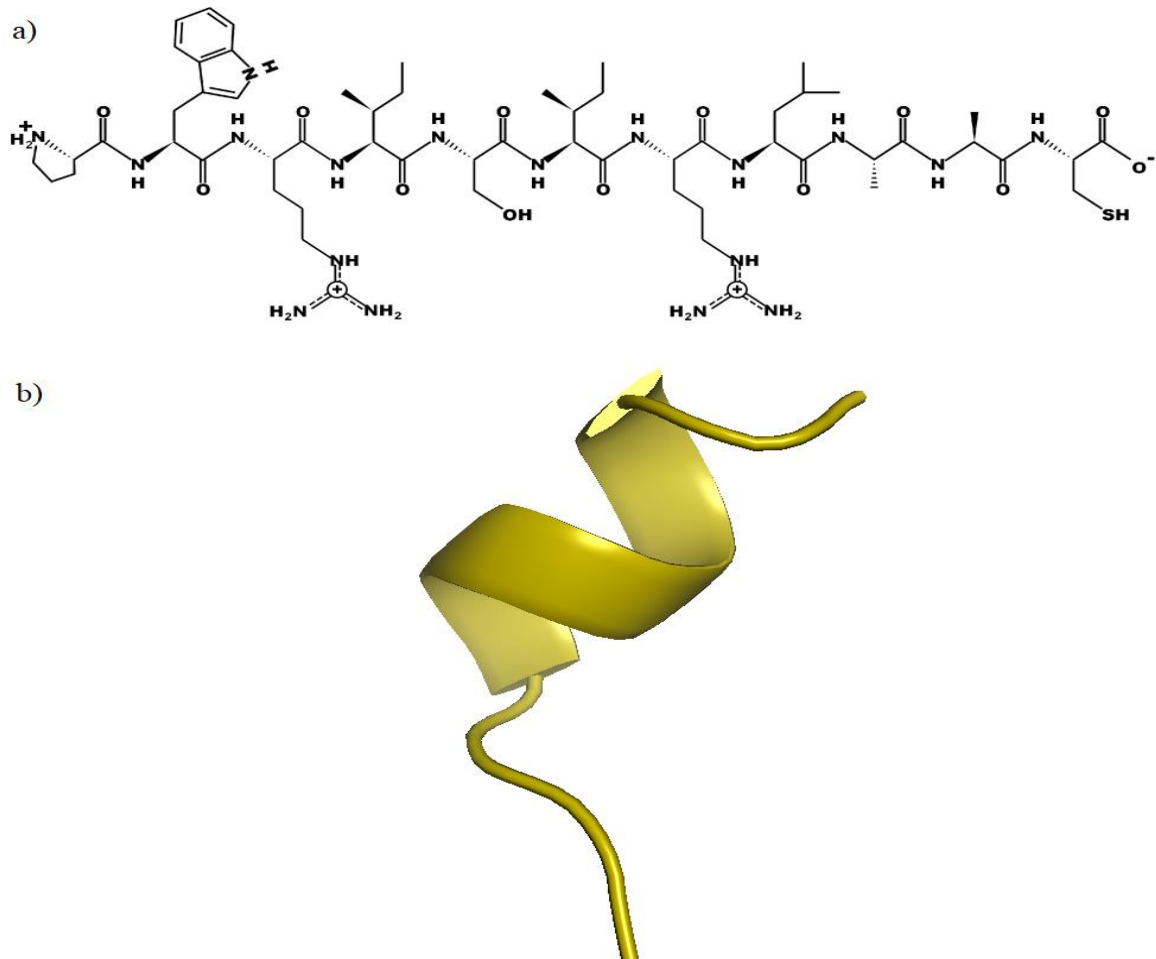
Tabela 3 – Propriedades do peptídeo JI-2

Peptídeo	Sequência de aminoácidos	Carga líquida em pH fisiológico	Massa molecular (g mol ⁻¹)	Hidrofobicidade média ⟨H⟩
JI-2	PWRISIRLAAC-NH ₂	+3	1284.59	-0.086

Fonte: elaborado pela autora, 2023

Nota: Hidrofobicidade média calculada segundo a escala de Eisenberg et al. 1984

Figura 7 – Estrutura molecular do peptídeo JI-2 (a) estrutura peptídica da JI-2 (b) estrutura helicoidal da JI-2 em pH neutro



Fonte: da autora, 2023

2.4 PANORAMA DA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES METÁLICAS COM PEPTÍDEOS BIOATIVOS

De acordo com Cobb (2010), os estudos pioneiros envolvendo aço inoxidável ocorreram nos séculos 18 e 19 com a identificação do cromo como elemento químico. Apesar disso, as ligas de aço inoxidável, entre outras, não foram desenvolvidas comercialmente até o início do século 20 (COBB, 2010; ANANTH et al., 2015). O uso de biomateriais como implantes foi impulsionado e as ligas de cobalto-cromo foram amplamente utilizadas em 1925 (ANANTH et al., 2015). Cerca de 25 anos depois, surgiram os primeiros estudos mostrando que as propriedades mecânicas dos materiais à base de titânio são superiores às observadas para cromo-cobalto e aço inoxidável (CIVANTOS et al., 2017). Desde então, sua introdução em procedimentos cirúrgicos tem sido bem-sucedida (CIVANTOS et al., 2017).

Conforme relatado por Seal et al. (1987), os estudos na área de biologia molecular foram impulsionados na década de 70 e 80. Naquela época, as propriedades dos sistemas biológicos, tecidos e conhecimento sobre a resposta celular foram significativamente compreendidas. Os avanços científicos e a experiência adquirida na área de biomateriais, quando os esforços se concentravam na substituição de órgãos, dão origem a estudos que visam combinar biomoléculas e biomateriais (SEAL et al., 1987). A partir disso, diversas pesquisas buscam incessantemente o aprimoramento de biomateriais metálicos para implantes. Em consonância a isso, a imobilização de peptídeos bioativos teve início no final do século passado, surgindo como alternativa potencial para aplicações biomédicas.

Na década de 1980, um conjunto de peptídeos de adesão celular foi identificado nas sequências de aminoácidos de importantes proteínas (KOIVUNEN et al., 1994). Esses peptídeos são capazes de se ligar a receptores de adesão celular e seu uso no revestimento de superfícies abriu um leque de oportunidades para aumentar a biocompatibilidade de biomateriais. Os peptídeos RGD e YIGSR pertencem a este grupo (PIERSCHBACHER et al., 1984). Desta forma, a sequência de aminoácidos RGD foi encontrada em uma variedade de proteínas de adesão celular, tais como: fibronectina, vitronectina e fibrinogênio (MASSIA; HUBBELL, 1990a). O pentapeptídeo YIGSR foi identificado na laminina, uma glicoproteína que compõe a lâmina basal e promove a adesão celular. Massia e Hubbell (1990a) realizaram a imobilização covalente desses peptídeos em vidro glicofásico na busca de contribuir para a melhoria da adesão celular em biomateriais utilizados para implantes. Além disso, os autores sugerem que sequências menores ligadas covalentemente provavelmente seriam mais estáveis à proteólise celular e degradação térmica (MASSIA; HUBBELL, 1990a). Os autores ressaltam

que o uso desses pequenos peptídeos é vantajoso em comparação a utilização de proteínas. Essa vantagem também foi enfatizada em um estudo posterior, em que esses mesmos autores imobilizaram o peptídeo RGD em filmes de polímeros de poli(hidroxietil metacrilato) e politereftalato de etileno (MASSIA e HUBBELL, 1990b). Para isso, uma glicina foi inserida no amino-terminal do peptídeo e realizou-se o método de imobilização do cloreto de tresil de Nilsson e Mosbach (1981). Embora essa estratégia também fosse elegível para a imobilização de proteínas inteiras, os resultados mostraram que as superfícies modificadas apresentaram características estáveis que promoveram a adesão específica de células de mamíferos. Nesse sentido, os estudos de Massia e Hubbell mostraram que, como alternativa ao uso de macromoléculas maciças suscetíveis aos fenômenos de proteólise, degradação e desnaturação de proteínas, os peptídeos curtos são suficientemente eficazes em funcionalização para promover a adesão celular (MASSIA; HUBBELL, 1990a, MASSIA; HUBBELL, 1990b). Nesse contexto, o polímero de poliuretano também foi utilizado em algumas pesquisas com peptídeos, pois apresenta boas propriedades mecânicas e compatibilidade sanguínea (LIN et al., 1992; LIN et al., 1994).

A partir desse momento, alguns pesquisadores se concentraram em utilizar peptídeos para funcionalizar superfícies metálicas agregando a elas as mais diversas propriedades (HERSEL et al., 2003). Em 1998, Xiao e colaboradores funcionalizaram o titânio com os peptídeos RGDC e GRGDSPC (XIAO et al., 1998). A superfície foi funcionalizada com um procedimento de reação de três etapas que envolveu **i)** silanização da superfície, **ii)** conexão de grupos amino primários livres para um agente reticulante e **iii)** imobilização dos peptídeos por meio de ligação covalente do grupo tiol (-SH). O trabalho mencionado acima focou na funcionalização e caracterização da superfície modificada. Os resultados mostraram que a silanização em superfícies de titânio é a etapa chave em termos de reprodutibilidade nas etapas de modificação subsequentes (XIAO et al., 1998). Isso permitiu ampliar o uso dessa técnica até então utilizada para modificações de superfícies de titânio com grupos terminais, tais como CH₃, OH e Br.

Em 1999, Ferris e seus colaboradores consideraram a falta de estudos sobre a influência das superfícies funcionalizadas em respostas celulares *in vivo* e realizou uma pesquisa para avaliar a formação de osso em titânio revestido com o peptídeo RGDC (FERRIS et al., 1999). Para isso, o método químico de ligação entre ouro e tiol foi escolhido para a imobilização do peptídeo. Assim, o material modificado foi implantado no fêmur de 23 ratos machos adultos. Segundo os autores, a cobertura de ouro na superfície e a inserção de cisteína no peptídeo formam substratos bioativos. Os resultados mostram que o material revestido com RGDC

aumentou a formação óssea em duas semanas quando comparado ao material base. Além disso, houve aumento da espessura óssea em quatro semanas. Assim, esta abordagem foi indicativa de que a imobilização de peptídeos em materiais metálicos poderia ser usada para melhorar e controlar as propriedades do implante dentro do organismo (FERRIS et al., 1999).

No final do século XX, inúmeros trabalhos investigaram a função e as contribuições de peptídeos específicos na interface biomaterial/célula. Basicamente, a maior parte destas pesquisas se concentraram em estudar essas interações principalmente em materiais como polímeros e vidros, conforme mencionado anteriormente. Por outro lado, a compreensão de como ocorreram os processos biológicos na funcionalização de superfícies metálicas apenas com peptídeos bioativos se intensificou no início dos anos 2000. Nesse sentido, de Giglio et al. (2000) modificaram superfícies de Ti de duas maneiras: (i) formação de filme fino de polipirrol para fornecer um revestimento quimicamente estável e (ii) imobilizar o peptídeo CGRGDSPK na superfície revestida via resíduo de cisteína para estimular o processo de osseointegração. De maneira geral, as superfícies funcionalizadas com o peptídeo tiveram aumento significativo na adesão osteoblástica em relação à superfície contendo apenas o polipirrol e com a lamínula de vidro utilizada como controle positivo.

Ainda no início dos anos 2000, algumas estratégias foram utilizadas para imobilizar peptídeos além da silanização, tais como: polimerização por plasma (SEO et al., 2010; VREULS et al., 2010), monocamada automontada, do inglês, *Self-assembled monolayers* (SAMs) (ZORN et al., 2010) e eletrodeposição de polietilenoglicol (PEG) (OYA et al., 2009). Com o avanço no desenvolvimento de novos materiais, pesquisas começaram a incluir AMPs na funcionalização de superfícies. Por exemplo, Gabriel et al. (2006) investigaram a possibilidade de imobilizar o AMP LL-37 ou LL-37 com resíduo de cisteína no N-terminal sobre titânio (Ti) via silanização. Para isso, um espaçador de PEG também foi inserido no sistema para promover uma atividade bactericida eficaz. Além disso, ensaios de detecção de fluorescência *in vitro* da atividade bactericida de superfícies modificadas e não modificadas foram realizados sob várias condições de imobilização. Assim, os substratos modificados contendo cisteína conjugada no N-terminal do peptídeo e o espaçador PEG mostraram atividade contra *E. coli*. Em contrapartida, as demais modificações propostas não apresentam morte bacteriana em relação ao material não modificado (GABRIEL et al., 2006). Makihira et al. (2010) realizou a funcionalização de uma superfície de titânio com o AMP JH819 via silanização. Esses autores investigaram as propriedades desse sistema na formação de *P. gingivalis* e na diferenciação de osteoblastos (MC3T3-E1). Com os resultados obtidos, os autores sugerem que a imobilização desse peptídeo pode ser uma estratégia para conferir

atividades antimicrobianas à superfície protegendo-a de infecções cirúrgicas e auxiliando no processo de osseointegração.

2.5 MÉTODOS DE FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES METÁLICAS COM PEPTÍDEOS BIOATIVOS

A imobilização de biomoléculas como peptídeos ou proteínas em materiais metálicos visa melhorar suas propriedades como biomateriais. Os substratos mais utilizados para esta finalidade são Titânio (Ti) e ligas de titânio, aços inoxidáveis, ouro (Au) e ligas de cobalto-cromo. A **Tabela 4** resume as informações sobre os métodos de funcionalização de superfícies metálicas com peptídeos, as aplicações e principais resultados encontrados na literatura.

Tabela 4 – Métodos de deposição de peptídeos bioativos em superfícies metálicas e os principais resultados obtidos pela literatura

Métodos	Peptídeos	Materiais	Aplicações	Principais resultados	Referências
Silanização	hLf1-11 (sintético)	Ti cp	Implantes dentários	Promoveu propriedades antibiofilme as superfícies	Godoy-Gallardo (2015)
	GL13K (sintético)	Ti (<i>Microgroove</i>)		Promoveu citocompatibilidade e atividade antibacteriana as superfícies	Zhou et al. (2015)
	Cys-Melimine (sintético)	Ti cp	Implantes Cirúrgicos	Reduziu a reação inflamatória	Zhou et al. (2017)
	MAG II (sintético)	Ti		Promoveu propriedades antibiofilme as superfícies	Chen et al. (2016)
Silanização e adsorção física	MAG II (sintético)	Aço inoxidável AISI 304	Implantes médicos, casco de navio e indústria alimentícia	Promoveu propriedades antibiofilme as superfícies	Cao et al. (2018)
	hLf1-11 (sintético)	Ti cp	Implantes dentários	Promoveu propriedades antibiofilme à superfície e biocompatibilidade com fibroblastos	Godoy-Gallardo (2014)
	CAAALLLKERGDSK (sintético)	Ti Anodizado	Implantes Cirúrgicos	Melhora a osseointegração	Ryu et al. (2013)
	K3G4RGDS e K3G4PHSRN (sintético)	Ti cp		Revestimento estável, a co-imobilização dos dois peptídeos melhorou a resposta osteoblástica	Chen et al. (2013)
	GL13K (sintético)	Ti cp	<i>Stents</i>	Promoveu citocompatibilidade e atividade antibacteriana a superfícies	Holmberg et al. (2013)
	RGDS e YIGSR (sintético)	CoCr		A combinação equimolar de peptídeos melhora a endotelização das superfícies	Castellanos et al. (2017a)
Silanização, Eletrodeposição de PEG e polimerização a plasma	RGDS, REDV e YIGSR (sintético)				Castellanos et al. (2017b)
	RGD (sintético)	Ti cp	Implantes dentários	Os revestimentos diminuíram a absorção de albumina e melhoraram as propriedades antimicrobianas	Buxadera-Palomero et al. (2017)
SAMs	RGDC (sintético)	Ti45Nb	Implantes Cirúrgicos	Melhora a osseointegração	Zorn et al. (2007)
	RGDC e RDGC (sintético)	Ti cp	Implantes dentários	Promoveu a adesão de osteoblastos nas superfícies	Huang et al. (2003)
	Magainin I (sintético)	Au	Dispositivos diversos	Promoveu atividade antimicrobiana as superfícies	Humblot et al. (2009)
Adsorção física	Pac-525 Derivatives (sintético)	Au	Implantes Cirúrgicos	Promoveu atividade antimicrobiana as superfícies e permitiu a proliferação de células-tronco da medula óssea	Zhang et al. (2021)
	VnP-16 (sintético)	Ti	Implantes dentários	Melhora a osseointegração	Cho et al. (2019)
	Nisin (sintético)	Ti-6Al-4V-ELI	Implantes ortopédicos	Liberção gradual do peptídeo sob condições fisiológicas e inflamatórias, o revestimento mostrou desempenho antiincrustante	Lallukka et al. (2022)
Eletrodeposição de PEG	RGD (sintético)	Ti (cp)	Implantes dentários	Melhora a osseointegração	Park et al. (2011)
	RGD (sintético)	Ti (cp)	Implantes Cirúrgicos	Melhora a osseointegração	Oya et al. (2009)
Polimerização a plasma	RGD (sintético)	Ti (cp)	Implantes Cirúrgicos	Melhora a osseointegração	Seo et al. (2010)
	Nisina, Trp11 e 4K-C16 (sintético)	304 2B	Dispositivos biomédicos	Promoveu propriedades antibiofilme as superfícies	Vreuls et al. (2010)
Dopamina	MAG II (sintético)	Aço inoxidável 304	Casco de navios	Promoveu atividade antimicrobiana as superfícies	Cao et al. (2020a)
	QAGSNKGASQKGMS (sintético)	Aço inoxidável		Promoveu atividade antimicrobiana as superfícies	Cao et al. (2020b)
	BMP-7 (sintético)	Aço inoxidável 304	Implantes Cirúrgicos	O revestimento mostrou desempenho antiincrustante	Cao et al. (2022)
		CoCr	Implantes Cirúrgicos	Promoveu atividade antifibrótica	Tan et al. (2013)

Fonte: da autora, 2023

2.5.1 Método de silanização

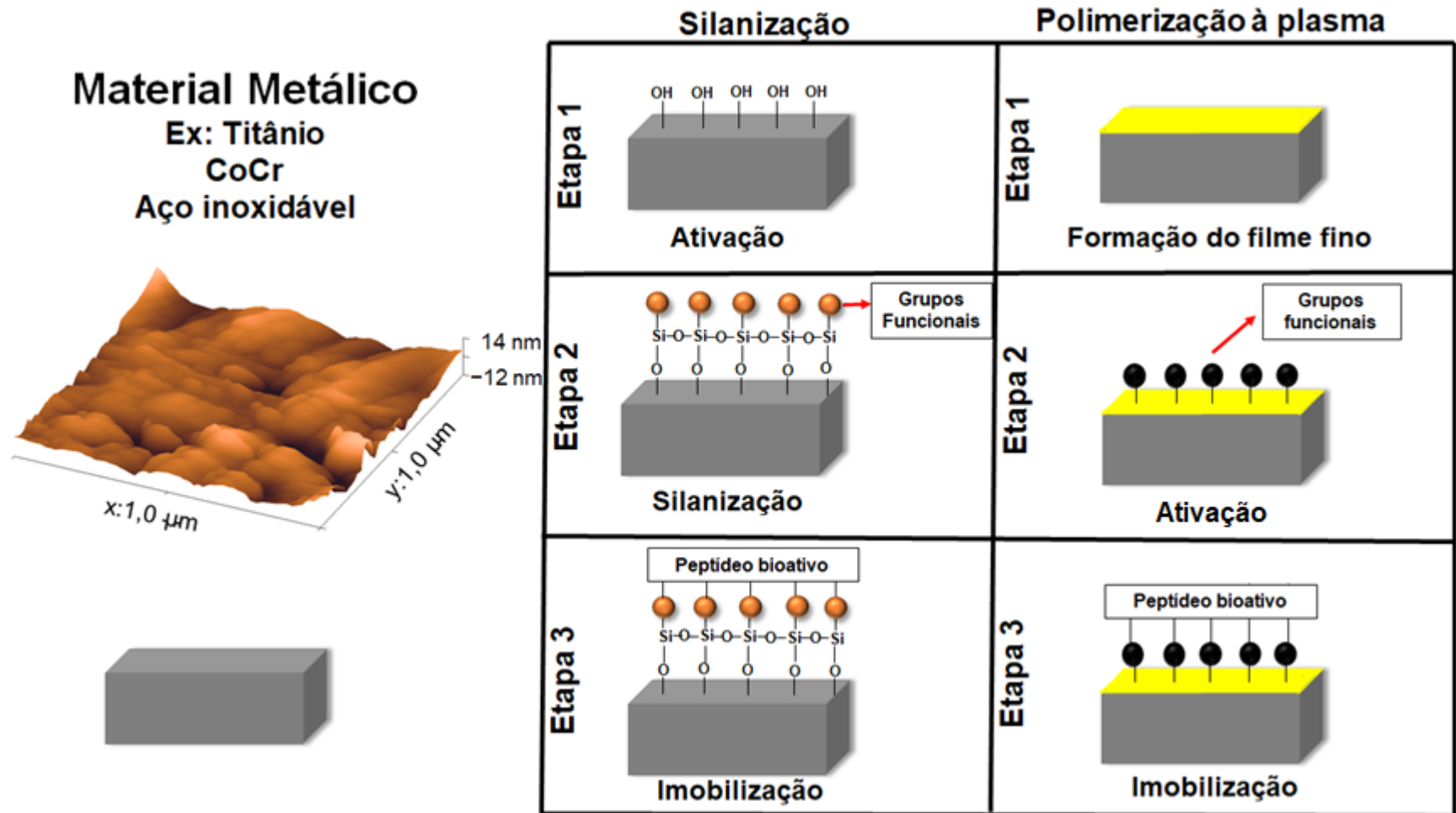
A silanização é um método bioquímico que permite a imobilização de peptídeos bioativos e outras biomoléculas em superfícies metálicas (CHEN et al., 2013). Assim, esta técnica permite obter superfícies nas quais a biomolécula é ligada covalentemente. Uma estratégia para ancorar a biomolécula de interesse é usar alcoxissilanos organofuncionais que interagem com grupos hidroxila presentes na superfície do metal (GODOY-GALLARDO et al., 2015). Nessa técnica, não há limitações na escolha dos metais para realizar a silanização, mas sua eficiência pode estar relacionada com a sinergia entre a superfície do material e os grupos organofuncionais. Recorrentemente, os grupos funcionais orgânicos 3-(cloropropil)-trietoxissilano (CPTES) e/ou (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES) são utilizados em metais como CoCr, aço inoxidável e Ti. Em geral, os métodos de silanização para imobilizar peptídeos são realizados em três etapas: a ativação de superfície (**etapa 1**), a reação de silanização (**etapa 2**) e a imersão da superfície em solução de peptídeo (**etapa 3**), **Figura 8**. Na silanização, a presença de grupos hidroxila na superfície do substrato é de grande importância para promover a interação com os grupos metoxi e etoxi dos silanos. Além disso, a ativação da superfície pode ser realizada por ataque alcalino, tratamento com plasma, entre outros. O ataque alcalino se destaca com o uso de soluções 5 mol L^{-1} de NaOH para Ti e CoCr (CASTELLANOS et al., 2017b; GODOY-GALLARDO et al., 2014). Após a ativação, os silanos reagem com a superfície metálica contendo as hidroxilas (Si-OH), e o grupo funcional orgânico é capaz de interagir com o peptídeo bioativo promovendo a ligação covalente. Algumas pesquisas também inserem um *crosslinker* bifuncional entre os silanos e os peptídeos para garantir a reatividade química e promover a ligação de biomoléculas (CASS et al., 1998).

O processo de silanização afeta algumas características superficiais de metais em diferentes estágios de funcionalização, nos quais é possível verificar alguns padrões na literatura (CHEN et al., 2013; HOLMBERG et al., 2013; GODOY-GALLARDO et al., 2014; ZHOU et al., 2015). A **etapa 1** resulta em uma superfície mais hidrofílica do que o material base. De acordo com Chen et al. (2013), isso se deve à alta polaridade atribuída pelos grupos OH que se formam na superfície metálica após a ativação. Além disso, após a **etapa 2**, os valores do ângulo de contato geralmente são aumentados em relação à **etapa 1**, podendo permanecer menores, próximos ou até maiores do que o material base. Entretanto, a molhabilidade da superfície funcionalizada na **etapa 3** é dependente do peptídeo escolhido no estudo e sua respectiva hidrofiliabilidade. Além disso, o ataque alcalino, silanização e posterior imobilização podem causar aumento da rugosidade da superfície metálica. Entre as vantagens

do uso da silanização estão a obtenção de imobilização via ligação covalente, termoquimicamente e mecanicamente estável para uma variedade de metais e organossilanos (HOLMBERG et al., 2013; CHEN et al., 2013; ZHOU et al., 2015). No entanto, a etapa de ativação pode ser considerada um obstáculo, pois existem outros métodos que não requerem esta etapa.

A silanização tem sido amplamente utilizada na biofuncionalização de metais com peptídeos, o que provavelmente pode estar relacionado à estabilidade da interação peptídeo-superfície e à simplicidade de sua atuação (CASS et al., 1998; HOLMBERG et al., 2013; GODOY-GALLARDO et al., 2014; ZHOU et al., 2015). Godoy-Gallardo et al. (2014), desenvolveram uma superfície antimicrobiana, em que o AMP hLf1-11 foi imobilizado em titânio via silanização e adsorção física. Os autores realizaram estudos de morfologia, rugosidade e molhabilidade para entender como as mudanças na superfície metálica afetam esses parâmetros. Em relação ao material base, a rugosidade superficial aumentou após tratamento com NaOH, silanização e imobilização do AMP na superfície. Desta forma, foi verificado que superfícies funcionalizadas com AMP melhoram as propriedades antimicrobianas do titânio, pois inibem a fixação e formação de biofilme, principalmente para dois tipos de microorganismos presentes no biofilme oral (*S. sanguinis* e *L. salivarius*) (GODOY-GALLARDO et al., 2014). Cao et al. (2018) também tiveram sucesso ao usar a silanização para imobilizar um AMP, Maginin 2, em superfícies de aço inoxidável. O peptídeo foi ligado covalentemente ao metal resultando em uma superfície hidrofílica com atividade contra a formação de biofilme de *E. coli* e *S. aureus*. Em outra perspectiva, Castellanos et al. (2017b) projetaram três peptídeos para funcionalizar superfícies de CoCr e melhorar as propriedades de endotelização de dispositivos cardiovasculares. Dentre esses estudos, é possível notar que o uso de espaçadores pode ser uma estratégia interessante para separar a sequência peptídica do material revestido e expor efetivamente a sequência bioativa. Além disso, é possível perceber que o uso da técnica de Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X, do inglês, *X-ray Photoelectron Spectroscopy* (XPS) constitui uma ferramenta valiosa na verificação da imobilização dos peptídeos citados, permitindo avaliar o aumento dos teores de nitrogênio, carbono e oxigênio na superfície após a imersão do peptídeo (HOLMBERG et al., 2013; RYU et al., 2013; CHEN et al., 2013; GODOY-GALLARDO et al., 2014; ZHOU et al., 2015; CASTELLANOS et al., 2017b; ZHOU et al., 2017; CAO et al., 2018). No caso do uso do organossilano CPTES, o XPS é capaz de mostrar o aumento dos picos de cloro e silício em amostras silanizadas e, conseqüentemente, uma redução desses sinais em amostras contendo peptídeos (ZHOU et al., 2015, ZHOU et al., 2017, CASTELLANOS et al., 2017b).

Figura 8 – Esquema representativo da imobilização de peptídeos em superfícies metálicas por silanização sem moléculas reticulantes e polimerização por plasma



Holmberg et al. (2013) exploraram a estabilidade de superfícies de Ti funcionalizadas com peptídeos distintos GL13K e GK7-NH₂ por silanização. Esses autores avaliaram a perda de peptídeos por análises de molhabilidade após sonicação e também após 8 dias de imersão em PBS. Depois disso, as superfícies permaneceram mais hidrofóbicas do que o material de base ativado, no entanto, as taxas de retenção foram dependentes do número de sítios livres para a ligação do peptídeo à superfície.

Em relação ao mecanismo de ação dos peptídeos imobilizados, não há na literatura uma investigação aprofundada. Mas é possível notar que o mecanismo de base é semelhante ao apresentado pelos peptídeos em solução, sejam eles AMPs ou peptídeos adesivos celulares. Assim, é essencial garantir que a região ativa esteja disponível para interagir com o sistema alvo. Além de funcionalizar um material, é possível utilizar a imobilização como estratégia para promover a proteção do peptídeo da degradação enzimática e assim potencializar sua ação (HOLMBERG et al., 2013).

2.5.2 SAMs

A técnica de SAMs também são úteis para a funcionalização de superfícies metálicas com peptídeos bioativos. A estrutura dos SAMs é composta por um grupo principal ligado a uma superfície metálica, um grupo espaçador que possui a característica de ordenamento molecular e um grupo final que pode ser utilizado para a imobilização de biomoléculas (SINGH et al., 2020). Os grupos funcionais reativos de SAMs podem ser -COOH, -OH e NH₂ (KAUFMANN et al., 2010). Na imobilização de peptídeos, os SAMs podem conter tiol e alquilfosfato (ZORN et al., 2007; HUANG et al., 2003), além de grupos organosilanos. As monocamadas automontadas e altamente ordenadas são formadas espontaneamente no substrato metálico (ULMAN, 1996; BEUTNER et al., 2010; SINGH et al., 2020). Além disso, moléculas como fosfatos e fosfonatos possuem alta afinidade por óxidos metálicos, permitindo seu uso como grupos de ancoragem para a imobilização de biomoléculas em superfícies metálicas (BEUTNER et al., 2010). Nesse sentido, Zorn et al. (2007) realizaram a enxertia do peptídeo **RGDC** na liga Ti45Nb através de uma monocamada aquifosfônica para aplicações em implantodontia. O processo de biofuncionalização do material metálico consistiu em duas etapas, sendo: **(i)** inserção e automontagem do ácido alquilfosfônico na superfície do material e **(ii)** reação cloreto de acetila do ácido alquilfosfônico com o grupo tiol no terminal do peptídeo contendo o resíduo de cisteína. Segundo os autores, os grupos fosfônicos estavam em uma configuração voltada para o substrato metálico e as caudas dos grupos finais de cloreto de

acetila voltadas para a superfície livre. As medições do ângulo de contato mostraram que o revestimento com SAMs de cloreto de acetila tornou a superfície mais hidrofóbica em comparação com o material não funcionalizado. Além disso, estudos de cultura celular mostraram que a superfície metálica funcionalizada com o peptídeo proporcionou maior adesão de osteoblastos (ZORN et al., 2007).

Huang et al. (2003) também usaram SAMs para imobilizar dois peptídeos distintos, RGDC e RDGC, em superfícies de Ti. Através desta estratégia ficou evidente que a ação do peptídeo imobilizado não depende apenas de sua composição química, mas também de sua estrutura. Da mesma forma que a silanização, a orientação do peptídeo enxertado na superfície depende da escolha dos grupos funcionais e da posição dos sítios reativos do peptídeo, a fim de garantir que ele seja capaz de se estruturar adequadamente. Nos exemplos citados (ZORN et al., 2007; HUANG et al., 2003), a presença do resíduo de cisteína no final do peptídeo disponibilizou o domínio RGD para atuar como receptor de integrinas, permitindo que o peptídeo exerça sua função de adesão celular.

A técnica de SAMs também foi utilizada para imobilizar AMPs como Magainin 1 e peptídeo derivado de Pac-525 em superfícies de ouro preservando as atividades antimicrobianas dos peptídeos (HUMBLOT et al., 2009, ZHANG et al., 2021). Dentre eles, Humblot et al. (2009) verificaram que não há liberação do peptídeo (Magainina 1) após a realização dos ensaios biológicos, o que demonstrou a estabilidade da imobilização do peptídeo por este método. Apesar dessa vantagem, possivelmente a necessidade de um resíduo de cisteína no terminal peptídico possa limitar um pouco seu uso.

2.5.3 Adsorção física

A adsorção física é um processo de funcionalização reversível, simples e de baixo custo, no qual biomoléculas são imobilizadas na superfície metálica por meio de interações fracas (van der Waals, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas) (RYU et al., 2013; SANDHYRANI, 2019). No entanto, esse método fornece um revestimento mecanicamente instável com baixa quantidade de peptídeo imobilizado na superfície quando comparado a métodos de imobilização covalente, como a silanização (HOLMBERG et al. 2013; GODOY-GALLARDO et al., 2014; ZHOU et al., 2015). Geralmente, o processo envolve a introdução do metal na solução do peptídeo, que é armazenada por algumas horas ou dias em condições pré-estabelecidas para imobilização, seguida de enxágue e secagem das superfícies para remover qualquer peptídeo não imobilizado.

Cho et al. (2019) usaram adsorção física para funcionalizar Ti cp com peptídeo VnP-16 em implantes dentários. As superfícies metálicas foram revestidas com a solução de peptídeo e secas por 7 dias sob vácuo à temperatura ambiente. Os autores utilizaram espectroscopia de elétrons para análise química, do inglês, *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis* (ESCA) e confirmaram a imobilização de peptídeos a partir da observação de maiores teores de nitrogênio nas superfícies funcionalizadas em relação às não funcionalizadas. Testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que as superfícies com VnP-16 aumentaram a resposta óssea inicial dos implantes (CHO et al., 2019). Comumente, estudos que utilizam adsorção física para imobilizar peptídeos em superfícies metálicas adotam outro método como foco principal dos trabalhos. Ryu et al. (2013) utilizaram métodos de silanização e adsorção para imobilizar o peptídeo CAAALLLKERGDSK em discos de Ti anodizados para aplicações em implantologia. A adsorção ocorreu por imersão dos discos na solução peptídica e posterior secagem, no qual a adesão celular foi significativamente reduzida para as amostras funcionalizadas por adsorção física em comparação com as silanizadas (RYU et al., 2013).

Recentemente, Lallukka et al. (2022) realizaram a adsorção do peptídeo nisina em discos Ti6Al4V-ELI em busca do desenvolvimento de um material biocompatível e antibacteriano. O processo de funcionalização foi realizado em diferentes valores de pH (pH = 5/6/7). A adsorção de peptídeos foi evidenciada por um conjunto de técnicas incluindo EDX e XPS, revelando que a funcionalização em pH 6 foi mais eficiente. Além disso, a funcionalização realizada no referido pH favoreceu a configuração da nisina compatível com aquela responsável por sua ação antimicrobiana, em que sua cauda hidrofóbica fica exposta, maximizando a fisissorção por atração eletrostática. A liberação gradual de nisina foi avaliada *in vitro* considerando as condições fisiológicas e inflamatórias, além disso, seu desempenho antibacteriano revelou uma promissora atividade antimicroincrustante contra a cepa *S. aureus*. Diferentemente da silanização ou SAMs, a adsorção física não envolve o estabelecimento de uma reação química específica entre o peptídeo e a superfície. Como consequência, estratégias adicionais como a variação do pH demonstrada por Lallukka et al. (2022), devem ser consideradas na tentativa de obter uma orientação preferencial do peptídeo na superfície metálica. Além disso, o mecanismo de ação pelo qual o peptídeo adsorvido irá atuar pode diferir daqueles imobilizados covalentemente devido à sua mobilidade extra que pode permitir sua difusão no meio circundante.

2.5.4 Eletrodeposição de PEG

O polietilenoglicol (PEG) é uma molécula polimérica funcional que permite a funcionalização de superfícies metálicas com peptídeos bioativos. Além disso, as moléculas de PEG permitem melhorar as superfícies metálicas em termos de resistência à adsorção de proteínas não específicas (TANAKA et al., 2010). Para promover a imobilização, é necessário adicionar dois grupos funcionais, um ligado à camada de óxido do metal e outro ligado ao peptídeo bioativo. Geralmente, para funcionalizar o substrato metálico com PEG, utiliza-se um potenciostato/galvanostato, uma célula eletroquímica e o eletrólito. Nesse sentido, o PEG contendo os grupos funcionais é utilizado como eletrólito e durante o processo de eletrodeposição o polímero migra para o cátodo, ou seja, para o material metálico de estudo. Além disso, a eletrodeposição de PEG é considerada um método de funcionalização rápido (BUXADERA-PALOMERO et al., 2017) e foi utilizada por Oya et al. (2009) para imobilizar peptídeo RGD em titânio. Para estratégias semelhantes, o PEG deve conter grupos funcionais $-NH_2$ e $-COOH$ na tentativa de proporcionar ligações estáveis entre o PEG e a camada de óxido do material metálico e permitir a imobilização da biomolécula, respectivamente.

Para aplicações em implantes dentários, Park et al. (2011) avaliaram a eficácia das propriedades de cicatrização óssea *in vivo* de uma superfície de titânio biofuncionalizada com o peptídeo RGD via eletrodeposição de PEG. Os terminais $-NH_2$ e $-COOH$ do PEG foram usados, pois esses grupos migram eletricamente para o cátodo (titânio). Posteriormente, as superfícies de Ti contendo PEG foram imersas em solução de peptídeo. Os resultados indicaram que a imobilização do peptídeo foi capaz de melhorar a cicatrização óssea do material metálico implantável.

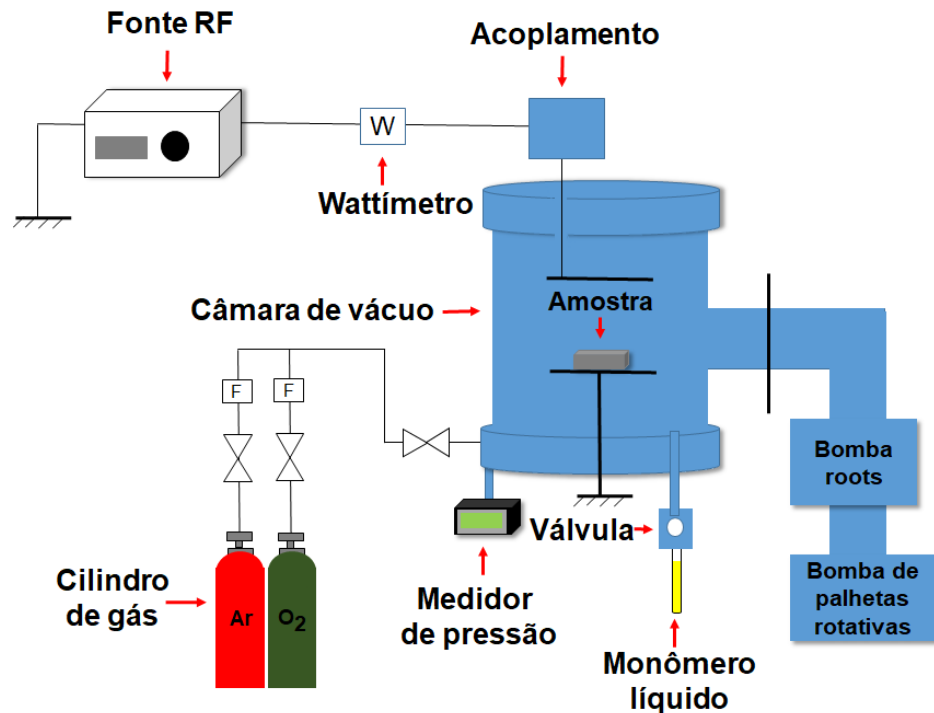
2.5.5 Polimerização a plasma

A polimerização por plasma é um método potencial de funcionalização de superfícies metálicas com peptídeos bioativos, principalmente em aplicações na área da saúde (VREULS et al., 2010). Essa estratégia permite revestir a superfície metálica com polímeros contendo grupos funcionais específicos, proporcionando uma futura imobilização covalente entre esses grupos e a biomolécula de interesse. Especificamente, o uso de monômeros como o ácido acrílico (AA) permite um revestimento hidrofílico contendo grupos carboxílicos ($COOH$) que podem ser obtidos por descarga luminescente de plasma para formar um filme polimérico fino

na superfície (LOPEZ et al., 2005; SEO et al., 2010). Em geral, os métodos de polimerização por plasma para imobilizar peptídeos podem ser realizados em três etapas, sendo elas: **(i)** polimerização a plasma, **(ii)** ativação de grupos funcionais e **(iii)** imobilização do peptídeo bioativo. Em relação à primeira etapa, o tratamento com plasma é utilizado para formar filmes finos na superfície do substrato e, conseqüentemente, enriquecê-lo com os grupos funcionais responsáveis por estabelecer as ligações covalentes entre o peptídeo e o material. Na segunda etapa, esses grupos funcionais são ativados por meio de uma solução de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida e N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS), por exemplo. Por fim, na terceira etapa, as amostras são imersas em solução peptídica para realizar as ligações covalentes para completar o processo de imobilização. Esta técnica gera superfícies modificadas com muitos grupos ativos, ao contrário das obtidas por síntese química (silanização) que gera um menor grau de ligações (**Figura 8**).

A deposição por plasma para a polimerização de AA, como outros monômeros, ocorre a partir de descargas incandescentes (LOPEZ et al. 2005). Além disso, algumas metodologias propõem estratégias experimentais adicionais para a ativação de grupos carboxila (ou outros grupos funcionais) e posterior imobilização do peptídeo pelo terminal amida (-NH₂). Nesse sentido, uma vantagem interessante dos métodos de polimerização a plasma é a capacidade de ajustar a composição química da superfície a ser funcionalizada (LOPEZ et al., 2005). A técnica PECVD proporciona a formação de filmes finos que apresentam alta reticulação em suas cadeias poliméricas. Em suma, a técnica PECVD pode ser descrita de forma simplificada: em um sistema mantido no vácuo, gases e outros precursores (monômeros) na fase vapor são ionizados por radiofrequência, micro-ondas ou descarga de corrente contínua, do inglês, *direct current* (DC). Nesse processo, íons e elétrons formados na descarga luminescente colidem com as moléculas do monômero, gerando radicais livres e fragmentos moleculares, que podem reagir entre si, ainda na fase vapor (ou após adsorvidos no substrato), gerando moléculas estáveis, ou permanecendo como radicais livres no filme já formado, resultando em filmes com alto grau de reticulação e grupos funcionais resultando em estruturas adequadas para aplicações como materiais biocompatíveis (d'AGOSTINO, 1990). A **Figura 9** mostra em detalhes um exemplo de um aparato PECVD experimental usado para deposição de filmes finos em superfícies metálicas. Ademais, formação do filme fino formado pode ser caracterizada morfolologicamente e estruturalmente pelas seguintes técnicas: AFM, MEV, EDX, XPS, FTIR), entre outros. Além disso, essas técnicas também podem ser úteis para identificar a presença de peptídeos na superfície metálica, independentemente dos métodos de imobilização (VREULS et al., 2010; SEO et al., 2010).

Figura 9 – Detalhes do método de polimerização a plasma em superfícies metálicas



Fonte: da autora, 2023

2.5.6 Dopamina

A dopamina é um composto que atua em diversas regiões do cérebro humano e sua ação afeta diretamente o sentido das emoções, essa substância também pode ser encontrada e extraída de mexilhões (CAO et al., 2020a). Para uso em ambientes aquáticos, os métodos de funcionalização de superfície com dopamina utilizando peptídeos bioativos são versáteis e aplicáveis (CAO et al., 2020b). Além disso, a modificação de superfícies com dopamina é um método químico interessante, pois esse composto possui vários grupos funcionais, como: catecol e amida (LEE et al., 2007). Visto que, fornece uma adesão estável devido à formação de ligações covalentes, bem como interações não covalentes entre substratos e os grupos catecol. Portanto, dispensa o uso de reações químicas tão elaboradas como nos métodos de silanização, SAMs e polimerização a plasma.

O uso da dopamina é baseado na copolimerização com hexametildiamina gerando uma superfície contendo aminas primárias para se ligar com grupos carboxílicos de biomoléculas (BEKMURZAYEVA et al., 2018). Para melhorar os métodos de funcionalização da polidopamina, pesquisas recentes apresentam estratégias para usar peptídeos sintéticos contendo DOPA (3,4-Dihidroxi-L-fenilalanina), um composto encontrado na proteína do pé de

mexilhão. Assim, a DOPA pode ser usada como uma molécula adesiva para imobilizar efetivamente moléculas em superfícies metálicas (CHEN et al., 2021).

Em consonância com isso, Cao et al. (2020a) compararam a imobilização do AMP Magainin 2 na superfície de aço inoxidável 304 com DOPA através de duas estratégias: **i)** pelo revestimento da superfície metálica com dopamina seguido de imobilização de peptídeo e **ii)** realizando a combinação molecular entre a dopamina e o peptídeo e depois ligando o conjunto DOPA-peptídeo à superfície. Os estudos antibacterianos mostraram que as superfícies funcionalizadas são resistentes contra a bactéria *V. natriegens* em ambas as modificações, mas a estratégia envolvendo o conjunto DOPA-peptídeo se mostrou mais eficaz devido ao fato que os peptídeos estão distribuídos de forma mais uniforme ao longo da superfície. Cao et al. (2022) também imobilizaram AMP (QAGSNKGASQKGMS) via funcionalização de dopamina para combater a bioincrustação na superfície do aço inoxidável 304. Esta imobilização consistiu em reagir os monômeros de dopamina com o peptídeo e usar o EDC para melhorar a taxa de peptídeo imobilizado nas amostras. Após este processo, o aço inoxidável 304 foi inserido na solução para sua funcionalização. Além dos testes biológicos que revelaram que a superfície funcionalizada possui ações anti-incrustantes, os testes eletroquímicos mostraram que ela também foi capaz de reduzir a taxa de corrosão em comparação com o material não tratado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar a imobilização do peptídeo antimicrobiano JI-2, análogo da Jelleine-I, em superfícies metálicas (Ti-6Al-4V) utilizadas em dispositivos dentários (*brackets* e/ou implantes) para a melhoria da capacidade de utilização dos mesmos em aplicações biomédicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Funcionalizar as superfícies com peptídeo, por meio do revestimento com ácido acrílico via PECVD;
- Caracterizar morfológicamente e estruturalmente as superfícies funcionalizadas com peptídeo e não funcionalizadas;
- Verificar a estabilidade termodinâmica das superfícies metálicas funcionalizadas através de curvas de OCP em solução de NaCl;
- Compreender o comportamento eletroquímico das superfícies funcionalizadas em solução de NaCl via EIS para diferentes tempos de imersão;
- Realizar ensaios biológicos para investigar as propriedades antimicrobianas do peptídeo e atividade antibiofilme das superfícies.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Essa seção apresenta os materiais utilizados no presente trabalho, bem como as etapas realizadas: preparação, funcionalização, caracterização das superfícies, ensaios eletroquímicos e ensaios biológicos.

4.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados foram: liga Ti-6Al-4V, 95,0% peptídeo Chitprobe-2 (CAAWR-NH₂), 96,1% de peptídeo JI-2 (PWRISIRLAAC-NH₂) fornecido pela GenScript, 99,0% de Ácido Acrílico (C₃H₄O₂) da TCI América, Inc., 99% de N-Hidroxissuccinimida (NHS) e 99% de Cloridrato de (1-etil-3- [3 dimetilaminopropil] carbodiimida) (EDC) ambos fornecidos pela Oakwood Chemical, Fluoreto de sódio (NaF), Cloreto de Sódio (NaCl), Tampão fosfato-salino (PBS) e Argônio 99,99% puro da White Martins.

4.2 PREPARAÇÃO DAS SUPERFÍCIES

O primeiro passo desta pesquisa consistiu em preparar as amostras de Ti-6Al-4V nas condições como recebidas. Os espécimes utilizados no presente trabalho apresentam dimensões de 1,5 x 1,5 cm e foram obtidos via eletroerosão. Com o intuito de obter uma superfície com o menor número possível de defeitos superficiais, as amostras foram lixadas e polidas mecanicamente. O processo de lixamento foi realizado com o auxílio de lixas de carbetto de silício (SiC) na sequência de 800, 1200, 2500 e 4000 *mesh*. O acabamento superficial foi finalizado com pastas de diamante (*Buehler Metadi Diamond Suspension*) na granulometria 3 µm. No processo de limpeza, os substratos foram lavados com água destilada e detergente e inseridos em ultrassom (Ultracleaner 1400 - Unique) por um período de 10 min. Após o enxágue, o processo foi repetido com álcool isopropílico e por fim, novamente com água destilada pelo mesmo intervalo de tempo. As amostras foram condicionadas em lugares apropriados para o desenvolvimento das próximas etapas do presente estudo.

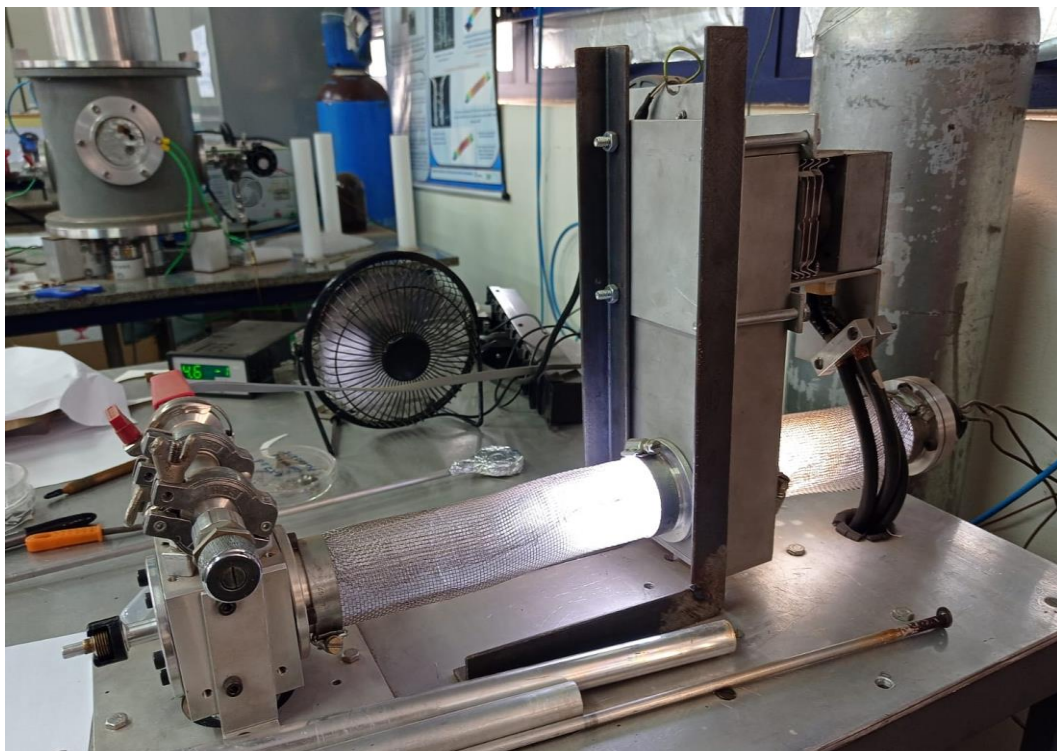
4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES

Os processos de deposição a plasma podem ser utilizados para funcionalizar biomateriais com grupos funcionais de interesse (KASTELLORIZIOS et al., 2012). Sardella et

al. (2002) enfatizam que a técnica PECVD é uma potencial alternativa para aplicações biomédicas devido a sua característica de esterilidade intrínseca. Portanto, a técnica que foi adotada nessa pesquisa consistiu na deposição de filmes finos de ácido acrílico polimerizado na liga Ti-6Al-4V por meio de PECVD. Em suma, o intuito dessa etapa é depositar nas superfícies camadas contendo grupos funcionais de COOH, formando um filme fino para a posterior imobilização do peptídeo.

Os substratos polidos e limpos foram inseridos no sistema PECVD de *design* personalizado. O equipamento é composto por uma câmara de vácuo de tubo de quartzo acoplado a uma fonte microondas de 1000 W (**Figura 10**). Além disso, o PECVD também possui válvulas agulha para controle do fluxo de gás, bomba de vácuo rotativa. A pressão residual foi de 8×10^{-3} Torr. Na configuração no PECVD para o revestimento dos discos com grupos de COOH, alguns parâmetros foram variados para estabelecer a melhor condição de deposição na superfície da liga, tais parâmetros foram: a pressão do monômero, pressão do gás argônio (Ar) e tempo de deposição. Desta forma, a melhor condição encontrada para a formação do filme foi: pressão do monômero de 5×10^{-1} Torr e a pressão do Ar de 3×10^{-1} Torr com tempo de deposição de 6 minutos. A **Figura 10** mostra o aparato experimental utilizado para a deposição do filme.

Figura 10 – Montagem experimental utilizada para a deposição de AA em Ti-6Al-4V



Para o processo de imobilização do JI-2 nas superfícies metálicas imobilização, preparou-se uma solução de Cloridrato de (1-etil-3-[3 dimetilaminopropil] carbodiimida) (EDC) e N-Hidroxissuccinimida (NHS), ambas na concentração de 10 mmol L^{-1} na proporção 1:1 com tampão fosfato-salino, do inglês, *phosphate buffered saline* (PBS) em pH 7.4 e agitou-se a solução em um vortex. Em seguida, os substratos foram submersos na solução de EDC/NHS e armazenados na temperatura de aproximadamente 4°C por 24 h. Posteriormente, as superfícies funcionalizadas foram enxaguadas com água MilliQ e o peptídeo na concentração de $80 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ ou $500 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ (para ensaios biológicos) foi inserido no sistema e armazenado por 36 h na temperatura de aproximadamente 4°C e por fim, os substratos funcionalizados foram enxaguados novamente com água MilliQ. O propósito dessa etapa foi de imobilizar os peptídeos covalentemente nas superfícies revestidas de ácido acrílico através da formação de ligações amídicas.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) é um tipo de espectroscopia vibracional fundamentada na propagação da radiação eletromagnética na faixa de frequência do infravermelho em uma amostra. Nesse processo de interação com a matéria, parte da radiação é absorvida pela amostra e parte é transmitida. Assim, essa técnica permite a obtenção de informações sobre parâmetros estruturais, tais como: os grupos funcionais individuais e interações moleculares. Subsequentemente, as bandas específicas obtidas nessa técnica caracterizam os modos vibracionais específicos dos materiais de estudo e permitem a verificação da conjugação de moléculas orgânicas com distintos substratos (DENDISOVÁ et al., 2018).

Nessa pesquisa, a análise das superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas foram caracterizadas via FTIR. Desta forma, os espectros de FTIR foram obtidos utilizando um espectrômetro acoplado a um acessório IRRAS na faixa de 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} , com a resolução de 4 cm^{-1} . No equipamento, a melhor condição para obter os espectros desse sistema foi: 30° de incidência e número de *scans* 64. A **Figura 11** mostra o equipamento utilizado para a obtenção dos espectros de FTIR para as amostras funcionalizadas e não funcionalizadas.

Figura 11 – Espectrômetro utilizado para as medidas de FTIR



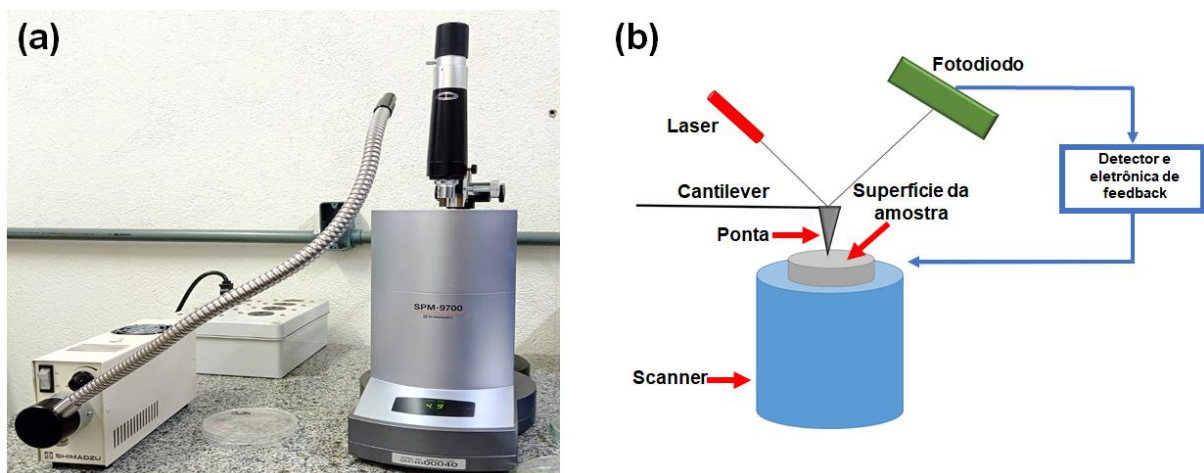
Fonte: da autora, 2023

A técnica de AFM permite a obtenção de imagens topográficas tridimensionais de alta resolução espacial (KALIVA; VAMVAKAKI, 2020). A microscopia de força atômica é utilizada para análises em escala nanométrica de uma determinada superfície, classificada como uma microscopia de varredura de sonda. Em suma, as topografias são obtidas a partir do escaneamento de uma ponta na superfície de interesse, em que a ponta é localizada na extremidade de um cantilever. Assim, por meio de interações intermoleculares na interface ponta/amostra ocorre o desvio do cantilever. Além disso, o microscópio de força atômica possui um sistema de detecção contínuo de um laser de diodo focado na parte de trás do cantilever e de um scanner piezoelétrico (KALIVA; VAMVAKAKI, 2020). Para investigar diversas propriedades de materiais, o microscópio de força atômica pode operar nos seguintes modos de varredura: modo estático, modo dinâmico e modo sem contato. O mecanismo de funcionamento de um microscópio de força atômica está representado na **Figura 12 (b)** abaixo.

Para esse tipo de análise, não é necessário realizar nenhum tratamento adicional nas superfícies das amostras (KALIVA; VAMVAKAKI, 2020). Ademais, um mecanismo de contraste de imagem que pode ser utilizado na AFM é a imagem de fase, que permite obter informações qualitativas do sistema para complementar as observações da topografia (de OLIVEIRA et al., 2012). Neste trabalho, por meio do AFM foi possível realizar o mapeamento topográfico de todas as superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas com o peptídeo JI-2,

identificando as suas respectivas características específicas. Essas análises foram realizadas na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) com o auxílio de um microscópio de força atômica Shimadzu SPM 970 operando em modo dinâmico e ângulo de fase de -30° . As imagens tratadas de AFM e obtenção dos dados de rugosidade das superfícies foram obtidas pelo *software* Gwyddion. A **Figura 12 (a)** representa o referido microscópio utilizado para essas análises.

Figura 12 – Microscópio de força atômica e seu princípio de funcionamento (a) Microscópio de força atômica utilizado para as análises topográficas das superfícies (b) funcionamento do equipamento baseado em Kaliva e Vamvakaki 2020 e de Oliveira et al. 2012



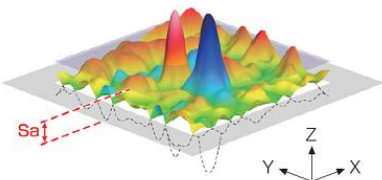
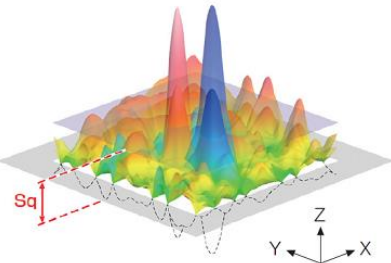
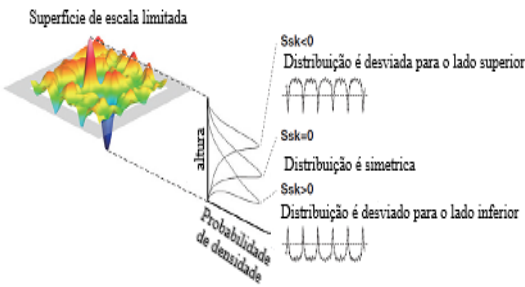
Fonte: das autoras, 2022

A rugosidade é um parâmetro estatístico importante para compreender aspectos superficiais, tal como a influência da topografia na adesão bacteriana. Nesse sentido, a técnica de AFM pode ser adotada para a caracterização topográfica. Os seguintes parâmetros tridimensionais foram estudados a partir do perfil de rugosidade determinado por AFM: rugosidade média (S_a), rugosidade quadrática média (RMS) e assimetria (S_{sk}). A **Tabela 5** abaixo apresenta a definição e os cálculos utilizados para a obtenção desses parâmetros.

A morfologia das amostras foi investigada utilizando a técnica de MEV e a composição química via EDX. A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica que permite a obtenção de micrografias de alta resolução e ampliação (KALIVA; VAMVAKAKI, 2020). A imagem formada nessa técnica é tridimensional, gerada pela varredura da amostra por meio da incidência de um feixe de elétrons emitido por um canhão de elétrons (ALMEIDA; PIRES; COELHO, 2014). De acordo com (KALIVA; VAMVAKAKI, 2020), esse feixe incidente na amostra é direcionado pelas lentes eletromagnéticas, e em seguida interagem com a superfície provocando diversos sinais que permitem a obtenção de informações para as análises

morfológicas. A amostra ao ser impactada pelo feixe de elétrons primários, emite elétrons secundários que são captados por um detector. No qual, esses elétrons primários ao incidir na amostra provocam a emissão de ondas eletromagnéticas na frequência de raios-X, que são usados para a análises de EDX. Entretanto, os elétrons secundários (SE) são produzidos em interações inelásticas e são cruciais para a obtenção das micrografias, visto que são responsáveis pela produção de micrografias de alta resolução (KALIVA; VAMVAKAKI, 2020). A **Figura 13** representa o mecanismo de funcionamento de um microscópio eletrônico de varredura.

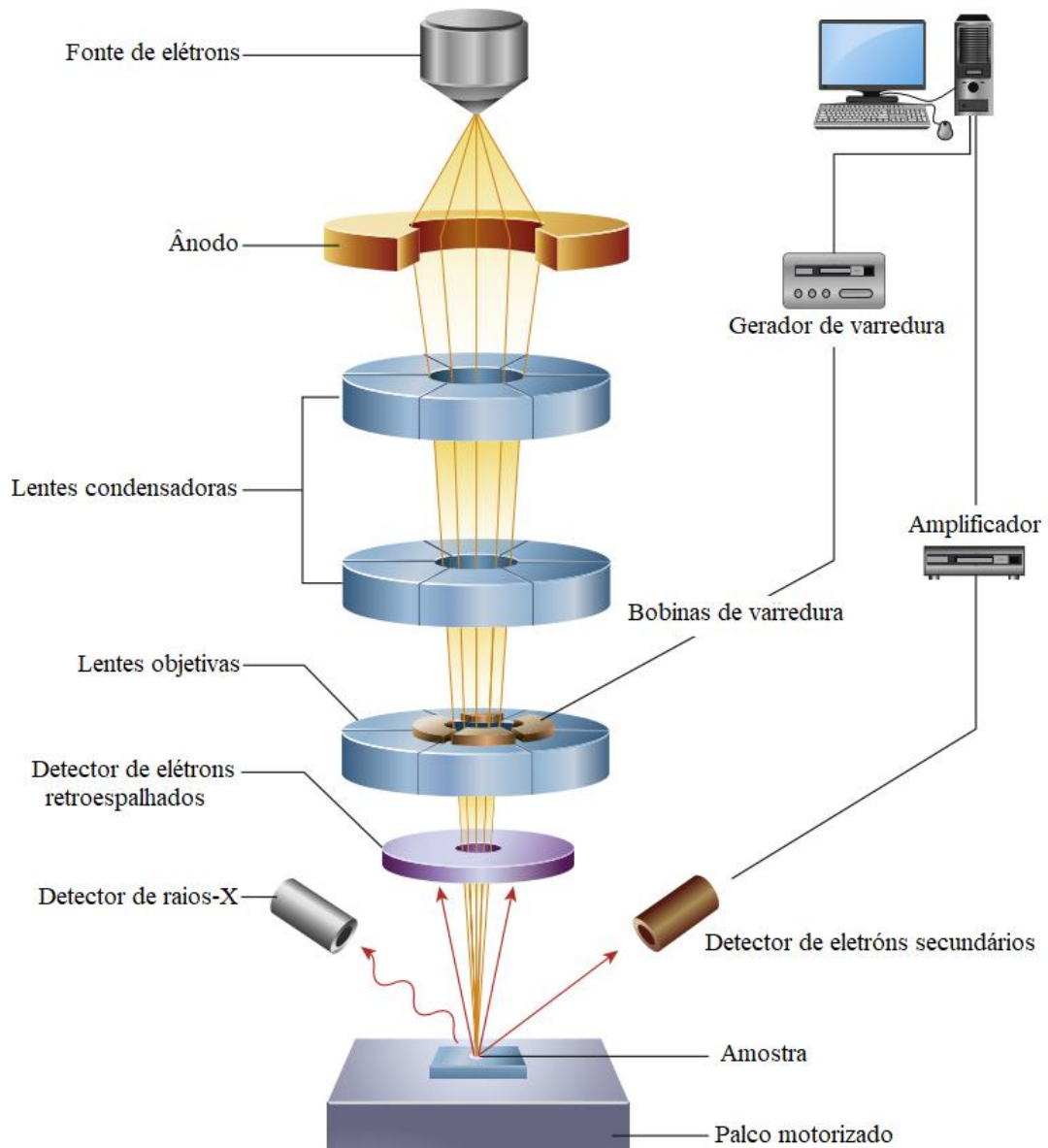
Tabela 5 – Parâmetros tridimensionais de rugosidade

Parâmetro	Definição	Cálculo
<p>Rugosidade Média (S_a)</p> 	<p>É a média de diferença da altura média para o plano médio, ou seja, média aritmética da ordenada $Z(x, y)$ na área da amostra.</p>	$S_a = \frac{1}{A} \iint Z(x,y) dx dy$
<p>Rugosidade Média Quadrática (RMS ou S_q)</p> 	<p>É equivalente ao desvio padrão da distribuição da altura e representa a raiz quadrática média da coordenada $Z(x,y)$ na área da amostra.</p>	$S_q = \sqrt{\frac{1}{A} \iint Z^2(x,y) dx dy}$
<p>Assimetria (S_{sk})</p> 	<p>Compreende o grau de simetria das alturas de uma determinada superfície sobre um plano médio. $S_{sk} > 0$ indica a predominância de picos $S_{sk} < 0$ indica a predominância de vales</p>	$S_{sk} = \frac{1}{S_q^3} \left[\frac{1}{A} \iint Z^3(x,y) dx dy \right]$

Fonte: adaptado de Sousa (2016) e Olympus³

³ OLYMPUS. Soluções em microscopia medição da rugosidade de superfícies - Parâmetros. Disponível em: [https://www.olympus-ims.com/pt/metrology/surface-roughness-measurement-portal/parameters/#!cms\[focus\]=022](https://www.olympus-ims.com/pt/metrology/surface-roughness-measurement-portal/parameters/#!cms[focus]=022). Acesso em: 02 de março de 2022.

Figura 13 – Funcionamento do Microscópio Eletrônico de Varredura



Fonte: adaptado de Inkson, 2016

Nessa pesquisa, o equipamento utilizado foi do modelo MEV-FEG JEOL-JSM7001F do Departamento de Química da Universidade Federal de Uberlândia. Para essas análises, as amostras foram submetidas a um processo de metalização com ouro, uma vez que as amostras contendo peptídeo não são condutoras. A voltagem utilizada no equipamento foi de 20 kV e as imagens morfológicas de elétrons secundários e retroespalhados foram obtidas com magnificação de 1000x e 10000x.

4.5 TESTES DE IMERSÃO

Antes da realização dos estudos eletroquímicos via técnica global (OCP e EIS), optou-se no presente trabalho por investigar a resistência ao processo de corrosão das amostras com e sem revestimento via testes de imersão. Embora sejam bastante simples, os testes de imersão aparecem como uma ferramenta poderosa que nos ajuda compreender a evolução do processo de corrosão em um dado meio agressivo. Os testes foram realizados em diferentes tempos de imersão (1 h, 3 h, 10 h, 15 h e 24 h) em solução de fluoreto de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaF}$). Após o término de cada tempo de imersão, as amostras foram lavadas com o auxílio de água destilada por um período de 10 min em ultrassom. Subsequentemente, a morfologia dos materiais foi acessada por meio de imagens de Microscopia Óptica (MO) no Laboratório de Filmes Finos e Processos de Plasma na Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Além disso, a morfologia e composição química das amostras após o ensaio de imersão foi avaliada por MEV e EDX. Para o tratamento de imagem foi utilizado o *software* ImageJ.

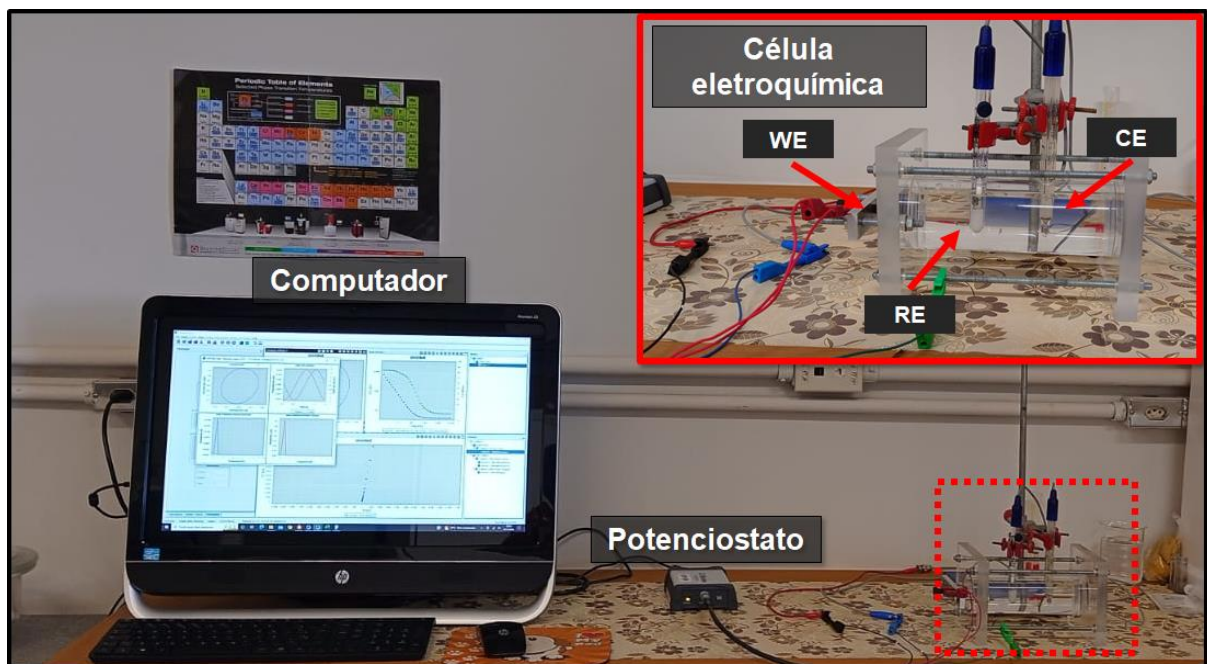
4.6 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS

No presente trabalho, ensaios eletroquímicos global (OCP e EIS) e localizado de varredura de eletrodo vibratório, do inglês, *Scanning Vibrating Electrode* (SVET) foram realizados com o intuito de verificar a influência do revestimento nos processos de corrosão da liga Ti-6Al-4V com e sem revestimento. Os ensaios de SVET foram realizados pelo grupo da professora Dra. Idalina Vieira Aoki da Universidade de São Paulo (USP). Para tal, as medições de SVET foram realizadas no equipamento Applicable Electronics Inc. O *software* de controle foi o ASETScience, e os mapas foram construídos no *software* QuikGrid versão 5.4. O microeletrodo vibratório utilizado foi uma sonda vibratória de platina/irídio com 10 μm de diâmetro de depósito de platina na ponta da sonda, com dois eletrodos auxiliares semi-referências de platina. As medidas de SVET foram realizadas utilizando uma frequência de vibração de 124 Hz no eixo Y, com a distância entre a superfície do substrato e o microeletrodo de 100 μm . A área de análise da amostra foi delimitada com cera de abelha. A solução eletrolítica utilizada foi solução de NaF $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 2, e os *scans* foram realizados a cada hora, durante 15h.

Referente aos ensaios eletroquímicos globais, utilizou-se uma célula eletroquímica contendo um compartimento de três eletrodos, sendo eles: eletrodo de trabalho (do inglês, *Working Electrode* - WE) composto pelos espécimes: Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 com

uma área exposta de 1 cm², um fio de platina como contra eletrodo (do inglês, *Counter Electrode* - CE) e o eletrodo de calomelano saturado (Hg/Hg₂Cl₂,KCl_{sat}) como eletrodo de referência (do inglês, *Reference Electrode* - RE). Os detalhes da célula eletroquímica utilizada são apresentados na **Figura 14**. Todos os testes eletroquímicos foram realizados usando uma solução de 0.6 mol L⁻¹ de NaCl e um potenciostato/galvanostato (μ Stat-i-400s) em temperatura ambiente. Embora o fluido corporal tenha a concentração de aproximadamente 0.1 mol L⁻¹, optou-se por usar uma solução mais concentrada para garantir a eficiência dos tratamentos utilizados. Todos os testes eletroquímicos foram replicados e mostraram boa reprodutibilidade. O potencial de circuito aberto (E_{OCP}) foi monitorado por um período de 3600 s. É de extrema importância mencionar que para este período o potencial já estava estabilizado e os demais testes eletroquímicos poderiam ser realizados. Os espectros de EIS foram obtidos para todos os espécimes em um range de frequência de 100 kHz a 10 mHz, usando uma amplitude onda de 10 mV_{rms}. Os espectros EIS foram monitorados a cada hora durante um período de 12 h e, em seguida, as medições foram feitas em 24 h e 168 h, respectivamente. Os espectros de EIS foram simulados utilizando o *software ZView2*. É importante mencionar que antes de cada medida de EIS, o E_{OCP} foi avaliado durante 600 s.

Figura 14 – Foto esquemática mostrando o arranjo experimental utilizado nos ensaios eletroquímicos globais: computador para aquisição dos dados, célula eletroquímica contendo um compartimento de três eletrodos e seus respectivos lugares e o potenciostato/galvanostato



Fonte: da autora, 2023

4.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.7.1 Bioensaio de atividade antimicrobiana do peptídeo

A ação antimicrobiana do peptídeo JI-2 foi avaliada por meio do método padrão de microdiluição em caldo (Müller-Hinton) para determinar o valor de MIC. Para tanto, baseou-se nos protocolos adotados por Souza et al. (2005) e Martins et al. (2020). Assim, o microrganismo utilizado nesta investigação foi a bactéria Gram-negativa *E. coli* (ATCC 25922). Inicialmente, as células de *E. coli* foram suspensas em solução salina (0,9% de NaCl) para um valor de 0,5 na escala McFarland. Desta suspensão, 50 µL foram incubados em cada poço de uma microplaca de 96 poços, em que cada poço continha o peptídeo JI-2 diluído na faixa de concentração de 0,9 – 2000 µg mL⁻¹ e 50 µL de caldo Müller-Hinton. O kit I de proliferação celular, do inglês, *Cell Proliferation Kit I* (MTT) e o protocolo foi feito de acordo com ao fabricante, após 24 h de cultura de *E. coli* e JI-2, o sobrenadante foi coletado e 10 µL do reagente 1 (Reagente de marcação MTT) foi adicionado a uma concentração final de 0,5 g L⁻¹ e incubado por 4 h em 37 ± 0,5 °C em uma atmosfera de 5,0 ± 0,2 % CO₂. Logo depois, 100 µL de reagente 2 (tampão de solubilização) foi adicionado e incubado por 24 h em 37,0 ± 0,5 °C em atmosfera de 5,0 ± 0,2 % CO₂. Após 24 h, a leitura foi realizada em um espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: 550 e 600 nm. Assim, a ausência do crescimento bacteriano foi indicada pela ausência de cor. O cloranfenicol foi utilizado como antibiótico padrão sendo o controle positivo e poços contendo apenas o meio de cultura foram utilizados como controles negativos. O ensaio antimicrobiano foi realizado em triplicata e valores de MIC foram determinados.

4.7.2 Atividade antibiofilme das superfícies

O efeito inibitório de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 em biofilmes bacterianos de *E. coli* foi realizado segundo Rocha et al. (2019) com algumas alterações. A concentração de peptídeo imobilizado covalentemente em Ti-6Al-4V foi de 500 µmol L⁻¹. Assim, 1 mL de culturas de cepas de *E. coli* foram incubadas durante a noite em caldo BHI e ajustadas ao padrão 0,5 na escala McFarland para o ensaio de formação de antibiofilme bacteriano. Posteriormente, 100 µL de cultura foram transferidos para uma microtitulação de poliestireno de 24 poços contendo 100 µL de caldo BHI fresco (controle) e caldo BHI contendo os materiais metálicos de estudo. Após incubação por 24 h a 37 °C, o meio de cultura foi descartado e os poços lavados três vezes com solução salina (0,85% NaCl) para remover as células não aderentes. Os biofilmes

foram fixados com 200 μ L de metanol frio (Synth) por 15 min. O metanol foi removido e os biofilmes foram secos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de solução de cristal violeta (1%) e, após 15 min, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 μ L de soro fisiológico. Os biofilmes foram secos à temperatura ambiente e 200 μ L de solução de ácido acético (33%) foram adicionados por 20 min para solubilizar o cristal violeta. A biomassa total do biofilme foi medida pela absorbância em 600 nm, e o percentual de inibição da formação do biofilme foi expresso pela fórmula: $1 - (\text{OD}_{\text{tratado}} / \text{OD}_{\text{controle}}) \times 100$. Para a cepa de *E. coli*, o experimento foi realizado em triplicata com três experimentos independentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

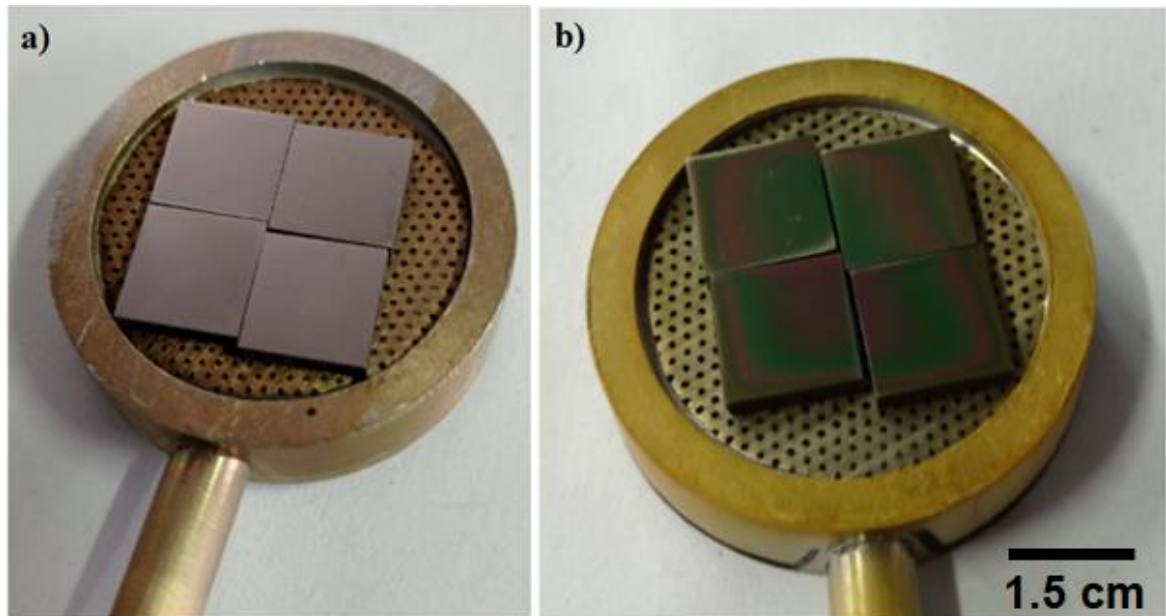
Capítulo 4

5.1 ANÁLISE DA DEPOSIÇÃO DO FILME FINO DE PAA NA SUPERFÍCIE METALICA VIA PECVD

O intuito dessa pesquisa foi de imobilizar o peptídeo antimicrobiano (JI-2) na liga Ti-6Al-4V para conferir a ela propriedades antimicrobianas e aprimorar a sua biocompatibilidade em aplicações odontológicas e ortodônticas. Para tanto, utilizou-se da estratégia de deposição de filmes finos de ácido acrílico via PECVD para imobilizar covalentemente o peptídeo na superfície. Em se tratando de funcionalização com moléculas orgânicas, a deposição de filmes finos com grupos funcionais específicos em superfícies metálicas é amplamente utilizada para diversas aplicações (SARDELLA et al., 2002; SIOW et al., 2006). Esse método consiste no uso de plasma para fragmentar moléculas precursoras e depositá-las sobre os substratos em forma de filmes finos poliméricos. Os grupos funcionais mais utilizados para este fim são: grupos aldeídos, amina, carboxila e hidroxila (SIOW et al., 2006). Especificamente, os grupos carboxilas se destacam devido às suas potencialidades de estimular a adesão e proliferação celular (BITAR et al., 2019). Entre esses grupos, o ácido acrílico ($C_3H_4O_2$) é um precursor para a formação de ácido poliacrílico (PAA). O ácido acrílico polimerizado é biocompatível e a presença de grupos carboxila permite a funcionalização de materiais com diferentes biomoléculas (de GIGLIO et al., 2007), tais como: peptídeos (LOPEZ et al., 2005; SEO et al. 2010), proteínas (ULBRICHT e RIEDEL, 1998) e lipossomas carregados com heparina (KASTELLORIZIOS et al., 2012). Além disso, o revestimento de PAA possui excelentes propriedades anticorrosivas (de Giglio et al., 2007), atuando como uma barreira protetora em superfícies metálicas.

Conforme descrito anteriormente, para a obtenção dos filmes finos de PAA foi necessário variar alguns parâmetros no PECVD para encontrar a melhor condição de deposição, tais parâmetros foram: tempo de deposição, pressão do gás precursor, temperatura e pressão do monômero. A **Figura 15** mostra os substratos de Ti-6Al-4V antes e após a deposição em plasma de ácido acrílico (Ti-6Al-4V/PAA) na melhor condição estabelecida. É possível notar que as amostras funcionalizadas apresentam mudança na coloração, cujo aspecto é homogêneo ao longo de toda a superfície.

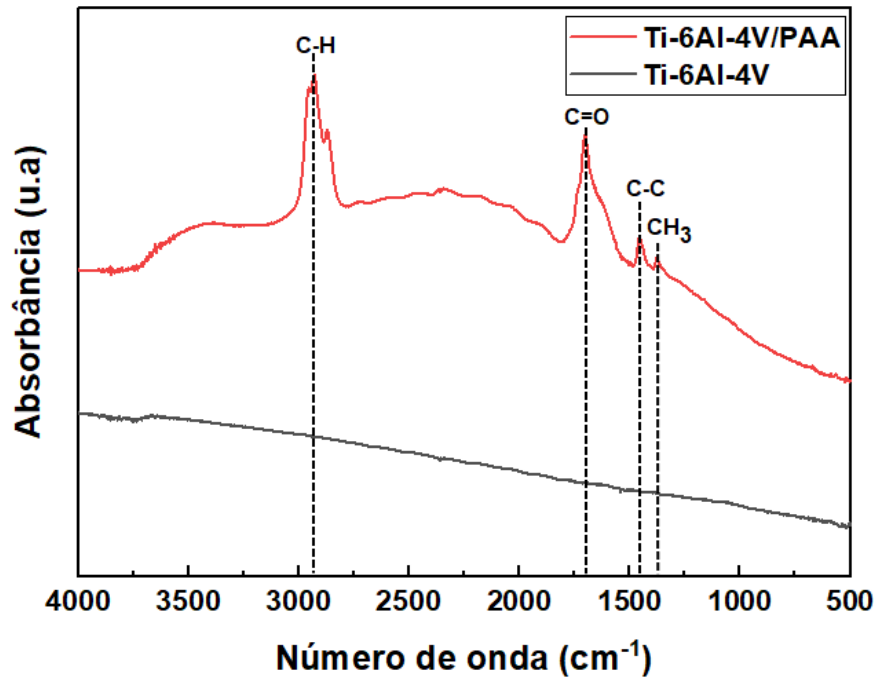
Figura 15 – Características superficiais da liga Ti-6Al-4V antes e depois da deposição de filme fino de AA via PECVD (a) antes do tratamento (b) após a deposição de AA



Fonte: da autora, 2023

A técnica de FTIR foi utilizada em várias etapas da funcionalização da superfície metálica. Especificamente, o objetivo da utilização dessa técnica foi de analisar os grupos funcionais presentes na superfície após a deposição de PAA, bem como as possíveis alterações decorrentes da imobilização do peptídeo. Conforme mostrado na **Figura 16**, existem duas bandas intensas em aproximadamente 1700 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} na amostra de Ti-6Al-4V/PAA. A primeira está associada ao grupo funcional C=O, indicando a presença dos grupos carboxila na superfície da liga (SEO et al., 2010). A segunda está associada à presença de grupos C-H e é característica do monômero de AA (TOPALA et al., 2009). Além disso, é possível notar outras bandas nas regiões próximas a 1450 cm^{-1} e 1370 cm^{-1} , cujos respectivos grupos funcionais são exibidos na **Tabela 6**. O aparecimento das bandas adicionais às características dos grupos carboxila está relacionado ao método de deposição, visto que os processos de polimerização a plasma podem induzir a formação de estruturas químicas com frequências de vibrações suplementares como consequência dos fenômenos de fragmentação e rearranjo molecular na fase gasosa (KHELIFA et al., 2016). Assim, as análises dos grupos funcionais mencionados na literatura corroboram para confirmação da formação do filme fino polimérico de PAA na liga Ti-6Al-4V.

Figura 16 – Espectro de FTIR de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA via PECVD



Fonte: da autora, 2023

Tabela 6 – Grupos funcionais associados a deposição de PAA em Ti-6Al-4V

Material	Número de onda referente às bandas observadas	Grupo funcional correspondente
Ti-6Al-4V/PAA	$2925.9 \pm 1.0 \text{ cm}^{-1}$	C - H
	$1702.9 \pm 1.3 \text{ cm}^{-1}$	C = O
	$1454.7 \pm 1.9 \text{ cm}^{-1}$	C - C
	$1374.1 \pm 1.4 \text{ cm}^{-1}$	CH ₃

Fonte: da autora, 2023

5.2 ANÁLISE ESTRUTURAL DA IMOBILIZAÇÃO DO PEPTÍDEO JI-2 NA SUPERFÍCIE METÁLICA

Para a imobilização do peptídeo na superfície de Ti-6Al-4V/PAA, foram realizados testes a fim de determinar a concentração de peptídeo necessária para efetivar a reação. Nesta etapa, utilizou-se um peptídeo de teste denominado Chitprobe-2 (CAAWR-NH₂). Este peptídeo apresenta os terminais similares ao JI-2, de modo que as reações necessárias para a sua imobilização em Ti-6Al-4V/PAA são as mesmas. Como a sua cadeia de aminoácidos é mais curta que o JI-2, o seu uso representa uma alternativa mais econômica para os testes iniciais. As concentrações utilizadas foram de 20, 40 e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a **Figura 17** mostra o efeito da

concentração do peptídeo no espectro de FTIR das amostras. Através da figura, é possível perceber que as bandas de absorção em 1700 cm^{-1} e 2920 cm^{-1} observadas para Ti-6Al-4V/PAA não estão presentes nas amostras com peptídeo imobilizado, Ti-6Al-4V/PAA/Chitprobe-2. De fato, isso ocorre devido a ligação entre os grupos pertencentes ao peptídeo e os grupos funcionais detectados no espectro do Ti-6Al-4V/PAA. De modo específico, o desaparecimento da banda em 1700 cm^{-1} reflete as ligações entre os grupos amina dos terminais do peptídeo com os C=O presentes na superfície. Esse mesmo comportamento foi reportado por Seo et al. (2010) ao imobilizar o peptídeo RGD em titânio puro via polimerização em plasma de AA. Adicionalmente, a variação da concentração do peptídeo não é um fator determinante para o processo de imobilização, considerando a faixa utilizada (20 a $80\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$).

Tendo em vista esses aspectos, a maior concentração peptídica ($80\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) foi escolhida para a realização dos experimentos utilizando a JI-2. Os espectros de FTIR do substrato e das diferentes condições são representados pela **Figura 18**, em que se confirmou a efetivação da ligação covalente entre Ti-6Al-4V/PAA e biomolécula. Visto que, houve o desaparecimento da banda em 1700 cm^{-1} evidenciando a ligação entre os grupos carboxila da superfície metálica com os grupos amina do peptídeo. Além disso, é possível identificar o aparecimento da banda em torno de 2350 cm^{-1} que está associada com vibração de CO_2 (NI e HAO, 2012; SULAIMAN, 2019)

Figura 17 – Efeito da concentração de peptídeo Chitprobe-2 na imobilização

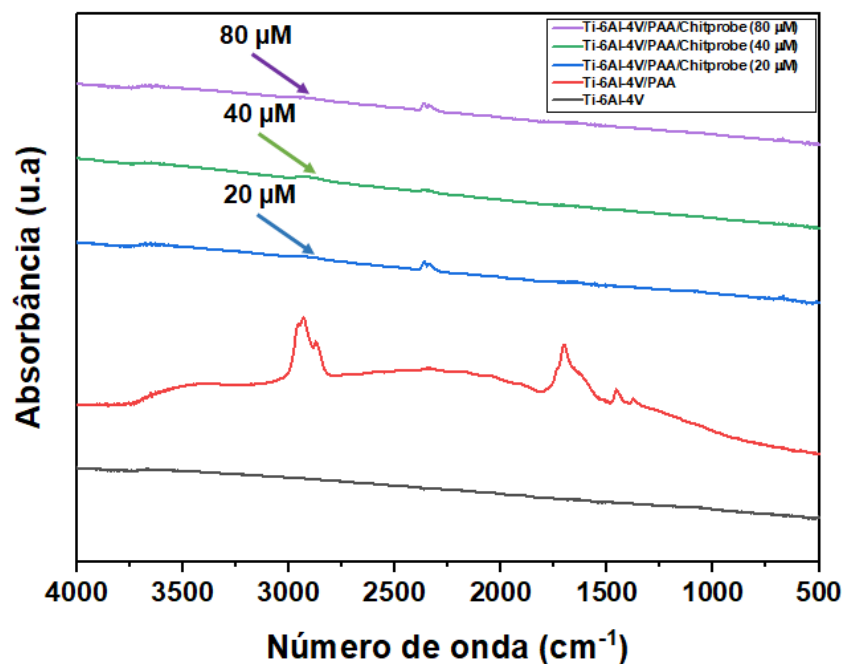
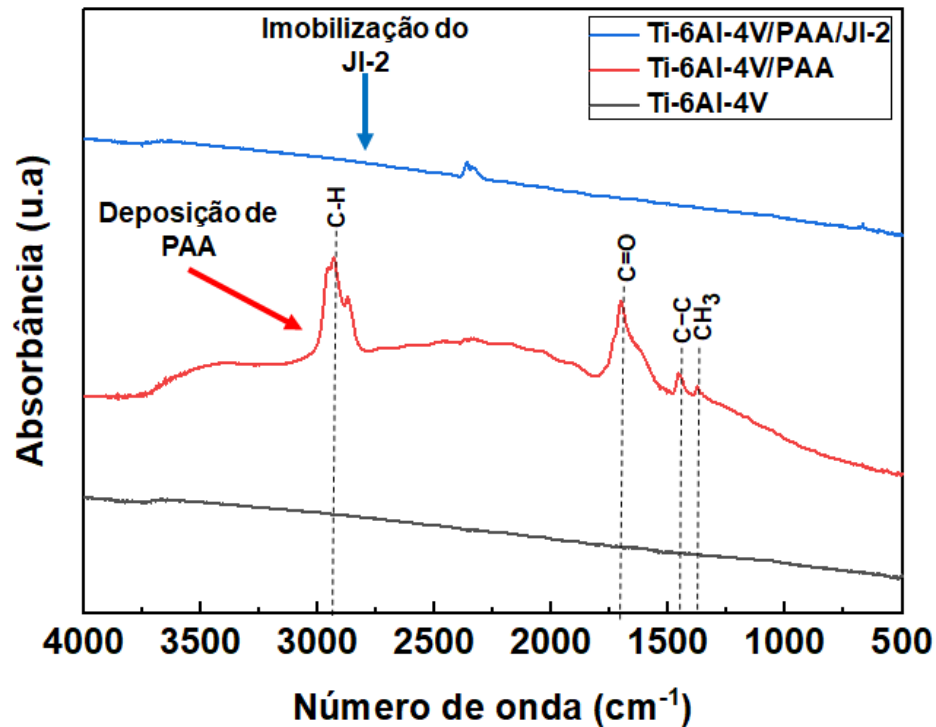


Figura 18 – Mudanças espectrais da superfície após a imobilização com o JI-2



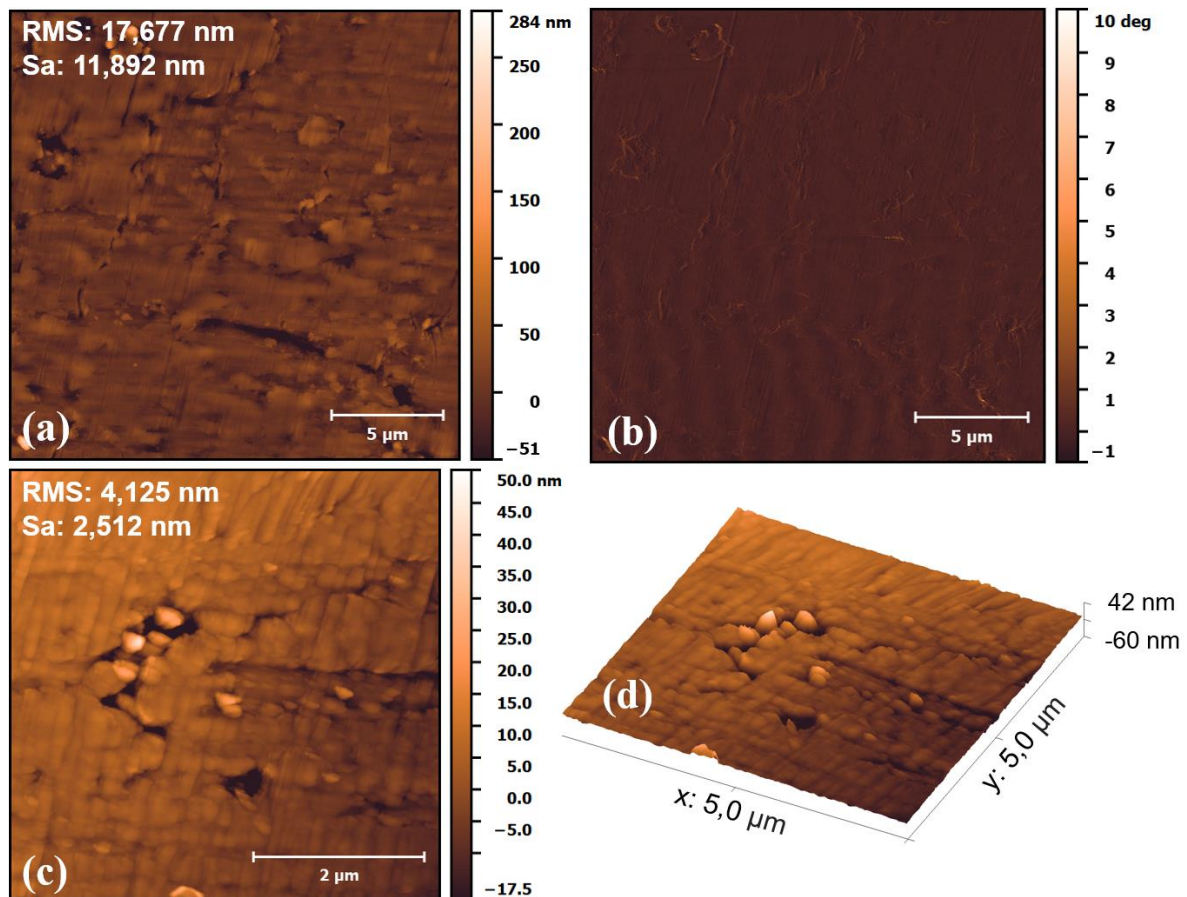
Fonte: da autora, 2023

5.3 ANÁLISE DA TOPOGRAFIA, MORFOLOGIA E DE RUGOSIDADE DAS SUPERFÍCIES FUNCIONALIZADAS E NÃO FUNCIONALIZADAS

As topografias das superfícies das amostras Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V/PAA e Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 foram avaliadas qualitativamente por meio de AFM. A topografia da superfície de Ti-6Al-4V é representada na **Figura 19**. Desta forma, é possível notar que a superfície possui algumas irregularidades e ranhuras que podem ter sido provocadas pelo processo de lixamento e polimento mecânico. A **Figura 19 (b)** apresenta essas imagens de contraste de fase para a liga Ti-6Al-4V, essas imagens permitem analisar regiões de distintas propriedades. Nessa perspectiva, um fator que interfere no ângulo de fase da superfície Ti-6Al-4V é a presença de partículas de segunda fase com diferentes densidades (de ALMEIDA BINO et al., 2021). De acordo com Wang et al. (2018), o parâmetro de rugosidade é um dos indicadores das características superficiais dos materiais. Levando em consideração esse aspecto, a técnica de AFM também permitiu verificar os efeitos e variações da rugosidade das superfícies nas distintas etapas de funcionalização. A **Figura 19 (a)** e **(c)** apresenta os parâmetros de rugosidade quadrática média (RMS) e rugosidade média (Sa) obtidos para essas topografias representativas

de Ti-6Al-4V. Especificamente, nota-se o valor de RMS: 4.125 nm para as topografias em dimensões de 5 μm x 5 μm , **Figura 19 (c)**. Esse resultado está de acordo com o valor encontrado por Eurídice (2019) para esse material nessa mesma condição de análise (RMS: 4.15 nm).

Figura 19 – Imagens de AFM para as superfícies de Ti-6Al-4V **(a)** nas dimensões 20 μm x 20 μm **(b)** contraste de fase **(c)** topografia nas dimensões 5 μm x 5 μm e **(d)** imagem 3D da superfície

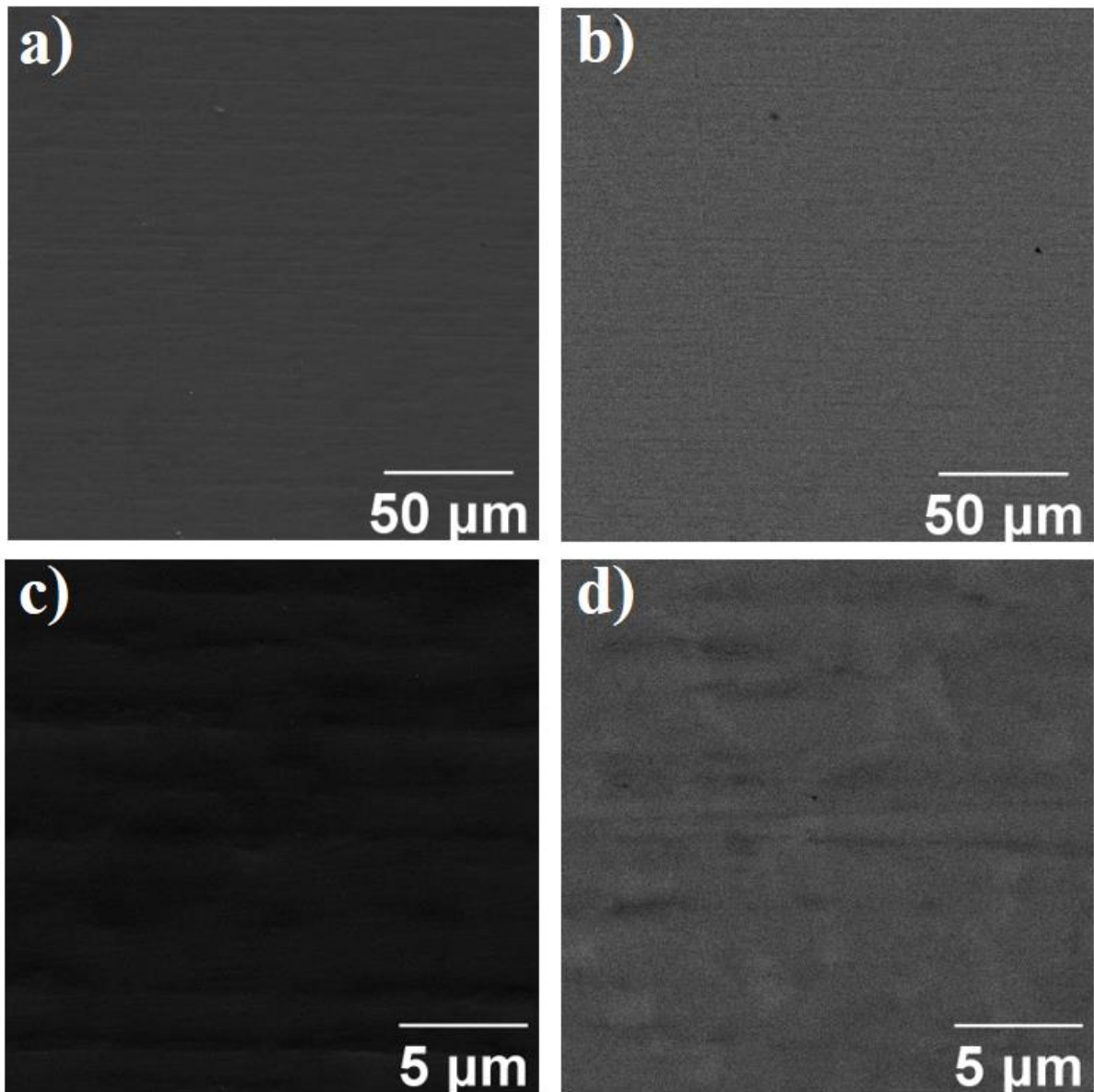


Fonte: da autora, 2023

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada nesta pesquisa para analisar a morfologia das superfícies estudadas nesse trabalho. De modo geral, a **Figura 20** apresenta as imagens de elétrons secundários (SE) e elétrons retroespalhados (BSE) para a superfície de Ti-6Al-4V em aproximações de 1000x e 10000x. Na **Figura 20 (b)** é possível identificar alguns defeitos que podem ser provenientes do processo de preparação dos substratos. Além disso, observa-se nas imagens regiões em tons de cinza claro e escuro. Essas regiões estão relacionadas com as fases α e β dessa liga metálica, em que as regiões mais escuras

possuem maior concentração de alumínio e as claras de vanádio (NASCIMENTO et al., 2021; de ALMEIDA BINO et al., 2021; EURÍDICE, 2019).

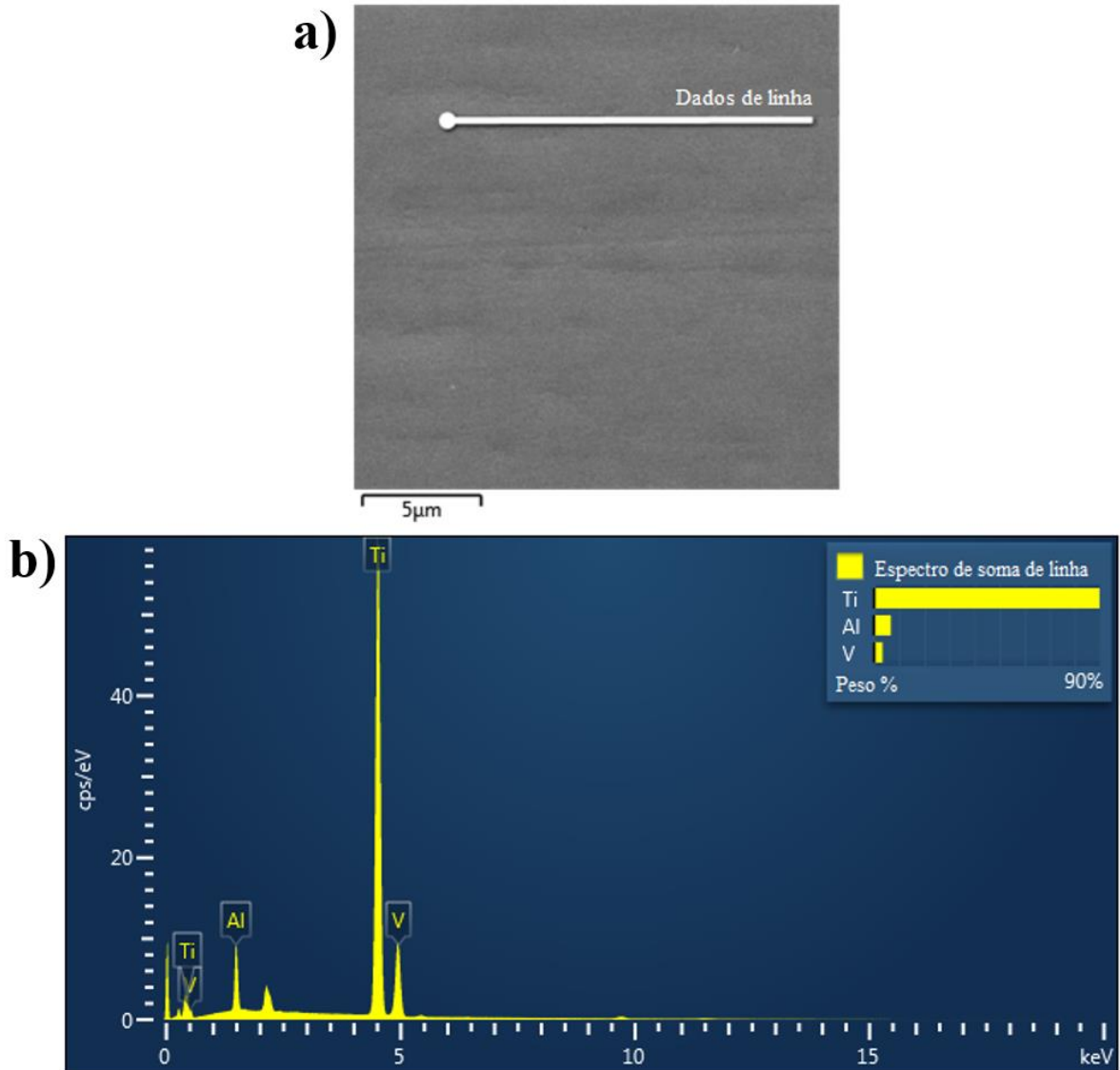
Figura 20 – Imagens de MEV para a superfície de Ti-6Al-4V **(a)** imagem de SE com magnitude de 1000x **(b)** imagem de BSE s com magnitude de 1000x **(c)** imagem de SE com magnitude de 10000x **(d)** imagem de BSE com magnitude de 10000x



Fonte: da autora, 2023

A **Figura 21** apresenta a microestrutura de Ti-6Al-4V e uma análise semi-quantitativa desse substrato via EDX. Nessa análise, os picos representam os elementos constituintes na amostra e a intensidade desses picos está relacionada com a concentração de cada elemento. Desta forma, é possível identificar pelos espectros a presença de Titânio (Ti), Alumínio (Al) e Vanádio (V) em termos de % em peso.

Figura 21 – Análise da composição química de Ti-6Al-4V

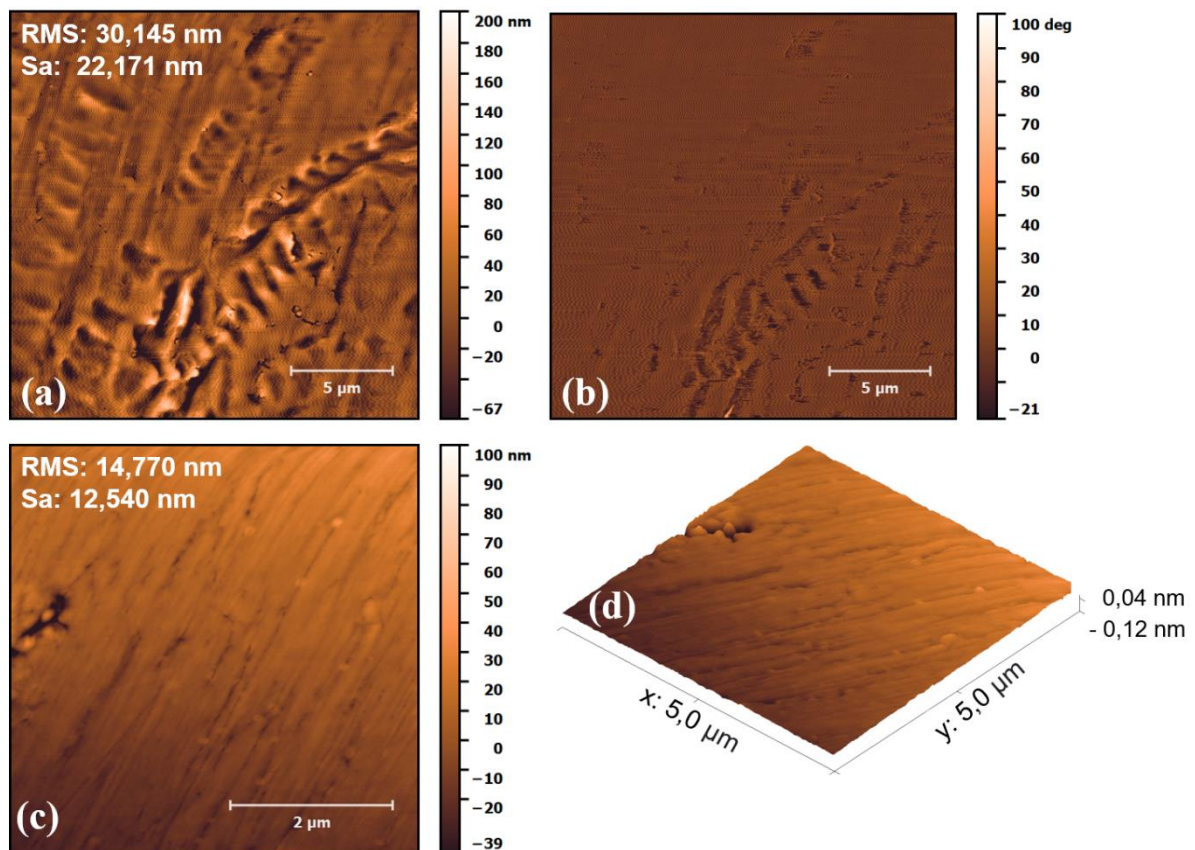


Fonte: da autora, 2023

A **Figura 22** apresenta as imagens topográficas das superfícies após a deposição do filme polimérico de ácido acrílico. Por meio dessas imagens, é possível observar que a superfície de Ti-6Al-4V/PAA exibe um aspecto mais homogêneo em comparação com as topografias do substrato. Além disso, é possível notar que a deposição de PAA na superfície recobre algumas irregularidades advindas da superfície de Ti-6Al-4V sem nenhuma modificação. Assim, com a análise topográfica das superfícies modificadas e não modificadas, verificou-se que o revestimento das superfícies com ácido poliacrílico está presente nas amostras de Ti-6Al-4V/PAA. As **Figuras 22 (a) e (c)** mostram os valores de rugosidade das superfícies modificadas. Nesse sentido, observa-se um aumento significativo da rugosidade da

superfície após a deposição do filme fino de RMS = 4.125 nm para RMS = 14.770 nm nas imagens representativas, **Figura 19 (c) e Figura 22 (c)**. Essa mesma mudança na característica superficial após a deposição a plasma de AA foi observada no trabalho de Seo et al. (2010) para titânio puro.

Figura 22 – Imagens de AFM para as superfícies de Ti-6Al-4V/PAA **(a)** nas dimensões 20 μm x 20 μm **(b)** contraste de fase **(c)** topografia nas dimensões 5 μm x 5 μm **(d)** imagem 3D da superfície

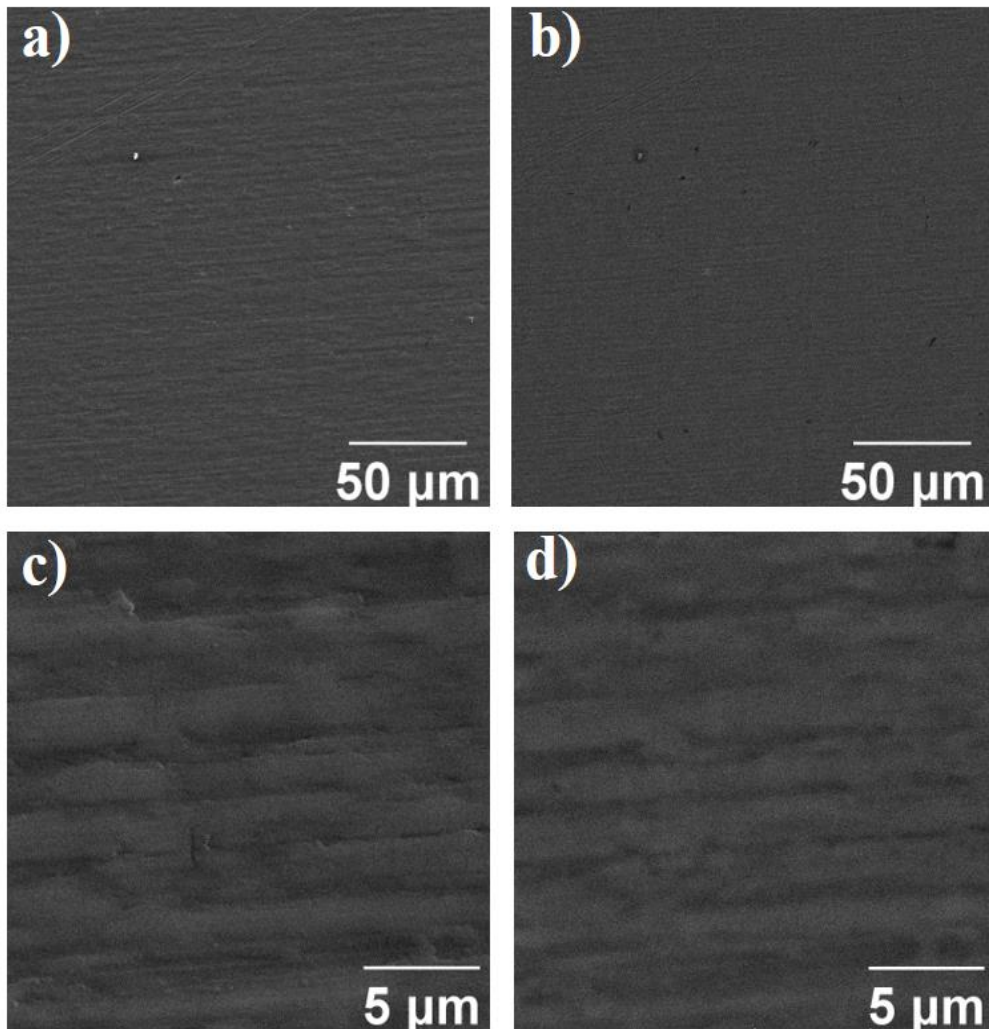


Fonte: da autora, 2023

A morfologia obtida por MEV da superfície de Ti-6Al-4V/PAA está representada na **Figura 23**. Em relação ao substrato, a superfície com o filme fino polimérico apresentou características topográficas diferentes. Além disso, observa-se algumas irregularidades provocadas pelo processo de preparação do substrato e alguns defeitos no filme. Os espectros de EDX em três regiões diferentes são apresentados na **Figura 24**, sendo eles: espectro 1, espectro 2 e espectro 3. Essa investigação, teve como objetivo analisar os elementos químicos presentes na amostra e as respectivas quantidades em cada região. De modo geral, verificou-se a abundância de carbono (C) e oxigênio (O) presente na superfície em todas as regiões, isto

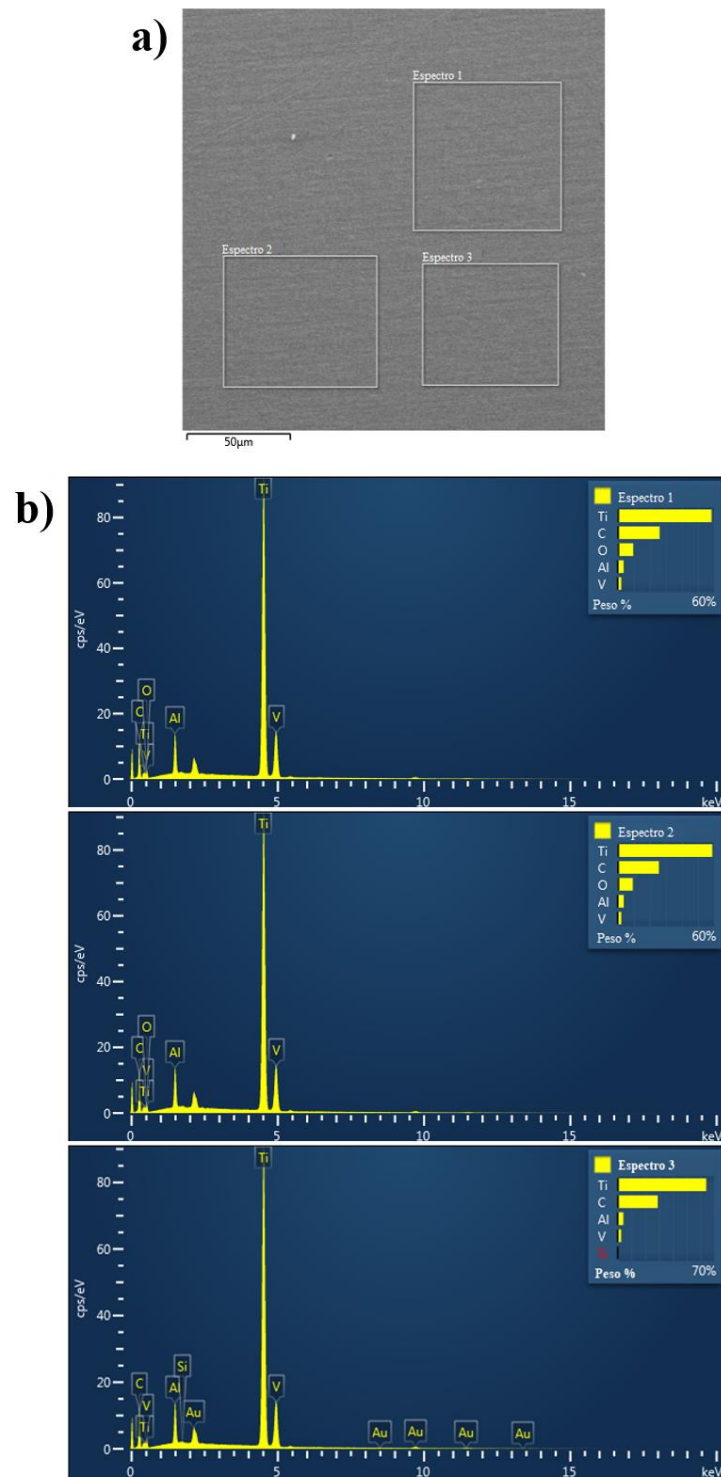
advém das propriedades do filme fino de ácido acrílico. Assim, o aparecimento desses elementos confirma novamente o sucesso da deposição do ácido acrílico na superfície metálica. Na **Figura 24 (b)** observou-se o aparecimento de silício (Si) na região do espectro 3, isso ocorreu devido às lixas de carbetto de silício (SiC) utilizadas no processo de polimento das amostras. Nessa mesma região, observa-se a presença de ouro (Au) em consequência do revestimento metálico que foi realizado para as análises de MEV.

Figura 23 – Imagens de MEV para a superfície de Ti-6Al-4V/PAA **(a)** imagem de elétrons secundários com magnitude de 1000x **(b)** imagem de elétrons retroespalhados com magnitude de 1000x **(c)** imagem de elétrons secundários com magnitude de 10000x **(d)** imagem de elétrons



Fonte: da autora, 2023

Figura 24 – Análise da composição química de Ti-6Al-4V/PAA (a) imagem morfológica da superfície Ti-6Al-4V (b) composição química via espectros de EDX

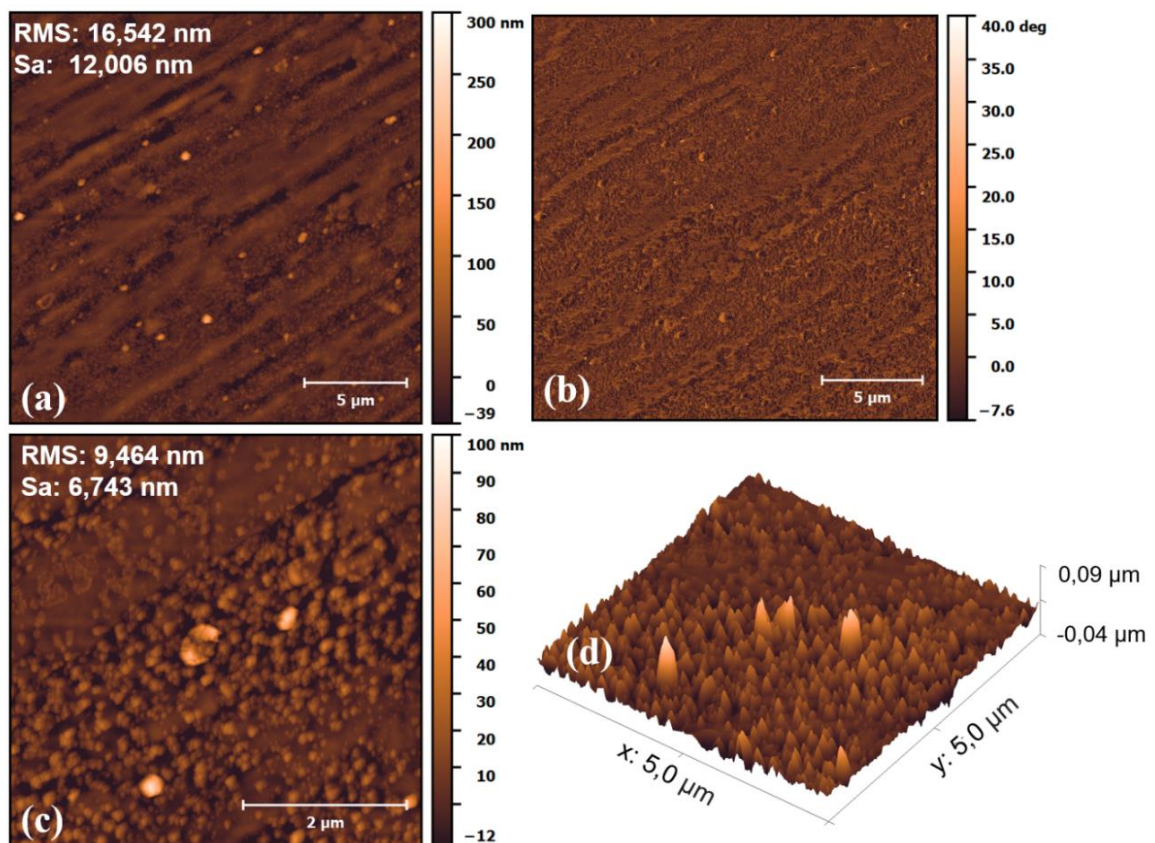


Fonte: da autora, 2023

A **Figura 25** apresenta as imagens de AFM obtidas para a superfície após a imobilização do peptídeo. É notável as diferenças topográficas de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 em relação à Ti-6Al-

4V e Ti-6Al-4V/PAA. A deposição do filme fino de ácido acrílico proporcionou características homogênea a superfície quando comparada com o material base. Contudo, com o peptídeo imobilizado observa-se a presença de vários aglomerados em diversas regiões da superfície metálica. Além disso, os aspectos desses aglomerados podem ser observados também a partir das imagens de contraste de fase, **Figura 25 (c)**. Os valores de RMS e Sa para essas imagens são evidenciados na **Figura 25 (a)** e **(c)**. Na imagem 3D desse material observa-se a presença de alguns picos. Essas estruturas são semelhantes às relatadas por Hernandez-Montelongo et al. (2018) ao imobilizar dois peptídeos (Tet-124 e Tet124-Br) em um filme de polietilenoimina (PEI). Esses autores observaram alguns picos distribuídos por toda a amostra que podem ser atribuídos ao acúmulo local de peptídeo.

Figura 25 – Imagens de AFM para as superfícies de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 **(a)** nas dimensões 20 μm x 20 μm **(b)** contraste de fase **(c)** topografia nas dimensões 5 μm x 5 μm **(d)** imagem 3D da superfície



Fonte: elaborada pela autora, 2023

A **Tabela 7** mostra os parâmetros de rugosidade obtidos para as superfícies Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V/PAA e Ti-6Al,4V/PAA/JI-2. Em suma, a rugosidade dos biomateriais implantáveis é um fator importante para a adesão celular, em que superfícies rugosas melhoram a

osseointegração (SEO et al., 2010; HACKING et al., 2012). Entretanto, as características topográficas devido o incremento da rugosidade superficial pode ser um empecilho para aplicações em implantes e *brackets*, uma vez que propicia o aumento da colonização bacteriana (TEUGHELIS et al., 2006; GODOY-GALLARDO et al., 2014; WANG et al., 2018). Contudo, alguns estudos mostram que o limiar de rugosidade para não influenciar a adesão bacteriana é de 200 nm (BOLLEN et al., 1996; 1997). Nessa pesquisa, os valores de rugosidade para as superfícies modificadas foram menores do que este valor (**Tabela 7**), mostrando que possivelmente esse parâmetro tenha pouco impacto para a formação de biofilmes bacterianos.

O parâmetro de assimetria também é exibido na **Tabela 7** e quantifica a assimetria da distribuição de altura em uma determinada superfície. Estes resultados mostram que as superfícies Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA possuem valores negativos de assimetria (Ssk ou Rsk) enquanto a Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 apresenta valores positivos. De acordo com Peltonen et al. (2004), o Ssk é zero em uma distribuição Gaussiana, ou seja, uma distribuição simétrica em torno do seu ponto médio. Em distribuições de caráter assimétrico, de valores negativos de Ssk, a superfície é considerada porosa onde perfis de vales são predominantes. Contudo, o oposto ocorre com valores positivos de Ssk, no qual os perfis de pico são dominantes (GODOY-GALLARDO et al., 2014; PELTONEN et al., 2004). Nesse sentido, é possível concluir que a superfície do substrato e com o revestimento de ácido acrílico possuem caráter poroso, visto que $Ssk < 0$. Godoy-Gallardo et al. (2014) verificaram que os valores de assimetria aumentaram nas superfícies modificadas, após funcionalização de uma superfície de titânio com o peptídeo hLf1-11. Esses autores afirmam que o resultado obtido é um indicativo de que uma camada peptídica preenche alguns poros da superfície. Esse mesmo efeito é verificado para a amostra Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 ($Ssk > 0$ para superfície com peptídeo), indicando a presença de JI-2 na superfície em consonância com os dados de FTIR.

Tabela 7 – Parâmetros de rugosidade das superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas

Material	RMS	Sa	Ssk
Ti-6Al-4V	5.3 ± 0.5 nm	3.5 ± 0.4 nm	-1.0 ± 0.2
Ti-6Al-4V/PAA	10.8 ± 0.9 nm	7.5 ± 2.0 nm	-1.3 ± 0.7
Ti-6Al-4V/PAA/JI-2	8.7 ± 0.4 nm	6.1 ± 0.3 nm	0.8 ± 0.2

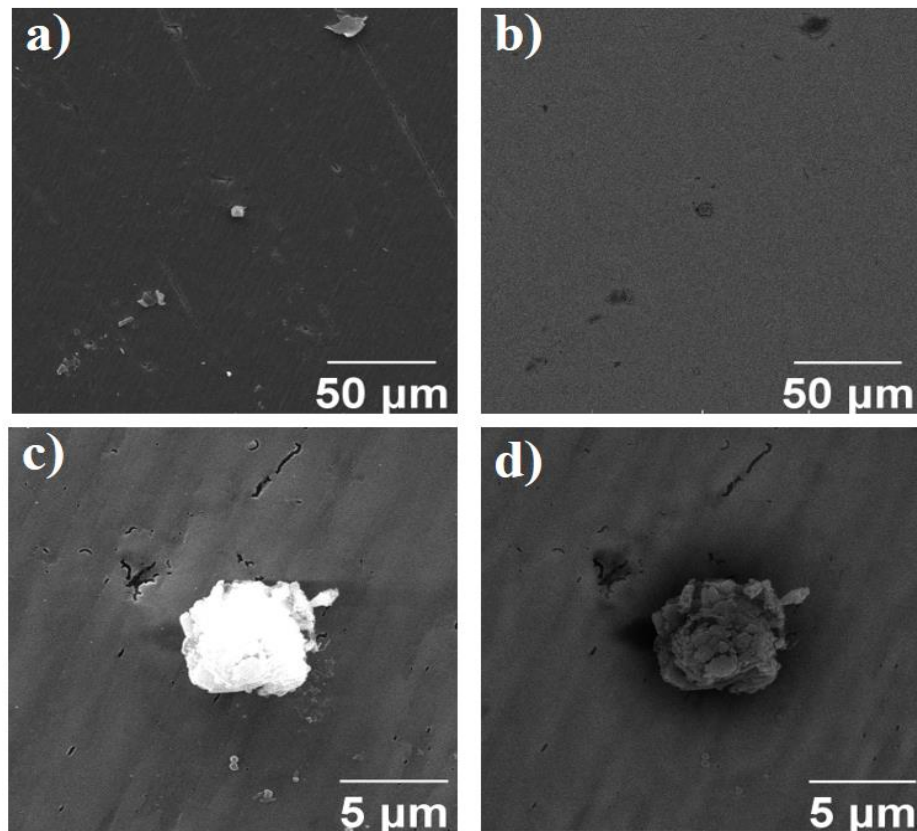
Fonte: da autora, 2023

Nota: Os valores foram calculados para topografias de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$.

A **Figura 26** apresenta a morfologia da superfície Ti-6Al-4V/PAA/JI-2, na qual é possível perceber diferenças nas características superficiais da amostra em relação às demais.

Desta forma, observa-se o aparecimento de alguns aglomerados na superfície, que são similares aos observados por AFM em outras amostras compostas com peptídeo. A **Figura 26 (c) e (d)** mostra com detalhes as características dos aglomerados em magnificações de 10000x. Especificadamente, a **Figura 27 (d)** mostra a composição química do aglomerado apresentado. Desta forma, nota-se a predominância de Ti e C aos arredores da estrutura e uma abundância de oxigênio ao longo dessa estrutura. Esse efeito não é observado nas imagens para as outras superfícies contendo o filme fino, evidenciando que o peptídeo possui a tendência de aglomerar nessa superfície metálica.

Figura 26 – Imagens de MEV para a superfície de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 **(a)** imagem de elétrons secundários com magnitude de 1000x **(b)** imagem de elétrons retroespalhados com magnitude de 1000x **(c)** imagem de elétrons secundários com magnitude de 10000x **(d)** imagem de elétrons retroespalhados com magnitude de 1000x

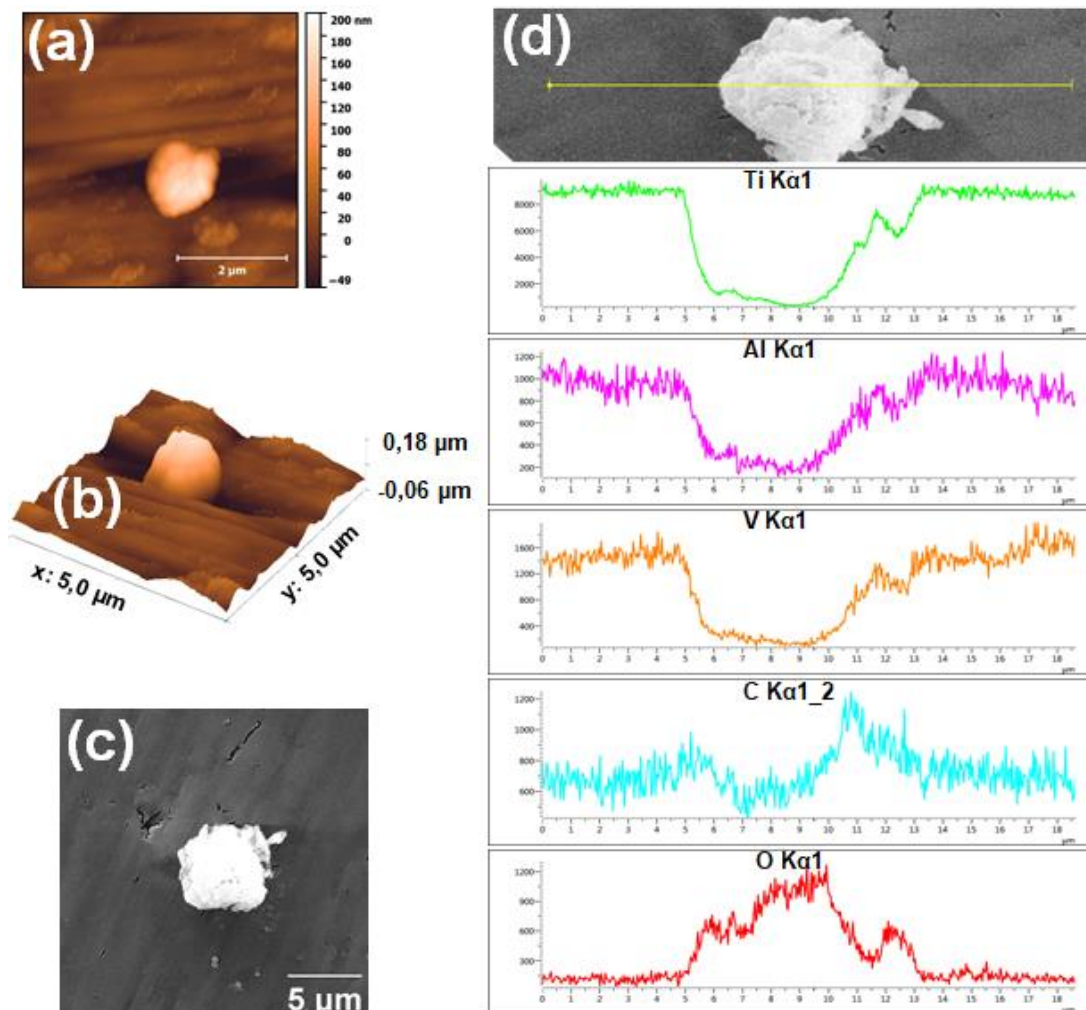


Fonte: da autora, 2023

A **Figura 27** mostra uma comparação entre os aglomerados de peptídeo observados por AFM e MEV em diferentes amostras. Vale ressaltar, que os aglomerados da **Figura 27 (a) e (c)** não possuem a mesma magnitude, porém possuem características topográficas similares. Assim, através dos resultados obtidos pelas análises topográficas e morfológicas associadas aos

parâmetros de rugosidade e de assimetria das superfícies modificadas e não modificadas, verificou-se que o revestimento das superfícies com ácido poliacrílico está presente nas amostras de Ti-6Al-4V/PAA e Ti-6Al-4V/PAA/JI-2. Além disso, os peptídeos tendem a se agregar aleatoriamente em diferentes regiões das amostras. Este efeito pode ser desencadeado por interações peptídeo-peptídeo e pela irregularidade da deposição de PAA na superfície, dando origem a regiões com maior acúmulo de grupos carboxila. Principalmente quando se considera o caráter hidrofílico polianiônico do ácido acrílico polimerizado, que pode favorecer a interação com o peptídeo catiônico (STANKEVICH et al., 2017; BITAR et al., 2018; TRINO et al., 2018).

Figura 27– Análise topográfica e de composição química do aglomerado de peptídeos presentes na liga metálica (a) imagem AFM (5 μm x 5 μm); (b) imagem 3D da superfície; (c) imagem MEV obtida por elétrons secundários e (d) Análise EDX do aglomerado



Fonte: da autora, 2023

5.4 TESTES DE IMERSÃO EM MEIO AGRESSIVO

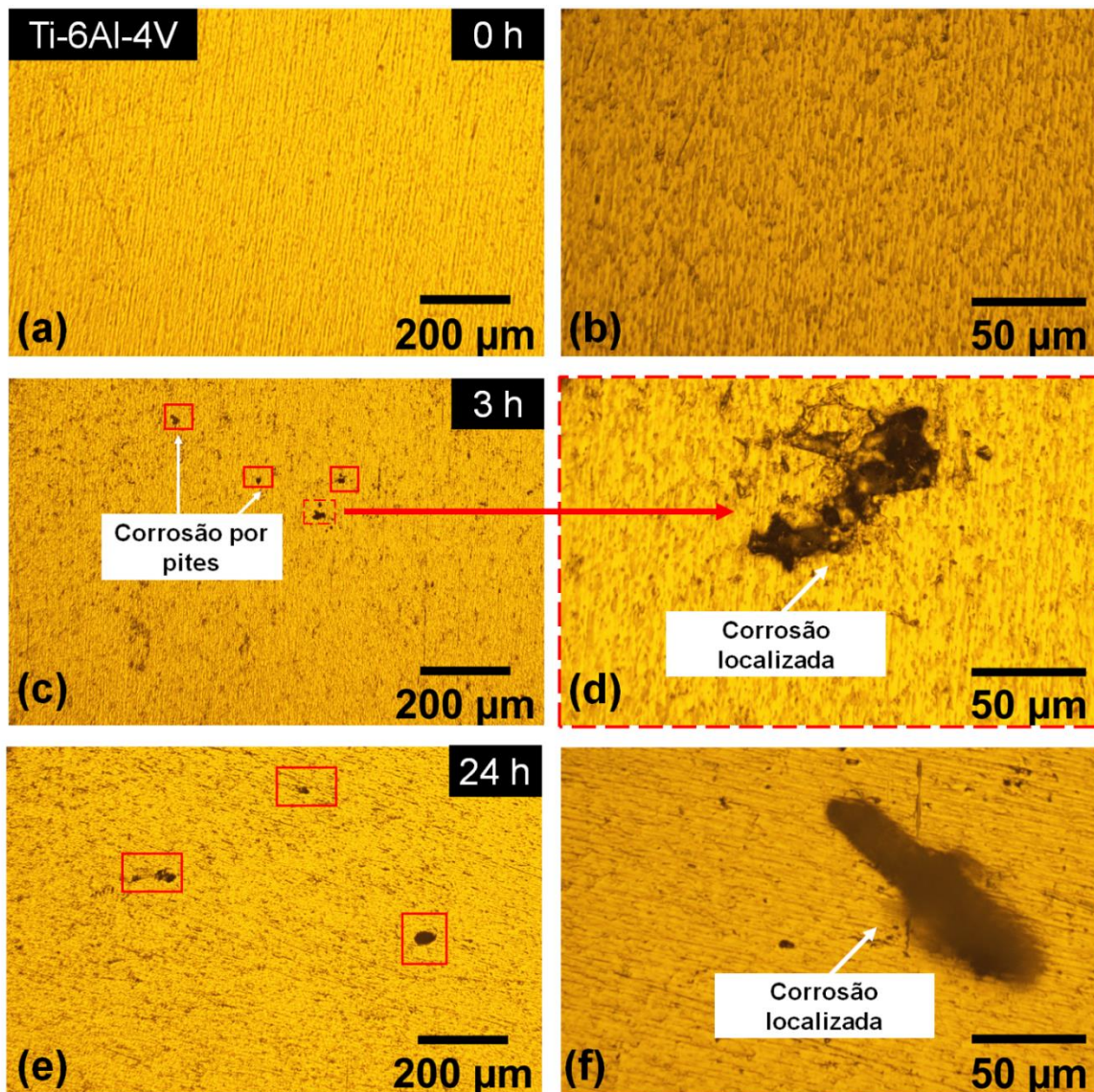
Tendo em vista que a liberação de íons metálicos pode provocar efeitos adversos no organismo (PRANDO et al., 2017), destaca-se que a biocompatibilidade de dispositivos biomédicos está relacionada com a resistência à corrosão desses materiais. Os materiais a base de titânio possuem excelentes propriedades anticorrosivas, que ocorre devido a formação espontânea de uma camada fina de dióxido de titânio (TiO_2) na superfície do material (SIVAKUMAR et al., 2011; MAESTRO et al., 2021). Essa camada tem caráter protetor e concede ao material excelentes propriedades biológicas (LYON, 2012; PANAYOTOV et al., 2015). Apesar disso, esses materiais são suscetíveis a corrosão uniforme e localizada em meios agressivos como o ambiente fisiológico (TRINO et al., 2018). Em outras palavras, muitas vezes a película de TiO_2 formada espontaneamente na superfície da liga Ti-6Al-4V é rompida, permitindo com que os íons agressivos atinjam o substrato e inicie um processo de corrosão localizada.

Com o objetivo de explorar as propriedades de corrosão das superfícies utilizadas neste estudo, realizou-se ensaios de imersão em meio corrosivo 0.1 mol L^{-1} de fluoreto de sódio (NaF) em distintos tempos de imersão (1h, 3h, 10h, 15h e 24h). As superfícies das amostras foram caracterizadas por MO, MEV e EDX. Destaca-se que a escolha dessa solução é atribuída ao efeito dos íons fluoreto, que afetam a estabilidade da camada de óxido passiva de materiais a base de titânio por meio da dissolução do Ti (SIVAKUMAR et al., 2011; PRANDO et al., 2017). Assim, foi possível analisar a estabilidade nesse meio em comparação ao material base das superfícies revestidas com PAA e com o peptídeo nos diferentes tempos de imersão.

As imagens de Microscopia Óptica (MO) das superfícies não funcionalizadas em diferentes tempos de imersão estão representadas na **Figura 28**. Uma visão geral da liga Ti-6Al-4V antes dos testes de imersão é exibida nas **Figuras 28 (a) e (b)**. A **Figura 28 (c)** mostra que a partir de 3 h em meio agressivo, a superfície apresentou algumas áreas degradadas. Essas alterações indicam que a liga Ti-6Al-4V começou a sofrer processos corrosivos localizados nesse intervalo de tempo. De acordo com Gentil (2022), os processos corrosivos podem ser definidos como reações químicas de caráter heterogêneo que possuem diferentes formas e são classificadas considerando a sua aparência, formas de ataque ou seus mecanismos. A forma de corrosão sofrida pelo material nos diferentes tempos de imersão é a corrosão localizada, pois ocorre em regiões isoladas na superfície. Além disso, em 24 h de imersão surgiram alguns orifícios e corrosão localizada por toda a superfície metálica, conforme é visto na **Figura 28 (e) e (f)**. A decorrência desses orifícios é devido a formação de pites. Em particular, o pite é uma

forma de corrosão presente em materiais metálicos e sua produção ocorre em pequenas áreas localizadas formando cavidades de profundidade maior do que seu diâmetro (GENTIL 2022). É de extrema importância mencionar que, a partir do momento que é formado o primeiro pite a sua propagação é catastrófica. Além disso, considerando o comportamento mecânico do biomaterial, os pites atuam como concentradores de tensão e afetam diretamente a vida em fadiga do componente.

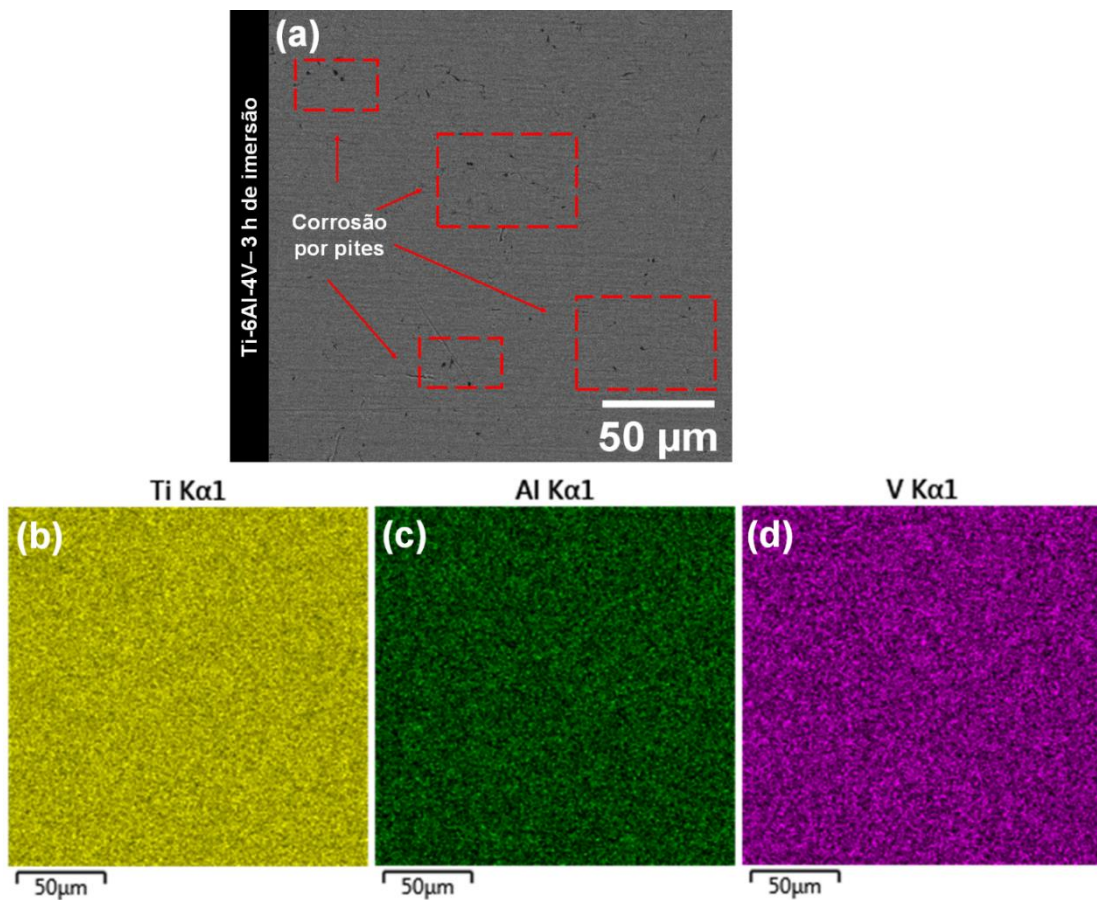
Figura 28 – Microscopia de Ti-6Al-4V em diferentes tempos de imersão (a) antes da imersão em aumento de 10x; (b) antes da imersão aumento de 50x; (c) 3 h de imersão com aumento de 10x; (d) 3 h de imersão com aumento de 50x; (e) 24 h de imersão com aumento de 10x e (f) 24 h de imersão com aumento de 50x



Fonte: da autora, 2023

Esses aspectos de corrosão localizada da superfície não funcionalizada foram analisados por MEV e EDX. A **Figura 29** mostra a composição química da superfície após 3 h de imersão em solução agressiva. A análise morfológica também revela a presença de pites, o que está de acordo com a MO em tempos de imersão equivalentes.

Figura 29 – Imagens de MEV e mapas de EDX das amostras não funcionalizadas expostas a 0.1 mol L^{-1} de NaF durante 3 h **(a)** aspectos morfológicos do substrato; **(b)** região com presença de Ti; **(c)** região com presença de Al; **(d)** região com presença de V

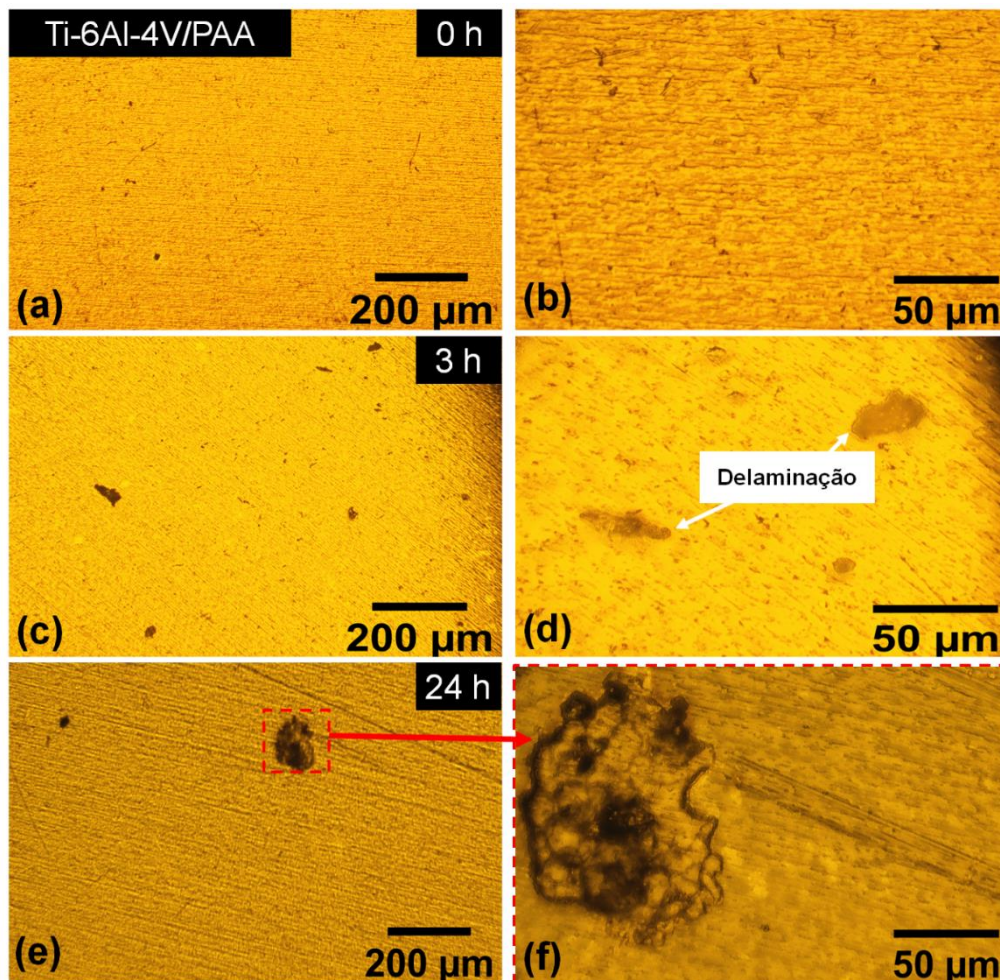


Fonte: da autora, 2023

O comportamento da superfície metálica revestida com filme fino de PAA em diferentes tempos de imersão pode ser observada na **Figura 30**. Assim, é possível verificar que existem diferenças significativas nos efeitos do processo corrosivo em comparação ao material não modificado (Ti-6Al-4V). O material revestido com filme fino (Ti-6Al-4V/PAA) também exibe efeitos decorrentes da ação corrosiva em 3 h de imersão em solução agressiva. Contudo, esse processo é suavizado em comparação com a Ti-6Al-4V nas mesmas condições. Possivelmente, isso é decorrente de que a deposição do filme fino não é completamente homogênea em toda a superfície provocando alguns defeitos no revestimento, conforme foi verificado pelas imagens de AFM e MEV apresentadas anteriormente. Nesse sentido, os íons fluoreto interagem

diretamente com a liga metálica provocando a corrosão localizada. Após 24 h de imersão, observou-se o início de degradação do filme fino que pode estar relacionado com a delaminação do mesmo, isto é, o descolamento do filme do substrato devido à inserção no meio agressivo, **Figura 30 (d)**.

Figura 30 – Microscopia de Ti-6Al-4V/PAA em diferentes tempos de imersão **(a)** antes da imersão em aumento de 10x; **(b)** antes da imersão aumento de 50x; **(c)** 3 h de imersão com aumento de 10x; **(d)** 3 h de imersão com aumento de 50x; **(e)** 24 h de imersão com aumento de 10x e **(f)** 24 h de imersão com aumento de 50x

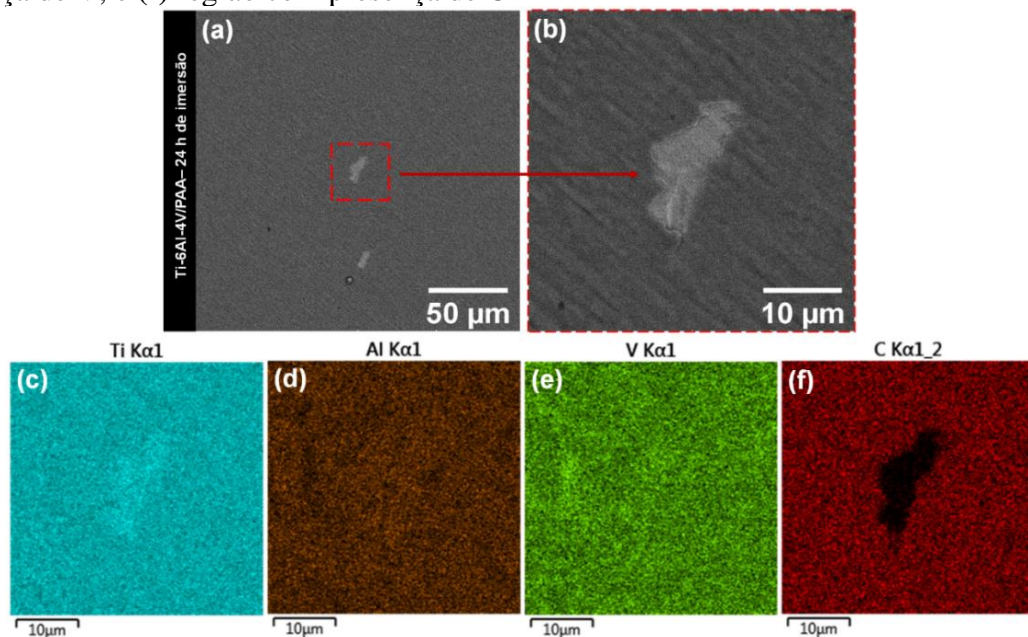


Fonte: da autora, 2023

A delaminação do PAA também foi analisada por MEV e EDX. A **Figura 31** mostra a composição química de uma região da amostra, que também foi submetida a 24 h de imersão em solução de 0.1 mol L^{-1} de NaF. A predominância dos elementos presentes em Ti-6Al-4V/PAA é observada na superfície, conforme mostrado na **Figura 31 (c-f)**. Os mapas EDX demonstraram a ausência de carbono (C) na área delaminada. Por outro lado, há um acúmulo desse elemento no entorno da referida região. Por fim, a ausência de C reflete que nesta região

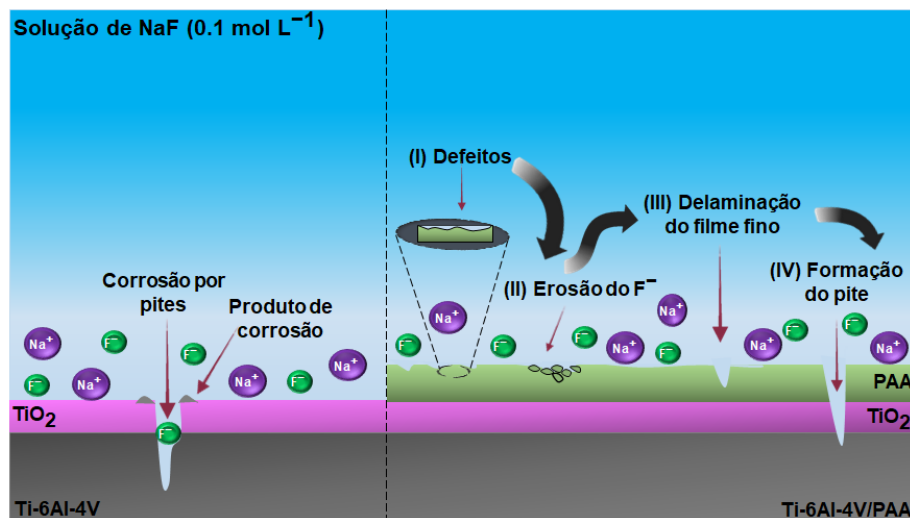
não há vestígios de AA polimerizado e, portanto, corrobora a existência do processo de delaminação. Uma representação esquemática que explica o processo de corrosão localizada, bem como o processo de delaminação para o Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA é mostrada na **Figura 32**.

Figura 31– Imagens de MEV e mapas de EDX das amostras revestidas com ácido acrílico expostas a solução de 0,1 mol L⁻¹ de NaF por 24 h **(a-b)** aspectos morfológicos do material funcionalizado; **(c)** região com presença de Ti; **(d)** região com presença de Al; **(e)** região com presença de V, e **(f)** região com presença de C



Fonte: da autora, 2023

Figura 32 – Desenho esquemático do mecanismo de corrosão proposto para liga Ti-6Al-4V revestida e não revestida

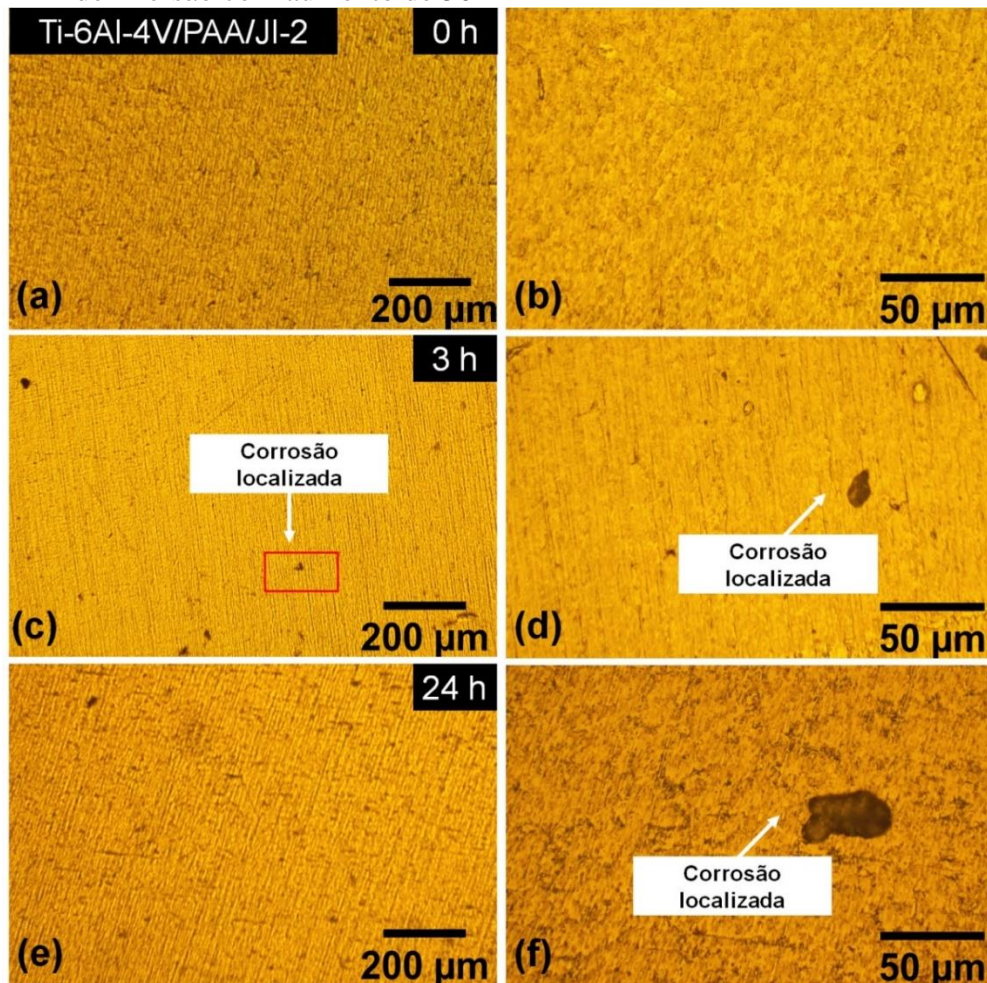


Fonte: da autora, 2023

Apesar das boas propriedades da liga Ti-6Al-4V, a liberação de íons vanádio e alumínio no corpo humano pode estar associada ao surgimento de doenças como Alzheimer e Parkinson (KAWAHARA, KATO-NEGISHI, 2011; NASCIMENTO et al., 2021). Assim, os filmes finos de ácido acrílico polimerizados a plasma agem como barreira protetora à corrosão de implantes (TOPALA et al., 2009; BITAR et al., 2018). A barreira protetora de filmes finos de PAA contra a corrosão do implante pode ser encontrada na literatura para diferentes substratos (de GIGLIO et al., 2007; BITAR et al., 2018). de Giglio et al. (2007) realizaram a deposição de PAA em folhas de Ti-6Al-4V por meio de polimerização eletroquímica, visando aprimorar as propriedades dessa liga. Para investigar as propriedades corrosivas, foram realizados testes de imersão em uma solução de 0.17 M de cloreto de sódio (NaCl) e 0.0027 M de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O protocolo de imersão adotado pelos autores consistiu em verificar a liberação de íons metálicos no referido meio agressivo por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que os filmes finos de ácido poliacrílico atuam como uma barreira protetora contra a corrosão neste material, indicando que o revestimento reduz a liberação de íons metálicos no meio (de Giglio et al., 2007). Alguns trabalhos demonstraram a eficiência do PAA contra a corrosão, considerando outros materiais e meios agressivos. Umoren et al. (2010) investigaram utilizando métodos eletroquímicos, as características corrosivas de alumínio puro revestido de PAA em ácido sulfúrico H₂SO₄. Nessas condições, esses autores verificaram que o ácido acrílico inibe a corrosão deste material metálico no meio agressivo estudado. Nesse sentido, além do PAA ser um elemento crucial para promover a imobilização do peptídeo na liga Ti-6Al-4V, o revestimento possui efeito protetor nas superfícies do Ti-6Al-4V.

Em relação às superfícies nas quais o peptídeo é imobilizado, as imagens de OM para testes de imersão são mostradas na **Figura 33**. Com isso, é possível perceber que há um processo de corrosão muito semelhante às amostras de Ti-6Al-4V/PAA. Portanto, regiões de delaminação no filme são observadas ao longo desta superfície após 3 h de imersão, **Figura 33 (d)**. Conforme enfatizado anteriormente, a delaminação nessas amostras ocorre devido à presença de irregularidades na superfície do metal após a deposição do PAA. No entanto, a presença de *pitting* é observada apenas no material nu nas primeiras horas de imersão, mostrando mais uma vez que o revestimento de PAA atua como uma barreira protetora para a liga Ti-6Al-4V.

Figura 33 – Microscopia de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 em diferentes tempos de imersão (a) antes da imersão ampliação de 10x; (b) antes da imersão aumento de 50x; (c) 3 h de imersão com aumento de 10x; (d) 3 h de imersão com aumento de 50x; (e) 24 h de imersão com aumento de 10x e (f) 24 h de imersão com aumento de 50x



Fonte: da autora, 2023

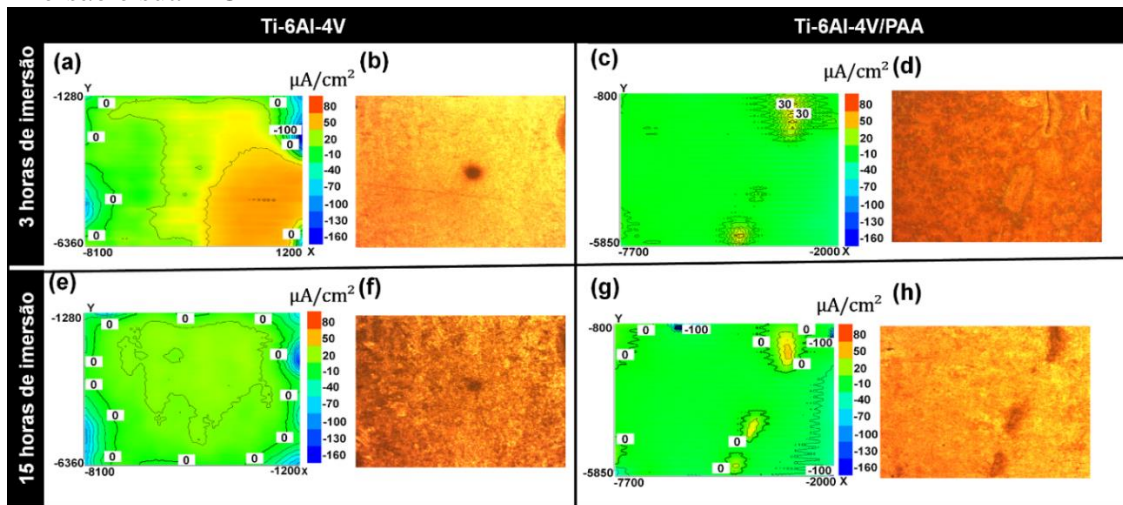
5.5 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS LOCALIZADOS

Conforme mencionado anteriormente, foi realizado em colaboração com grupo da professora Dra. Idalina Vieira Aoki da Universidade de São Paulo (USP) um teste de corrosão localizada por meio da técnica SVET em 0.01 mol L^{-1} de solução de NaF à temperatura ambiente em distintos tempos de imersão. Os mapas de SVET da liga Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V/PAA, Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 no início da exposição e após 15 h em solução de NaF 0.01 mol L^{-1} , bem como a imagem de MO das respectivas superfícies são exibidas na **Figura 34** e na **Figura 35**. Como pode ser visto, o material base (vide **Figura 34 (a)**) apresentou atividade eletroquímica nas primeiras horas de imersão. À medida que o tempo de imersão aumenta, os sítios ativos se movem ao longo da superfície exposta, conforme representado pela **Figura 34**

(e) para as 15 h de imersão. As imagens de MO dos tempos de imersão mencionados podem ser vistas na **Figura 34 (b, f)**, respectivamente. Os substratos de Ti-6Al-4V/PAA demonstraram melhor desempenho ao processo de corrosão localizada quando comparados ao material base (**Figura 34 (c)**) em meio agressivo contendo íons F⁻. Este resultado foi observado ao longo do teste conforme mostrado na **Figura 34 (g)**. Em outras palavras, o ácido acrílico atua como uma barreira protetora contra o processo de corrosão localizada. Esses resultados estão de acordo com as análises morfológicas, mostrando que a região mais suscetível à corrosão localizada são as irregularidades no filme do processo de deposição via PECVD. Esta informação é confirmada com imagens MO (**Figura 34 (d, h)**). Além disso, os resultados de SVET estão de acordo com os obtidos no teste de imersão, conforme discutido acima.

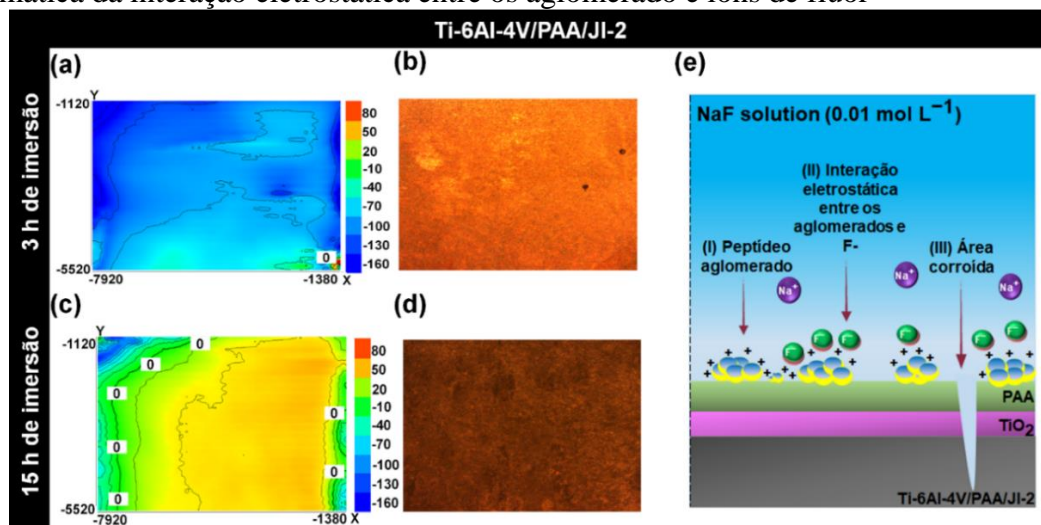
Em relação ao Ti-6Al-4V/PAA/JI-2, houve uma sucessão de eventos ocorrendo e a mudança entre o comportamento catódico e anódico em pontos específicos conforme apresentado na **Figura 35 (a, c)**. Esses achados provavelmente são devidos à presença de vários aglomerados observados em regiões distintas das superfícies contendo o peptídeo imobilizado como pode ser observado na **Figura 35 (b, d)**. Considerando o caráter catiônico dos peptídeos, é possível elucidar que o processo de corrosão é intensificado devido à atração eletrostática entre os íons F⁻ e os aglomerados ricos em peptídeos **Figura 35 (e)**. Em consonância com isso, Trino e colaboradores conseguiram correlacionar boas propriedades de corrosão de superfícies de Ti onde os peptídeos osteogênicos são imobilizados homogeneamente (TRINO et al., 2018). O mecanismo de corrosão proposto e apresentado na **Figura 32** é suportado pelos resultados dos testes de SVET.

Figura 34 – Distribuição de densidade de corrente para Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA (a-b) Ti-6Al-4V em 3 h de imersão e sua correspondente MO; (c-d) Ti-6Al-4V/PAA em 3 h de imersão e sua MO; (e-f) Ti-6Al-4V em 15 h de imersão e sua MO; (g-h) Ti-6Al-4V/PAA em 15 h de imersão e sua MO



Fonte: da autora, 2023

Figura 35 – Distribuição de densidade de corrente para Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a-b) em 3 h de imersão e sua respectiva MO; (c-d) em 15 h de imersão e sua MO; (e) representação esquemática da interação eletrostática entre os aglomerado e íons de flúor



Fonte: da autora, 2023

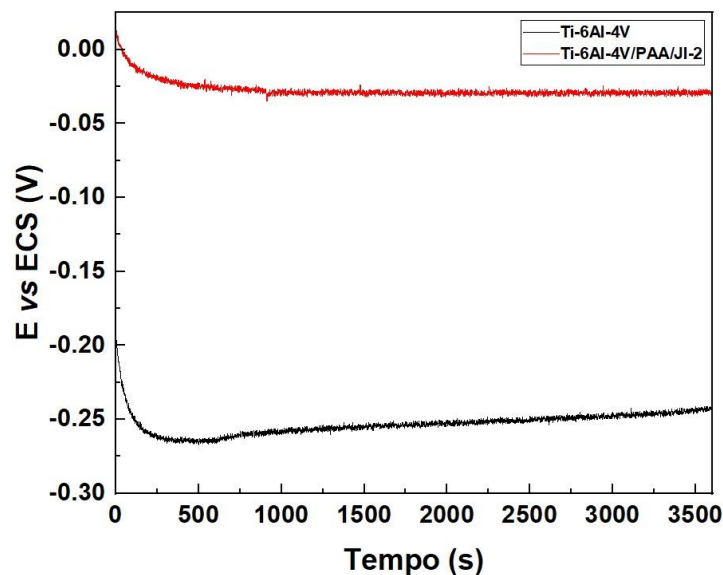
5.6 ENSAIOS ELETROQUÍMICOS GLOBAIS

5.6.1 Potencial de Circuito Aberto (OCP)

O comportamento corrosivo dos espécimes Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 também foi investigado via as técnicas de OCP e EIS, respectivamente. Em vista disso, a técnica de OCP permite compreender a estabilidade termodinâmica de um dado material quando

submetido a um meio agressivo (WU et al., 2018). Basicamente, o OCP é uma técnica não destrutiva obtida pela diferença de potencial entre a superfície metálica de estudo (eletrodo de trabalho) e o eletrodo de referência (MISCHLER; MUNOZ, 2017). As curvas representativas da evolução do potencial de circuito aberto (E_{OCP}) com o tempo de imersão para as amostras Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 são apresentadas na **Figura 36**. Considerando o material base, o E_{OCP} estabiliza-se em aproximadamente -0.24 V. Mahlobo et al. (2022) avaliaram a resistência a corrosão da liga Ti-6Al-4V fabricada via técnica de laminação de pó em várias soluções simuladas do corpo humano (0.6 mol L^{-1} de NaCl, solução salina balanceada de Hank, bem como a solução de Ringer). Os resultados obtidos por Mahlobo e colaboradores estão de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho (-0.26 V vs. Ag/AgCl) comparado com (-0.24 V vs. Hg/Hg₂Cl₂,KCl_{sat}). As superfícies contendo o peptídeo JI-2 foram mais estáveis desde o início da imersão atingindo aproximadamente 0.03 V após 700 s. Esse mesmo comportamento foi encontrado por Trino et al. (2018), em que foi comparado os testes de OCP de titânio puro e titânio revestidos com peptídeos da DMP1. A partir disso, é possível concluir que o processo de inserção do peptídeo no sistema desloca o potencial para valores menos negativos. Estes achados indicam, em um primeiro momento, que o material funcionalizado apresenta uma melhor estabilidade termodinâmica quando comparado ao material base.

Figura 36 – Medidas de OCP em 0.6 mol L^{-1} de NaCl para as amostras de Ti-6Al-4V e Ti-6Al-4V/PAA/JI-2



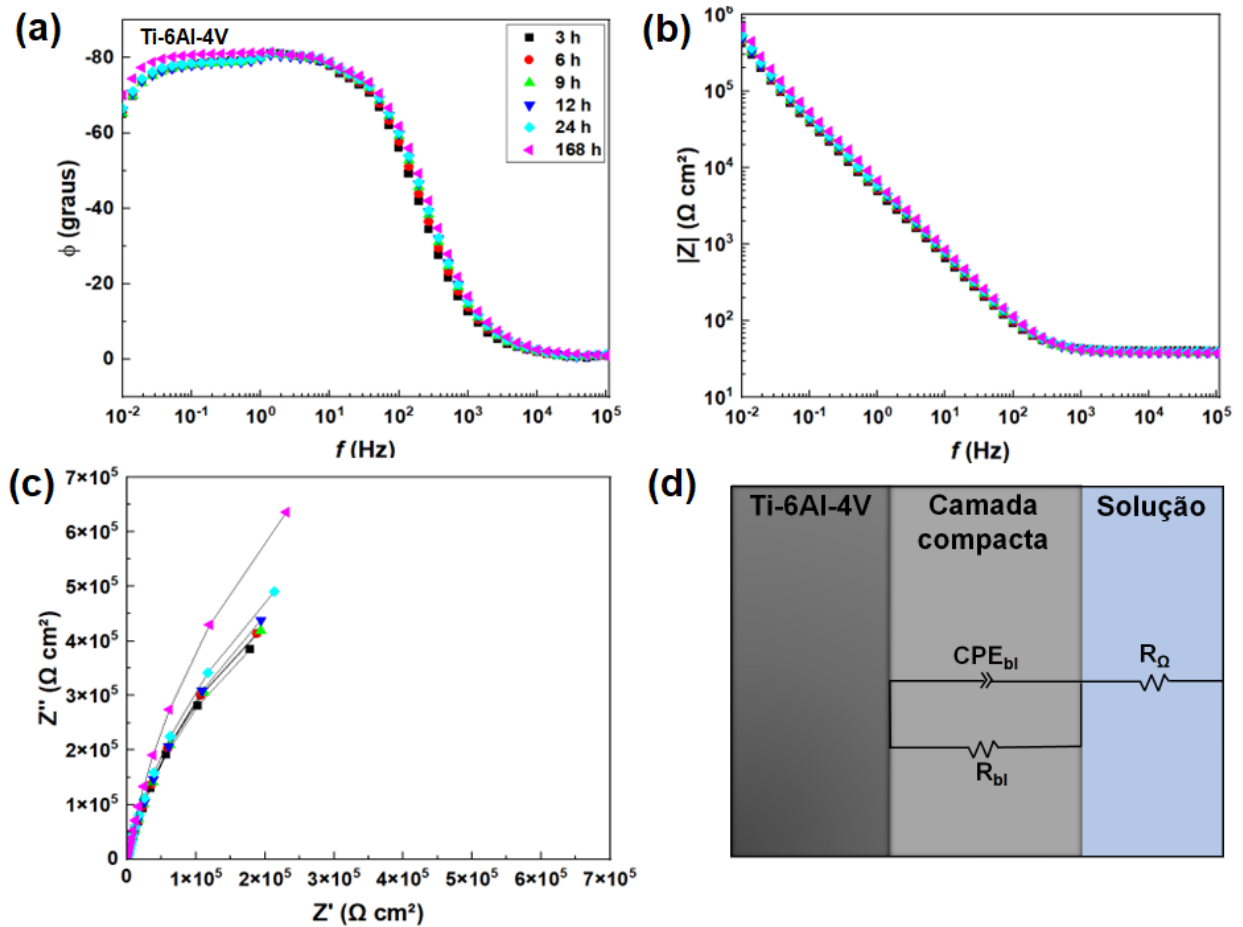
Fonte: da autora, 2023

5.6.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma técnica não destrutiva importante para a caracterização de sistemas eletroquímicos (CIUCCI et al., 2019; FERREIRA et al., 2023). Nesta perspectiva, a técnica de EIS foi utilizada no presente trabalho para compreender a influência do filme passivo de TiO_2 e dos revestimentos de PAA/JI-2 nos processos de corrosão global da liga Ti-6Al-4V em meio contendo íons cloreto. É importante mencionar, que a consistência dos dados de EIS e a conformidade com os critérios de validação para essas medidas foram avaliados utilizando a transformada de Kramers-Kronig (KK). A **Figura 37** mostra os espectros de EIS obtidos para a liga Ti-6Al-4V em diferentes tempos de imersão. Esses resultados são apresentados pelos diagramas de Bode (**Figura 37 (a,b)**) e Nyquist (**Figura 37 (c)**). Assim, é possível perceber que não houve mudanças espectrais significativas, independentemente do tempo de imersão. Em regiões de frequência intermediária do espectro, é possível verificar que o ângulo de fase permaneceu próximo a -90° . A literatura indica que esse comportamento é relacionado a boa resposta capacitiva da liga metálica (TAMILSELVI et al., 2006; ASSIS; COSTA, 2007; VASILESCU et al., 2009; MAESTRO et al., 2021). Assis e Costa (2007) avaliaram as propriedades eletroquímicas de diferentes ligas de titânio (Ti-13Nb-13Zr, Ti-6Al-7Nb e Ti-6Al-4V) após longos períodos de imersão em solução de Hank. Em 410 dias de imersão, não foram observadas mudanças nos espectros EIS para qualquer uma das ligas estudadas, mostrando a alta resistência à corrosão desses materiais na solução de Hank. As observações desses autores corroboram com os resultados aqui encontrados, nos quais não houve alterações nos espectros do EIS após longos períodos de imersão. Aliás, esses achados são bem conhecidos para a liga Ti-6Al4V, pois os produtos da corrosão acabam selando áreas eletroativas e aumentando os valores do módulo de impedância da liga mencionada.

Para descrever o comportamento corrosivo da liga Ti-6Al-4V, o circuito elétrico equivalente (CEE) presente na **Figura 37 (d)** foi utilizado. O CEE adotado para as amostras Ti6Al-4V também é utilizado por outros trabalhos da literatura que buscam entender as propriedades eletroquímicas deste material em diferentes eletrólitos (HSU et al., 2004; ZAVERI, et al., 2008). Desta forma, os componentes desse circuito são: resistência da solução (R_Ω), a resistência de polarização da camada de barreira (R_{bl}) bem como um elemento de fase constante responsável pela capacitância da camada barreira (CPE_{bl}).

Figura 37 – Medidas de EIS em 0.6 mol L⁻¹ de solução de NaCl para Ti-6Al-4V (a, b) Espectro de Bode, (c) diagrama de Nyquist e (d) circuito elétrico equivalente utilizado para simulação dos dados de EIS



Fonte: da autora, 2023

O comportamento desse material não é totalmente capacitivo, por isso foi necessário usar um elemento de fase constante (CPE) no circuito equivalente (MAESTRO et al., 2021). Assim, a impedância do CPE pode ser definida pela **Equação 1** abaixo:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Y_0(j\omega)^n} \quad (1)$$

Y_0 é a admitância e $-1 \leq n \leq 1$, os valores de n são diretamente relacionados à distribuição de corrente não uniforme na superfície do material, que pode ser atribuído a presença de defeitos, bem como rugosidade. A **Tabela 8** mostra os resultados obtidos para o ajuste feito para a liga Ti-6Al-4V não funcionalizada. Nesse sentido, todos os ajustes realizados mostraram uma boa correlação com valores de χ^2 na ordem de 10^{-4} (MAESTRO et al. 2021). É possível ver na **Figura 38**, que os valores de R_{Ω} permanecem praticamente constante e conforme relatado por Moreto et al. (2014), esse efeito pode estar diretamente relacionado com a distância entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência que é mantido constante durante os testes

eletroquímicos. Com o aumento do tempo de imersão, há uma redução nos valores de CPE_{bl} e, conseqüentemente, um aumento de R_{bl} (**Figura 38 (b,c)**). A princípio, com o aumento do tempo de imersão, o filme fino de TiO_2 acaba selando as áreas eletroativas e melhorando a resistência a corrosão da liga Ti-6Al-4V. Por um outro lado, considerando que o mais importante do que os valores de CPE_{bl} são as informações mecanicista, pode-se inferir que os valores de CPE_{bl} podem ser vistos como capacitâncias. Assim, a diminuição dos valores de capacitância com o tempo de imersão está relacionada com a selagem de áreas eletroativas e o aumento da espessura do TiO_2 na superfície do material.

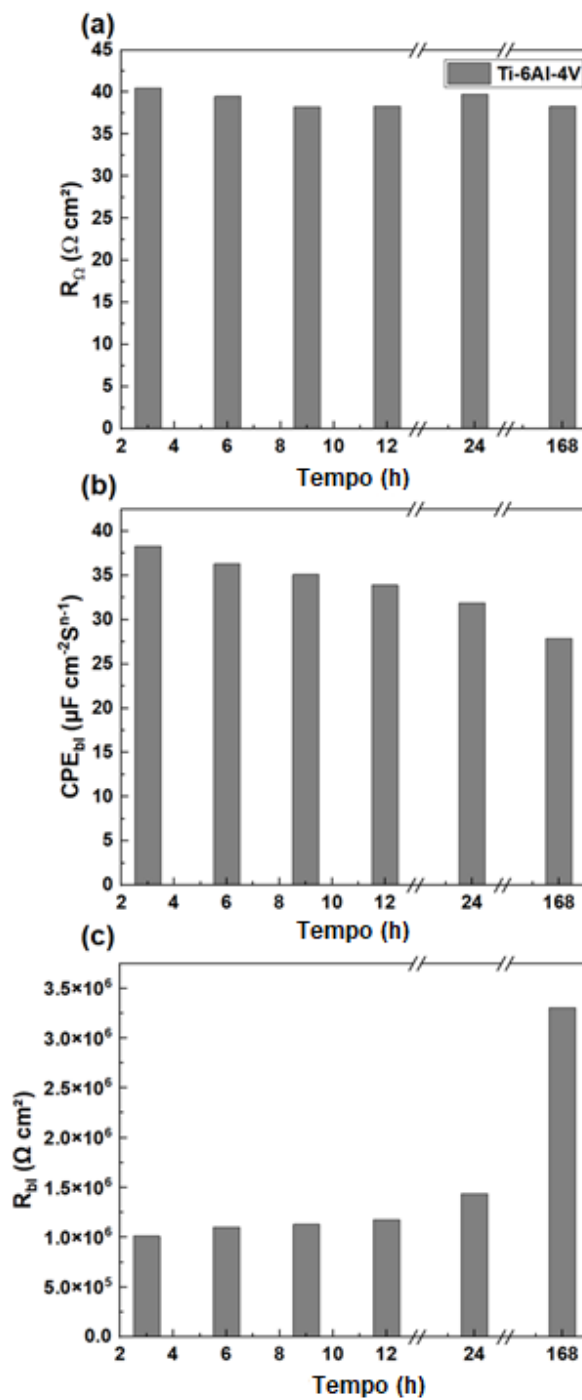
Tabela 8 – Valores dos parâmetros EIS obtidos pelo CEE para a liga Ti-6Al-4V

Tempo de imersão	R_{Ω} (Ω cm ²)	CPE_{bl} (μF cm ⁻² S ⁿ⁻¹)	n	R_{bl} (Ω cm ²)
3 h	40.49	38.30	0.88	1.01x10 ⁶
6 h	39.48	36.30	0.89	1.10 x10 ⁶
9 h	38.27	35.10	0.89	1.13 x10 ⁶
12 h	38.35	33.90	0.89	1.17 x10 ⁶
24 h	39.70	31.20	0.89	1.46 x10 ⁶
168 h	38.28	27.80	0.90	3.30 x10 ⁶

Fonte: da autora, 2023

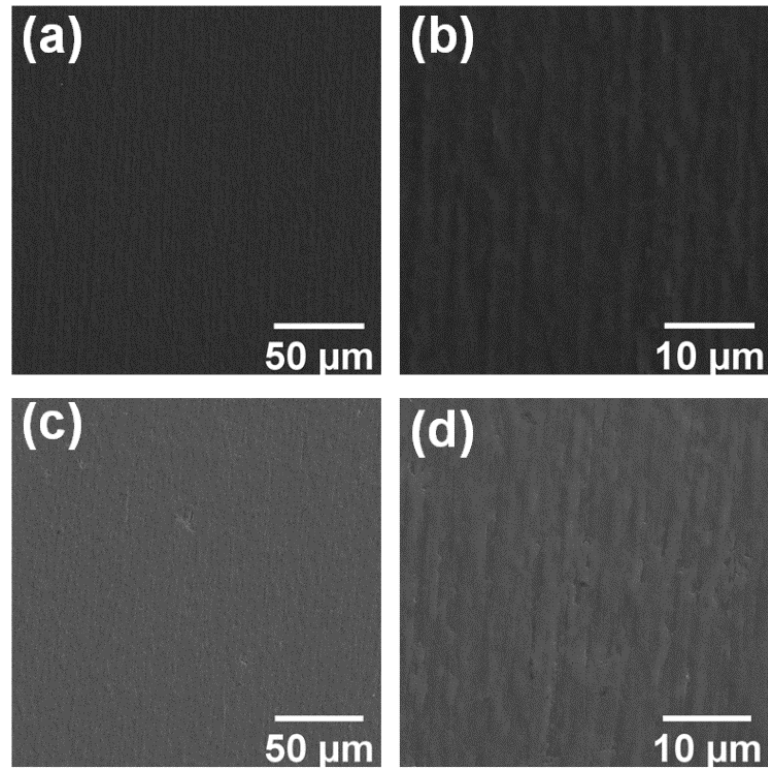
A **Figura 39** mostra a morfologia da liga Ti-6Al-4V antes e após dos testes de EIS expostos durante 168 h em solução de 0.6 mol L⁻¹ de NaCl. As imagens de MEV para esse substrato, não demonstraram nenhum ataque visível de corrosão. Esses achados corroboram com os resultados de EIS apresentados na **Figura 38**, mostrando a boa resistência para os processos de corrosão em todos os tempos de imersão da liga Ti-6Al-4V. As análises de EDX das superfícies de Ti-6Al-4V (vide **Figura 40 (a,b)**) sugerem que não ocorreram mudanças na composição química das amostras após os testes de EIS.

Figura 38 – Valores dos parâmetros de EIS para a liga Ti-6Al-4V (a) R_{Ω} , (b) CPE_{bl} , (c) R_{bl} em função do tempo de imersão



Fonte: da autora, 2023

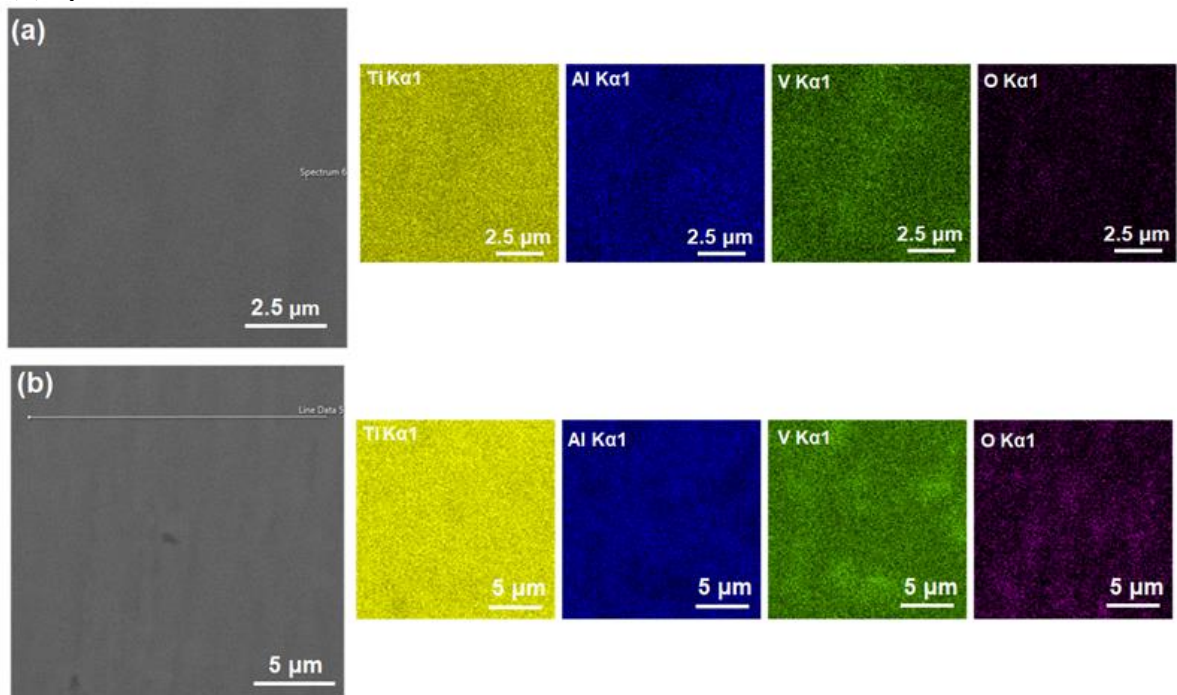
Figura 39 – Características morfológicas das superfícies não revestidas antes e após ensaios de EIS **(a-b)** antes dos ensaios EIS, e **(c-d)** após os ensaios EIS



Fonte: da autora, 2023

Nota: As imagens foram obtidas por elétron secundário (SE) em ampliações de 1000 e 5000x

Figura 40 – Análise da composição química da superfície não revestida **(a)** antes dos testes EIS, e **(b)** após os testes EIS



Fonte: da autora, 2023

Os resultados de EIS para Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 são mostrados na **Figura 41 (a-c)**. Uma visão geral do espectro de EIS indica duas constantes de tempo: uma relacionada à camada interna em baixas frequências, e a segunda referente à camada externa em altas frequências. Como mostrado, os módulos EIS diminuem com o tempo de imersão, indicando uma remoção do Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 nas superfícies da liga metálica. Os substratos funcionalizados apresentaram ângulo de fase próximo a -60° , para a faixa de frequências mais baixas (10^{-2} – 10^{-1} Hz) durante todo o tempo de imersão.

O CEE utilizado para o ajuste de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 é apresentado na **Figura 42**. O CEE é composto pela resistência da solução (R_Ω), a resistência da camada de barreira (R_{bl}), resistência adicional da solução dentro dos poros (R'_p), um elemento de fase constante contabilizando a capacitância da camada de barreira (CPE_{bl}), bem como um elemento de fase constante da camada porosa (CPE_{pl}).

Figura 41 – Medidas de EIS em 0.6 mol L^{-1} de solução de NaCl para Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a, b) Espectro de Bode, (c) diagrama de Nyquist

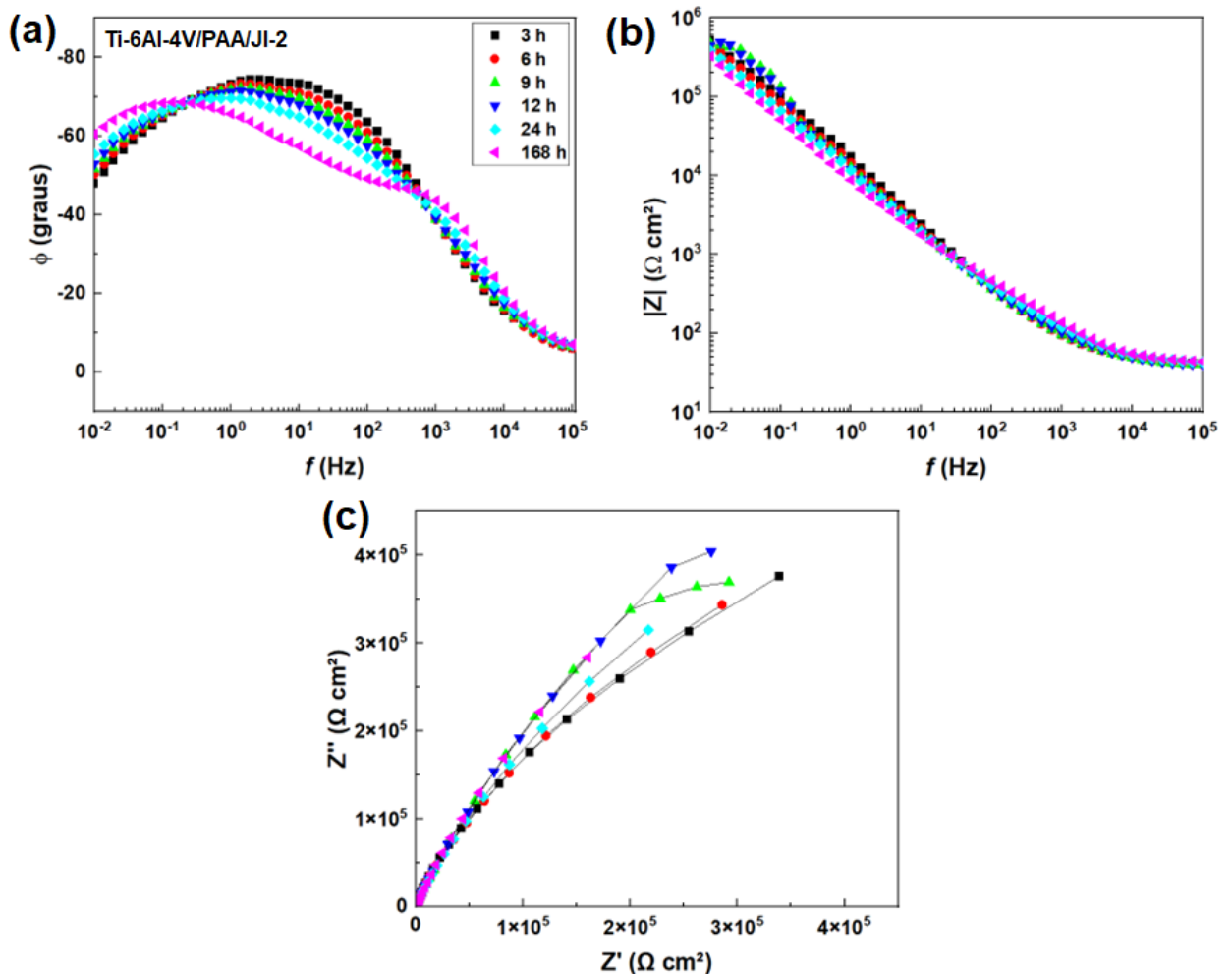
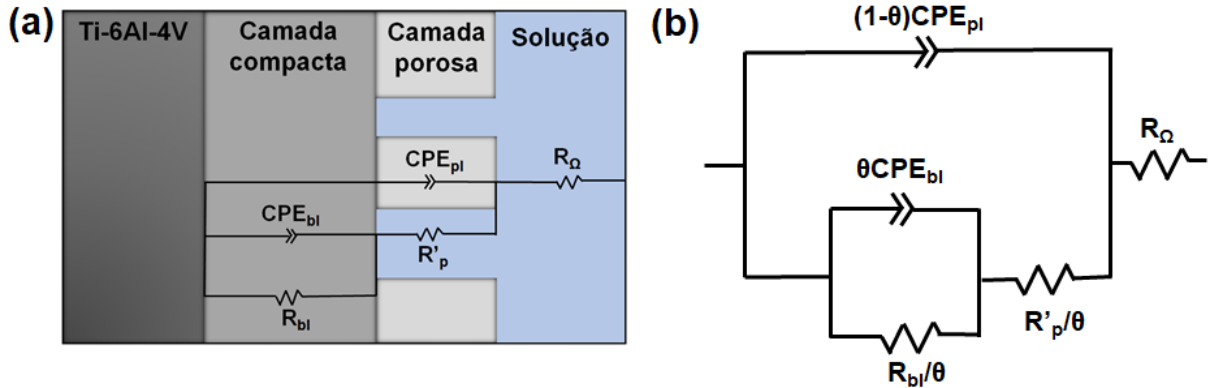


Figura 42 – Representação esquemática da corrosão (a) CEE proposto por Jüttner (1990), e (b) CEE utilizado para ajuste dos dados experimentais propostos por Kendig e Mansfeld (1982)



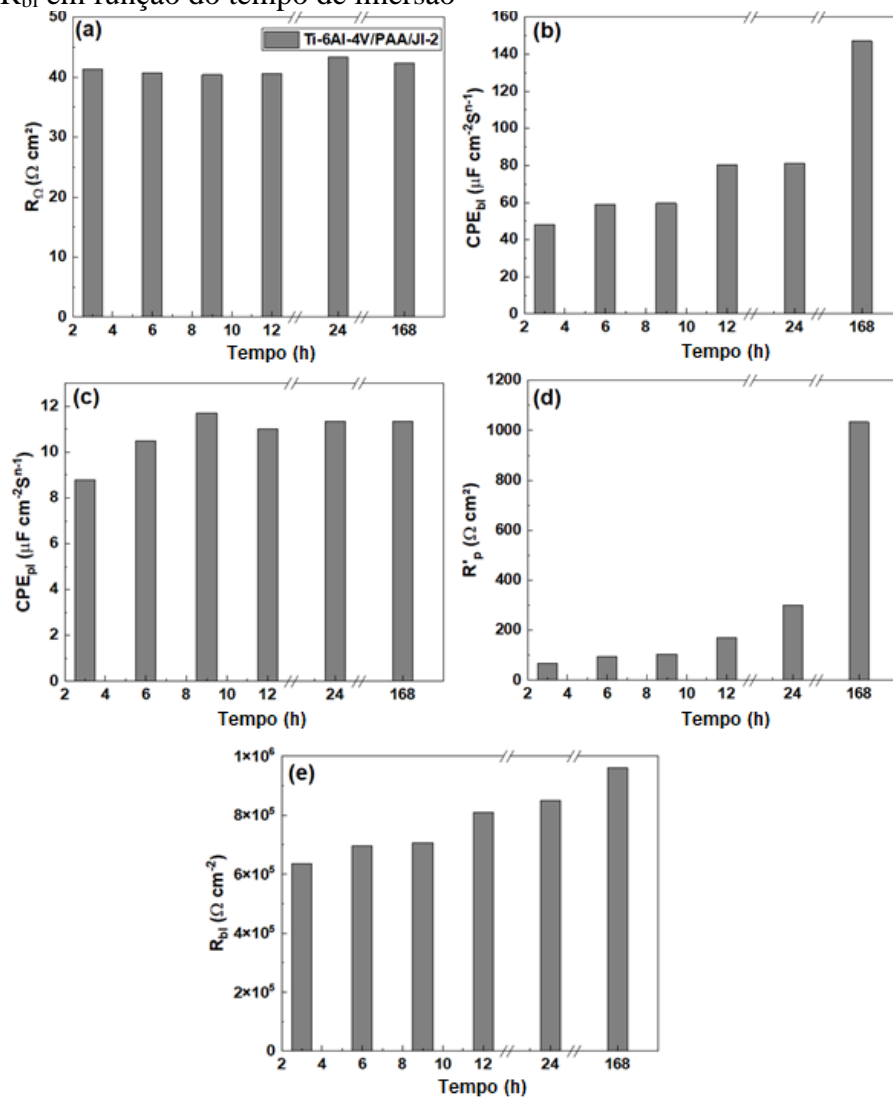
Fonte: da autora, 2023

A **Tabela 9** apresenta os parâmetros obtidos pelo ajuste dos espectros de EIS para os espécimes de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2. Os valores de n_{bI} estão entre 0.73-0.85, enquanto os valores de n_{pi} estão entre 0.75-0.80. Os valores da resistência da solução são próximos ($R_{\Omega} = 41.48 \pm 0.92 \Omega \text{ cm}^2$) e como discutido anteriormente isso é o esperado. Como pode ser visto na **Tabela 9**, a resistência da camada de barreira (R_{bI}) apresenta valores mais elevados quando comparado com resistência adicional da solução dentro dos poros (R'_p), sugerindo um melhor desempenho à corrosão (vide **Figura 43**). A **Figura 44** mostra o ajuste realizado em 3 h de imersão para os espécimes revestidos e não revestidos, mostrando a qualidade do ajuste, bem como a boa escolha do CEE. A **Figura 45** mostra a comparação dos valores de módulo de impedância em função do tempo de imersão dos materiais de estudo. É possível notar que em até 5 h de imersão, o revestimento com peptídeo apresenta um maior valor de módulo de impedância do que em relação ao material base. No entanto, esses valores diminuem chegando a $3.26 \times 10^{-5} \Omega \text{ cm}^2$ em 168 h de imersão. Esta observação pode estar relacionada com a remoção do revestimento PAA/JI-2 das superfícies do material metálico. Por outro lado, o material de base apresentou um comportamento inverso e, provavelmente, esse achado se deve à formação do filme fino de TiO_2 na superfície metálica, atingindo um valor em torno de $6.77 \times 10^{-5} \Omega \text{ cm}^2$ em 168 h de imersão.

Tabela 9 – Valores dos parâmetros EIS obtidos pelo CCE para Ti-6Al-4V/PAA/JI-2

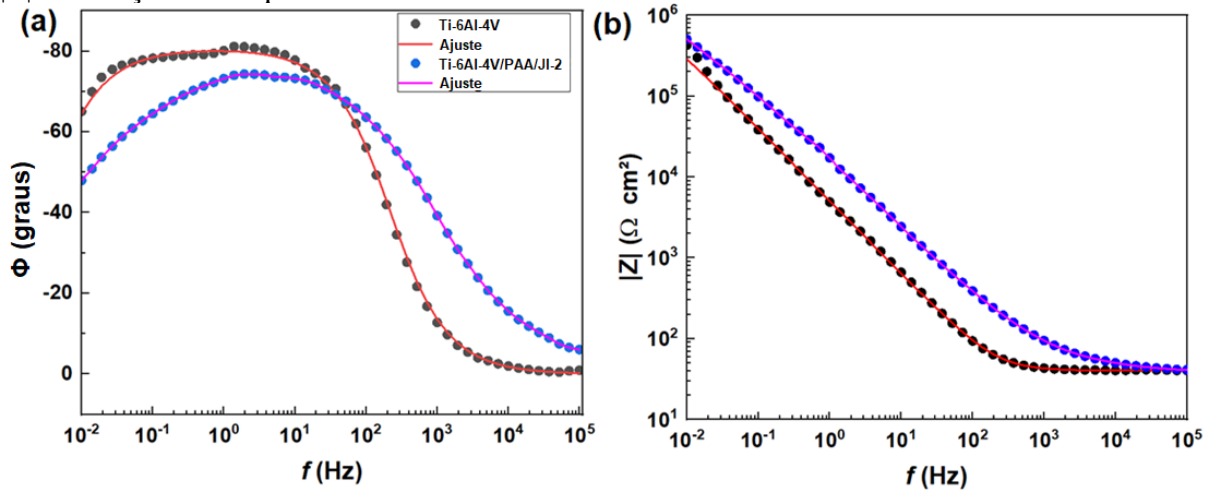
Tempo de imersão	R_{Ω} ($\Omega \text{ cm}^2$)	CPE_{bl} ($\mu\text{F cm}^{-2}\text{S}^{n-1}$)	n_{bl}	CPE_{pl} ($\mu\text{F cm}^{-2}\text{S}^{n-1}$)	n_{pl}	R'_p ($\Omega \text{ cm}^2$)	R_{bl} ($\Omega \text{ cm}^2$)
3 h	41.32	48.30	0.85	8.79	0.80	67.44	6.35×10^5
6 h	40.77	59.00	0.84	10.50	0.78	94.55	6.95×10^5
9 h	40.43	59.60	0.84	11.70	0.78	104.90	7.07×10^5
12 h	40.63	80.40	0.81	11.00	0.78	169.50	8.09×10^5
24 h	43.34	81.20	0.80	11.33	0.79	300.30	8.49×10^5
168 h	42.38	147.00	0.73	11.34	0.77	1033.00	9.60×10^5

Fonte: da autora, 2023

Figura 43 – Valores dos parâmetros de EIS de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a) R_{Ω} (b) CPE_{bl} (c) CPE_{pl} (d) R'_p (e) R_{bl} em função do tempo de imersão

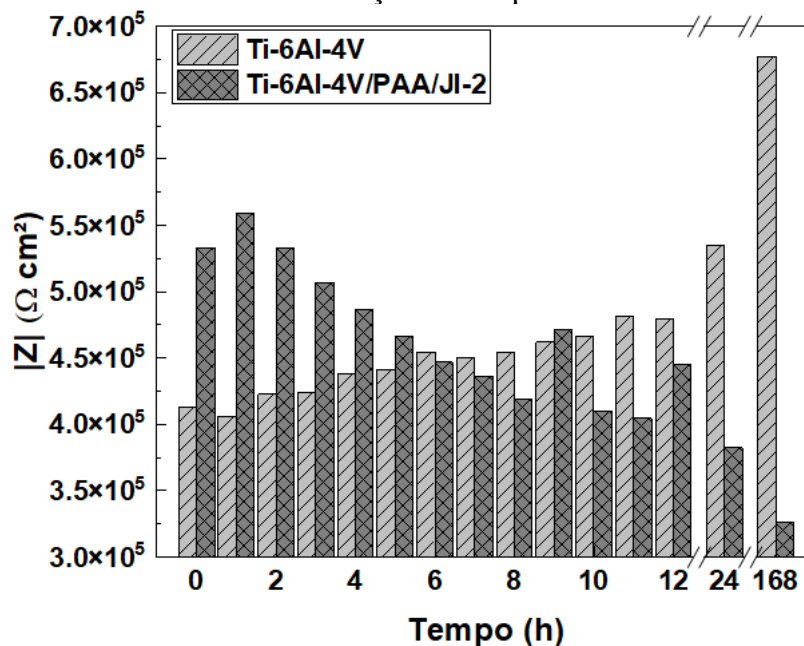
Fonte: da autora, 2023

Figura 44 – Ajustes obtidos em 3 h de imersão em 0.6 mol L⁻¹ de NaCl (a) ângulo de fase (b) $|Z|$ em função da frequência



Fonte: da autora, 2023

Figura 45 – Variações nos valores do módulo de impedância obtidos em 0.01 Hz para material funcionalizado e não funcionalizado em função do tempo de imersão



Fonte: da autora, 2023

A resistência a corrosão global da liga Ti-6Al-4V-1Zr em comparação com a liga Ti-6Al-4V em solução de Ringer-Brown e saliva artificial de Carter-Brugirard em diferentes valores de pH foi estudado por Poppa et al. (2010). Os resultados apresentados pelos autores confirmam os obtidos no presente trabalho, demonstrando o parâmetro R_{bl} apresenta uma melhor resistência ao processo de corrosão em meio contendo íons cloreto quando comparado com o R'_p . Os resultados obtidos por Toptan et al. (2019) estão em consonância com os resultados aqui obtidos. Os autores citados estudaram o comportamento corrosivo da liga Ti-

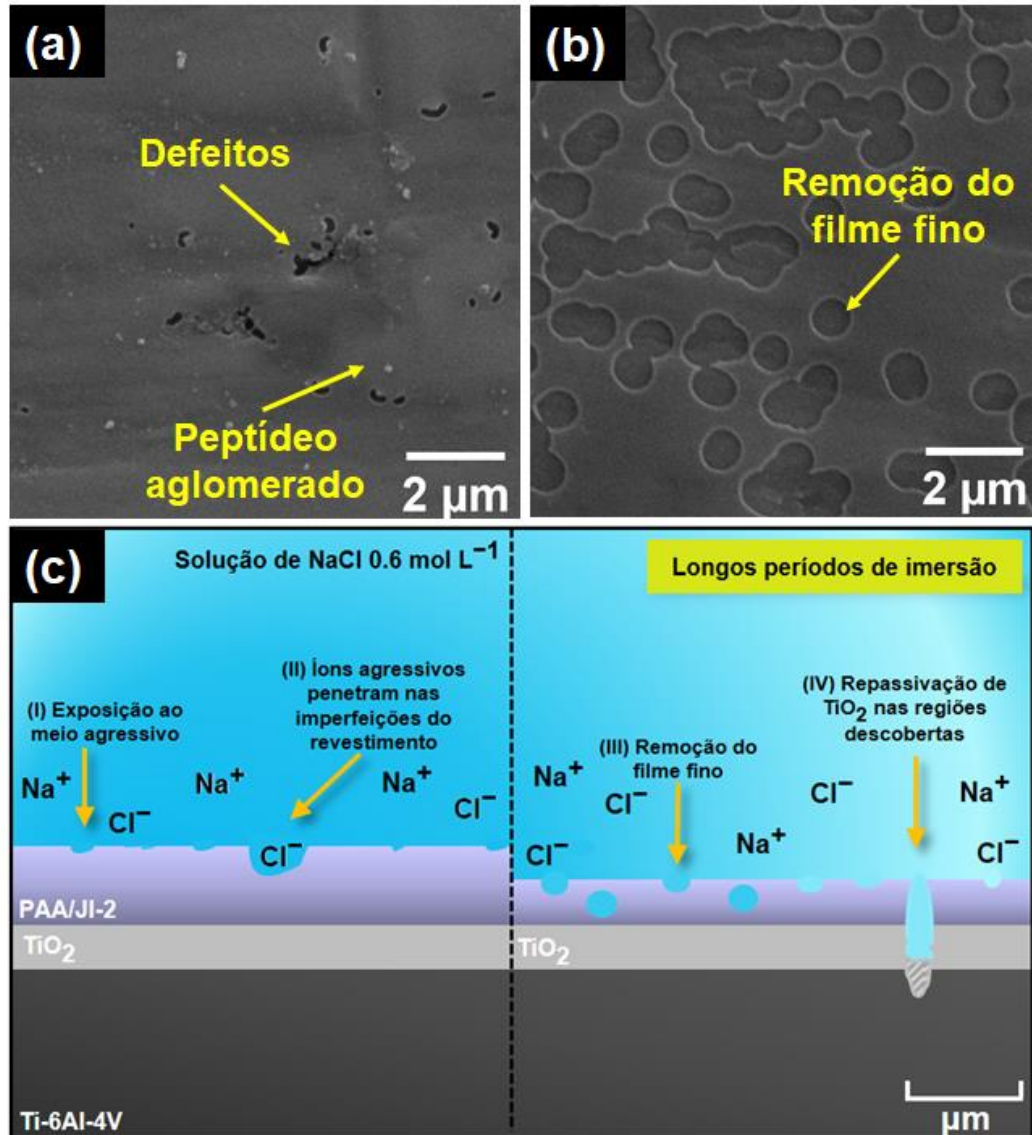
6Al-4V produzida por SLM em comparação com suas contrapartes prensadas a quente e comerciais usando a técnica EIS. Os autores demonstraram que o R_{bl} foi notavelmente maior quando comparado ao R_p para todos os substratos, sugerindo mais uma vez a melhor resistência ao processo de corrosão.

Os valores de CPE_{pl} aumentam com o tempo de imersão, sugerindo uma diminuição no desempenho de corrosão da camada porosa. De fato, esta hipótese pode ser suportada pelas imagens MEV obtidas após os testes EIS e apresentadas nas **Figuras 46 (a-c)**. O mecanismo de corrosão proposto para as amostras funcionalizadas é descrito na **Figura 46 (c)**. Quando as amostras de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 são expostas ao meio agressivo (**etapa I**) os íons agressivos permeiam através das imperfeições do revestimento (**etapa II**).

Com o aumento no tempo de imersão, o revestimento depositado na superfície da liga Ti-6Al-4V começa a ser removido (**etapa III**) formando essas irregularidades em forma de anel na superfície do material funcionalizado. Neste momento, o revestimento já apresenta mais irregularidades na superfície quando comparado com o tempo do início do teste. Nesta fase, existe uma superfície composta de regiões cobertas e descobertas (**etapa IV**) corroborando a imagem mostrada na **Figura 46 (b)**. Portanto, até 168 h de imersão, a resistência à corrosão da liga funcionalizada Ti-6Al-4V pode ser atribuída a um processo sinérgico devido à região revestida com PAA/JI-2 e a formação de filmes de TiO_2 nas regiões descobertas.

Em relação ao parâmetro CPE_{bl} , pode-se observar um aumento em seus valores com os tempos de imersão, que podem estar relacionados devido a **i**) um ataque geral ao filme de óxido **ii**) diminuição da camada protetora com o tempo de imersão ou devido à **iii**) hidratação do filme de óxido durante a imersão. De fato, essas observações ficam esclarecidas quando os valores do CPE são transformados em capacitância como será discutido nos próximos parágrafos.

Figura 46 – Características morfológicas de superfícies revestidas (a) antes dos ensaios de EIS, (b) após os ensaios de EIS, (c) mecanismo de corrosão proposto para amostras funcionalizadas



Fonte: da autora, 2023

Nota: As imagens foram obtidas por elétron secundário (SE) na ampliação de 2000x

Os elementos CPE foram considerados como capacitâncias para um melhor entendimento dos mecanismos de corrosão envolvidos no primeiro momento. Além disso, como foi representado por Freitas et al. (2022) e considerando que os CEEs utilizados no tratamento dos dados de EIS não são tão complexos, os valores de CPE_{bl} foram convertidos para a capacitância do filme de óxido ativo (C_{ox}) utilizando a relação matemática, derivada da equação de Brug (**Equação 2**) (BRUG et al., 1984). Assim, combinando os valores obtidos pela **Equação 2** e substituindo-os na **Equação 3**, é possível determinar a espessura da camada de óxido nativo (**Equação 4**).

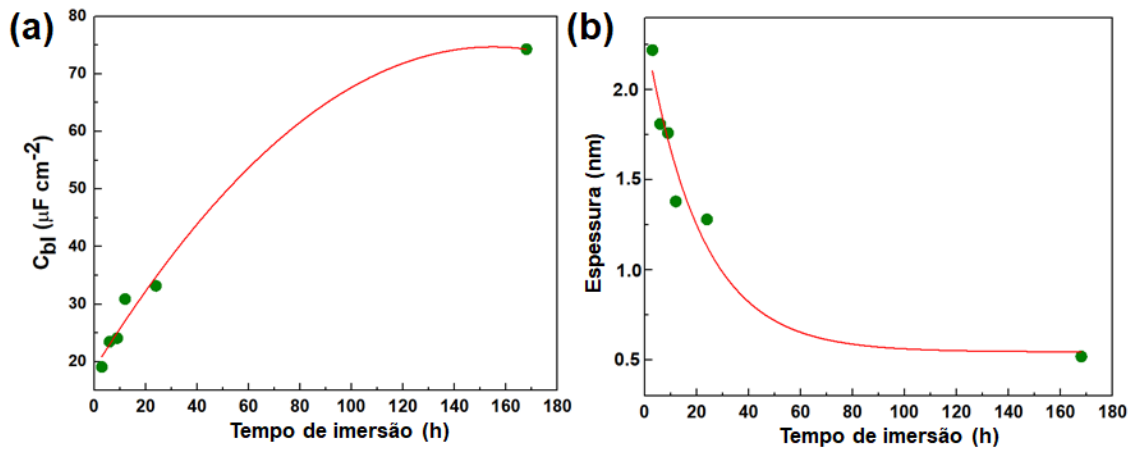
$$C_{bl} = \left[CPE_{bl} \times \left(\frac{1}{R_{\Omega} + R'_p + \frac{1}{R_{bl}}} \right)^{(n-1)} \right]^{\frac{1}{n}} \quad (2)$$

$$C_{ox} = \frac{\epsilon \epsilon_0 A}{d_{ox}} \quad (3)$$

$$d_{ox} = \frac{\epsilon \epsilon_0 A}{C_{ox}} \quad (4)$$

A **Figura 47 (a)** apresenta os valores das capacitâncias obtidos pela equação de Brug's nesse presente trabalho, bem como o comportamento da camada barreira em função do tempo de imersão para Ti-6Al-4V/PAA/JI-2. Como mostrado, os valores de capacitância aumentam com o tempo de imersão, em consequência ocorre uma diminuição da espessura da camada de óxido nativo. Como relatado pela literatura (OHTSUKA et al., 1998; OKASAKI et al., 2005; ALVES et al., 2017), a constante dielétrica do TiO₂ formado na superfície de titânio e suas ligas apresentam valores entre 48 e 100, respectivamente. Nesse sentido, considerando a permissividade do vácuo como $\epsilon_0 = 8.854 \times 10^{-14} \text{ F cm}^{-1}$ e a constante dielétrica (ϵ) igual a 48, a evolução da espessura da camada de óxido nativo em função do tempo de imersão pode ser representada na **Figura 47 (b)**. Como pode ser visto, a espessura da camada de óxido no início dos testes é de aproximadamente 2.2 nm e diminui com o aumento do tempo de imersão (~ 0.52 nm para 168 h de imersão). Por um outro lado, esse valor varia com o aumento da constante dielétrica. Assim, considerando valores intermediários entre 48 e 100, a camada de óxido obtida está de acordo com a literatura (SIVAKUMAR et al., 2011).

Figura 47 – Comportamento do C_{bl} e da espessura da camada de óxido nativo em função do tempo de imersão para os corpos de prova Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 (a) C_{bl} em função do tempo de imersão e (b) evolução da espessura da camada de óxido nativo em função do tempo de imersão



Fonte: da autora, 2023

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PEPTÍDEO JI-2

A sequência de aminoácidos JI-2 foi desenvolvida na busca de obter um peptídeo antimicrobiano que pode ser imobilizado em superfícies metálicas e poliméricas. Para isso, um espaçador composto por dois resíduos de alanina e um de cisteína foi incluído no peptídeo JIF2WR (MARTINS et al., 2020). Portanto, essa estratégia teve como objetivo aproveitar a potente ação antimicrobiana decorrente das substituições realizadas em Jelleine-I para obter o JIF2WR (MARTINS et al., 2020). Assim, a inclusão do espaçador no N-terminal permite que a imobilização não envolva a sequência de aminoácidos responsável pela atividade do peptídeo. Além disso, a presença do espaçador contendo o resíduo de cisteína permite que a imobilização ocorra através da formação de pontes dissulfeto entre este resíduo e uma superfície devidamente funcionalizada, aumentando as possibilidades de imobilização do mesmo (CASTELLANOS et al., 2017; PETRIN et al., 2019).

A concentração inibitória mínima (MIC) é um estudo *in vitro* que permite obter a menor concentração que um composto antimicrobiano é capaz de inibir o crescimento de um microrganismo específico (KOWALSKA-KROCHMAL, DUDEK-WICHER, 2021). Nesta pesquisa, esta abordagem foi adotada para traçar o perfil antimicrobiano do peptídeo JI-2 contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Algumas cepas desta bactéria estão relacionadas ao aparecimento de diversas infecções em dispositivos implantáveis, além de favorecer a formação de biofilmes (SHARMA et al., 2016). A **Tabela 10** exibe os resultados obtidos para JI-2 e o controle cloranfenicol. JI-2 exibiu um MIC de $445.4 \mu\text{mol L}^{-1}$, mostrando que esse novo peptídeo possui ação antimicrobiana significativa contra células de *E. coli*.

Tabela 10 – Valores de MIC em ensaios realizados em triplicatas

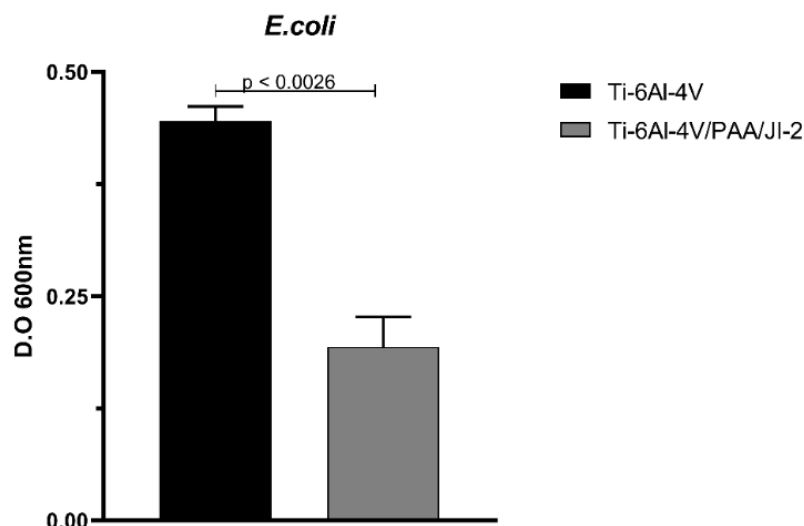
MIC ($\mu\text{mol L}^{-1}$ / $\mu\text{g mL}^{-1}$)	
Agente antimicrobiano	<i>E. Coli</i> (ATCC 25922)
JI-2	445.4 / 572.2
Cloranfenicol	2.6 / 0.8

Fonte: da autora, 2023

5.8 ATIVIDADE ANTIBIOFILME DAS SUPERFÍCIES NÃO FUNCIONALIZADAS E FUNCIONALIZADAS

A capacidade do material funcionalizado de prevenir a formação de biofilmes de *E. coli* foi testada para avaliar se a imobilização do peptídeo antimicrobiano JI-2 é uma estratégia promissora para prevenir infecções associadas ao biofilme em implantes. As superfícies de Ti-6Al-4V/PAA/JI-2 foram preparadas a $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de JI-2 para garantir que o material apresentasse uma concentração de peptídeo próxima à MIC obtida para *E. coli* (**Tabela 10**). Os resultados demonstram que a imobilização do JI-2 reduziu significativamente a formação de biofilme, apresentando uma eficiência de inibição da biomassa do biofilme do microrganismo de aproximadamente 60%. Além disso, os valores de densidade óptica (DO) foram obtidos (**Figura 48**), demonstrando que o material funcionalizado tem uma densidade óptica menor do que o material de controle. Este efeito indica a capacidade antibiofilme superior do revestimento (CAO et al., 2018). Portanto, estes resultados demonstram que a imobilização do peptídeo JI-2 na liga Ti-6Al-4V via plasma polimerização AA foi eficaz na obtenção de um novo material com potenciais aplicações biomédicas.

Figura 48 – Atividade antibiofilme dos materiais não funcionalizados e funcionalizados



Fonte: da autora, 2023

6 CONCLUSÕES

Capítulo 5

Os resultados de FTIR indicam que foi possível realizar a deposição do filme fino de PAA e a imobilização do peptídeo JI-2 nas superfícies de Ti-6Al-4V. As técnicas de AFM e MEV foram utilizadas para caracterizar as superfícies morfologicamente e os resultados mostraram diferenças topográficas em todos os estágios de funcionalização. Além disso, foram observadas mudanças nos parâmetros de rugosidade e de assimetria das superfícies funcionalizadas e não funcionalizadas, que colaboraram na confirmação da imobilização do peptídeo. A presença do peptídeo resultou, ainda, na formação de aglomerados que foram analisados via EDX e revelaram um elevado percentual de carbono e oxigênio em relação às superfícies revestidas apenas com ácido acrílico. Em outra perspectiva, ensaios de imersão em meio agressivo foram realizados, indicando que a deposição à plasma de ácido acrílico age como uma barreira protetora da corrosão da liga Ti-6Al-4V independentemente da presença do JI-2. Os resultados de OCP mostraram que a superfície funcionalizada com o peptídeo deslocou o potencial de corrosão para valores positivos, indicando melhor estabilidade termodinâmica em relação ao material base. Os ensaios de EIS mostraram que a característica irregular da superfície afeta as propriedades eletroquímicas do material após longos períodos de imersão. Nesse sentido, os resultados de EIS mostraram que nas primeiras horas de imersão a superfície contendo PAA/JI-2 alcançou maiores valores de módulo de impedância. Contudo, com o aumento do tempo de imersão em meio agressivo, esses valores foram reduzidos devido a remoção de PAA/JI-2 da superfície. Os ensaios biológicos foram realizados para determinar o MIC do JI-2 para a bactéria Gram-negativa *E. Coli*. Além disso, os testes de atividade antibiofilme contra *E. coli* demonstraram que a superfície funcionalizada promoveu a inibição de 60% de formação de biofilme em relação ao material não funcionalizado. Assim, esses achados mostram que a deposição do filme e a imobilização do peptídeo foram realizadas com sucesso, viabilizando o aprimoramento das propriedades antimicrobiana para aplicações nas áreas de odontologia e ortodontia.

AGÊNCIA DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L. M.; PIRES, C.; COELHO, A. B. Microscópios eletrônicos de varredura. *In: Microscopia: Contexto histórico, técnicas e procedimento para observação de amostras biológicas*. 1 ed. São Paulo: Érica, 2014. p. 75-78.
- ALVES, A.C.; WENGER, F.; PONTTHIAUX, P.; CELIS, J-P.; PINTO, A.M.; ROCHA, L.A.; FERNANDES, J.C.S. Corrosion mechanisms in titanium oxide-based films produced by anodic treatment. *Electrochimica Acta.*, v. 234, p. 16-27, 2017.
- ANANTH H.; KUNDAPUR V.; MOHAMMED H.S.; ANAND M.; AMARNATH G.S.; MANKAR S. Review on Biomaterials in Dental Implantology. *International Journal of Biomedical Science: IJBS.*, v. 11, p. 113, 2015.
- ASSIS, S.L.; I, COSTA. Electrochemical evaluation of Ti-13Nb-13Zr, Ti-6Al-4V and Ti-6Al-7Nb alloys for biomedical application by long-term immersion tests. *Materials and Corrosion.*, v. 58, n. 5, p 329-333, 2007.
- BEKMURZAYEVA, A.; DUNCANSON, W. J.; AZEVEDO, H. S.; KANAYEVA, D. Surface modification of stainless steel for biomedical applications: Revisiting a century-old material. *Materials Science & Engineering.*, v. 93, p. 1073-1089, 2018.
- BEUTNER, R.; MICHAEL, J.; SCHWENZER, B.; SCHARNWEBER, D. Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. *Journal of the Royal Society Interface.*, v. 7, n. suppl_1, p. S93-S105, 2010.
- BITAR, R.; COOLS, P.; GEYTER, N.; MORENT, R. Acrylic acid plasma polymerization for biomedical use. *Applied Surface Science.*, v. 448, p. 168-185, 2018.
- BHANDARI, D.; RAFIQ, S.; GAT, Y.; GAT, P.; WAGHMARE, R.; KUMAR, V. A review on bioactive peptides: physiological functions, bioavailability and safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics.*, v. 26, n. 1, p. 139-150, 2020.
- BOLLEN, C.M.L.; LAMBRECHTS, P.; QUIRYNEN, M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dental Materials.*, v.13, p. 258–269,1997.
- BOLLEN, C.M.L.; PAPAIOANNO, W.; VAN ELDERE, J.; SCHEPERS, E.; QUIRYNEN, M.; VAN STEENBERGHE, D. The influence of abutment surface roughness on plaque accumulation and peri-implant mucositis. *Clinical Oral Implants Research.*, v. 7, p. 201–211,1996.
- BUXADERA-PALOMERO, J.; CALVO, S.; TORRENT-CAMERO, S.; GIL, F.J.; MAS-MORUNO, C.; CANAL, C.; RODRÍGUEZ, D. Biofunctional polyethylene glycol coatings on titanium: an *in vitro*-based comparison of functionalization methods. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.*, v. 152, p. 367-375, 2017.
- BRUG, G.J.; VAN DEN EEDEN, A.L.G.; SLUYTERS-REHBACH, M.; SLUYTERS, J.H. The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase

element. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry.**, v. 176, p. 275-295, 1984.

CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e engenharia de materiais: uma introdução**. 9. ed. Tradução: Sergio Murilo Stamile Soares. Rio de Janeiro: LTC, 2018.

CASTELLANOS, M. I.; GUILLEM, J.; MAS-MORUNO, C.; DÍAZ-RICART, M.; ESCOLAR, G.; GINEBRA, M.P. Cell adhesive peptides functionalized on CoCr alloy stimulate endothelialization and prevent thrombogenesis and restenosis. **Journal of Biomedical Materials Research Part A.**, v. 105, p. 973–983, 2017.

CASTELLANOS, M. I.; MAS-MORUNO, C.; GRAU, A.; SERRA-PICAMAL, X.; TREPAT, X.; ALVERICIO, F.; JONER, M.; GIL, F. J.; GINEBRA, M. P.; MANERO, J. M.; PEGUEROLES, M. Functionalization of CoCr surfaces with cell adhesive peptides to promote HUVECs adhesion and proliferation. **Applied Surface Science.**, v. 393, p. 82-92, 2017.

CAO, P.; YUAN, C.; XIAO, J.; HE, X.; BAI, X. A biofilm resistance surface yielded by grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface. **Surfaces and Interfaces.**, v. 50, p. 516-521, 2018.

CAO, P.; LIU, K.; LIU, X.; SUN, W.; WU, D.; YUAN, C.; BAI, X.; ZHANG, C. Antibacterial properties of Magainin II peptide onto 304 stainless steel surfaces: A comparison study of two dopamine modification methods. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 194, p. 111198, 2020.

CAO, P.; DU, C.; HE, X.; ZHANG, C.; YUAN, C. Modification of a derived antimicrobial peptide on steel surface for marine bacterial resistance. **Applied Surface Science.**, v. 510, p. 145512, 2020.

CAO, P.; ZHANG, Y.; XIAO, F.; YUAN, C.; LIANG, F.; LIU, X.; ZHANG, C. Dopamine-assisted sustainable antimicrobial peptide coating with antifouling and anticorrosion properties. **Applied Surface Science.**, v. 589, p.153019, 2022.

CASS A.E.G.; CASS T.; LIGLER F.S. **Immobilized biomolecules in analysis: a practical approach**. New York: Practical Approach, 1998.

CIVANTOS A.; MARTÍNEZ-CAMPOS E.; RAMOS V.; ELVIRA C.; GALLARDO A.; ABARRATEGI A. Titanium Coatings and Surface Modifications: Toward Clinically Useful Bioactive Implants. **ACS Biomaterials Implants.**, v.3, p. 1245-1261, 2017.

CIUCCI, F. Modeling electrochemical impedance spectroscopy. **Current Opinion in Electrochemistry.**, v. 3, 132-139, 2019.

CHAN, D. I.; PRENNER, E. J.; VOGEL, H. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1758, n. 9. p. 1184-1202, 2006.

CHEN, X.; SEVILLA, P.; APARICIO, C. Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 107, p. 189-197, 2013.

CHEN, X.; ZHOU, X. C.; LIU, S.; WU, R. F.; APARICIO, C.; WU, J. Y. *In vivo* osseointegration of dental implants with an antimicrobial peptide coating. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.**, v. 28, n. 5, p. 1-9, 2017

CHEN, R.; WILLCOX, M.D.P.; HO, K.K.K.; SMYTH, D.; KUMMAR, N. Antimicrobial peptide melimine coating for titanium and its *in vivo* antibacterial activity in rodent subcutaneous infection models. **Biomaterials.**, v. 85, p. 142-151, 2016.

CHEN, X.; SEVILLA, P.; APARICIO, C. Surface biofunctionalization by covalent co-immobilization of oligopeptides. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 107, p. 189-197, 2013.

CHEN, X.; GAO, Y.; WANG, Y. PAN, G. Mussel-inspired peptide mimicking: an emerging strategy for surface bioengineering of medical implants. **Smart Materials in Medicine.**, v. 2, p. 26–37, 2021.

CHO, S.Y.; JUNG, C.Y.; PARK, H.K.; KANG, I.L.; YEO, B.; MIN, A. Vitronectin-derived bioactive peptide improves bone healing capacity of SLA titanium surfaces. **Materials.**, v. 12, p. 3400, 2019.

COBB, H.M. **The history of stainless steel.** ASM International, 2010.

D'AGOSTINO R. **Plasma deposition, treatment, and etching of polymers.** San Diego:Academic Press Limited. 1990.

de ALMEIDA BINO, M. C.; EURÍDICE, W. A.; GELAMO, R. V.; LEITE, N. B.; SILVA, M. V.; SIERVO, A.; PINTO, M. R.; BURANELLO, P. A. A.; MORETO, J. A. Structural and morphological characterization of Ti6Al4V alloy surface functionalization based on Nb2O5 thin film for biomedical application. **Applied Surface Science.**, v. 557, p. 149739, 2021.

de GIGLIO, E.; SABBATINI, L.; COLUCCI, S.; ZAMBONIN, G. Synthesis, analytical characterization, and osteoblast adhesion properties on RGD-grafted polypyrrole coatings on titanium substrates. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition.**, v. 11, n. 10, p. 1073-1083, 2000.

de GIGLIO, E.; COMETA, S.; CIOFFI, N.; TORSI, L.; SABBATINI, L. Analytical investigations of poly(acrylic acid) coatings electrodeposited on titanium-based implants: a versatile approach to biocompatibility enhancement. **Analytical and Bioanalytical Chemistry.**, v. 389, n. 7, p. 2055-2063, 2007.

DENDISOVÁ, M.; JENISTOVÁ, A.; PARCHANSKÁ-KOKAISLOVÁ, A. P.; MATEJKA, P.; PROKOPEC, V.; SVECOVÁ, M. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. **Analytica Chimica Acta.**, v. 1031, p. 1-14, 2018.

de OLIVEIRA, R. R. L.; ALBUQUERQUE, T. G. S.; CRUZ, F. M.; YAMAJI, F. M.; LEITE, F. L. Measurement of the nanoscale roughness by atomic force microscopy: basic principles and applications. *In: Atomic force microscopy-imaging, measuring and manipulating surfaces at the atomic scale.* v. 3, 2012.

EBENHAN, T.; GHEYSSENS, O.; KRUGER, H.G; ZEEVAART, J.R.; SATHEKGE, M. M. Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. **BioMed research international.**, v. 2014, 2014.

EURÍDICE, W. A. **Obtenção de filmes a-C:H via técnica PECVD na liga Ti₆Al₄V: caracterização estrutural e morfológica, eletroquímica e biológica.** Dissertação (Mestrado em Ciências dos Materiais Aplicados à Biociências) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2019.

EISENBERG, D.; SCHWARZ, E.; KOMAROMY, M.; WALL, R. Analysis of Membrane and Surface Protein Sequences with the Hydrophobic Moment Plot. **Journal of Molecular Biology.**, v. 179, n. 1, 1984.

FONTANA, R.; MENDES, M. A.; SOUZA, B. M.; KONNO, K.; CÉSAR, L. M. M.; MALASPINA, O.; PALMA, M. S. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Peptides.**, v. 25, n. 6, p. 919-928, 2004.

FERRIS, D.M.; MOODIE, G.D.; DIMOND, P.M.; GIORANNI, C.W.D.; EHRLICH, M.G.; VALENTINI, R.F. RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. **Biomaterials.**, v. 20, n. 23-24, 1999.

FERREIRA, D.L.; ALVES, E.M.; de SOUSA, GR.; FERREIRA, PHB.; FIGUEIREDO, J.M.A.; LEITE, N.B.; MORETO, J.A. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica: Princípios Básicos e Algumas Aplicações. **Revista Virtual de Química.**, p. 1-17, 2023.

FREITAS, LR.; GELAMO, R.V.; MARINO, C.E.B.; NASCIMENTO, J.P.L.; FIGUEIREDO, J.M.A.; FERNANDES, J.C.S.; MORETO, J.A. Corrosion behaviour of reactive sputtering deposition niobium oxide-based coating on the 2198-T851 aluminium alloy. **Surface and Coatings Technology.**, v. 434, p. 128197, 2022.

GABRIEL, M.; NAZMI, K.; VEERMAN, E.C.; AMERONGEN, A.V.N.; ZENTNER, A. Preparation of LL-37-grafted titanium surfaces with bactericidal activity, **Bioconjugate Chemistry.**, v. 17, p. 548-550, 2006.

GENTIL, V. **Corrosão.** 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2022.

GODOY-GALLARDO, M.; MAS-MORUNO, C.; FERNÁNDEZ-CALDERÓN, M. C.; PÉREZ-GIRALDO, C.; MANERO, J. M., ALBERICIO, F.; GIL, F. J.; RODRIGUEZ, D. Covalent immobilization of hLf1-11 peptide on a titanium surface reduces bacterial adhesion and biofilm formation. **Acta Biomaterialia.**, v. 10, n. 8, p. 3522-3534, 2014.

GODOY-GALLARDO, M.; MAS-MORUNO, C.; YU, K.; MANERO, J.M.; GIL, F.J.; KIZHALLEDATHI, J.N.; RODRIGUEZ, D. Antibacterial Properties of hLf1-11 Peptide onto Titanium Surfaces: A Comparison Study Between Silanization and Surface Initiated Polymerization. **Biomacromolecules.**, v. 16, p. 483-496, 2015.

HACKING, S.A.; BOYRAZ P.; POWERS, B.M; SEN-GUPTA, S.; KUCHARSKI, W.; BROWN, C.A.; COOK, E.P. Surface roughness enhances the osseointegration of titanium headposts in nonhuman primates. **Basic Neuroscience.**, v. 211, p. 237–244, 2012.

HARVEY, J.; BERGDAHL, A.; DADAFARIN, H.; LING, L.; DAVIS, E. C.; OMANOVIC, S. An electrochemical method for functionalization of a 316L stainless steel surface being used as a stent in coronary surgery: irreversible immobilization of fibronectin for the enhancement of endothelial cell attachment. **Biotechnology letters.**, v. 34, n. 6, p. 1159-1165, 2012.

HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; URENÁ, Y. R. C.; MACHADO, D.; LANCELLOTTI, M.; PINHEIRO, M. P. RISCHKA, K. LISBOA-FILHO, P. N.; COTTA, M. A. Electrostatic immobilization of antimicrobial peptides on polyethylenimine and their antibacterial effect against *Staphylococcus epidermidis*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 164, p. 370-378, 2018.

HERSEL U.; DAHMEN C.; KESSLER H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. **Biomaterials.**, v. 24, p. 4385, 2003.

HUANG, H.; ZHAO, Y.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; FU, T.; MA, X. Enhanced osteoblast functions on RGD immobilized surface. **Journal of Oral Implantology.**, v. 29, n. 2, p. 73-79, 2003.

HOLMBERG, K. V.; ABDOLHOSSEINI, M.; LI, Y.; CHEN, X.; GORR, S.; APARICIO, C. Bio-inspired stable antimicrobial peptide coatings for dental applications. **Acta Biomaterialia.**, v. 9, n. 9, p. 8224-8231, 2013.

HUMBLOT, V.; YALA, J.; THEBAULT, P.; THEBAULT, K.; HÉQUET, A.; BERJEAUD, J.; PRADIER, C. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. **Biomaterials.**, v. 30, p. 3503-3512, 2009.

HSU, R.W.; YANG, C.; HUANG, C.; CHEN, Y. Electrochemical corrosion properties of Ti-6Al-4V implant alloy in the biological environment. **Materials Science and Engineering.**, v. 380, n. 1-2, p 100-109, 2004.

INKSON, B. J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. *In*: HÜBSCHEN, G., ALTPETER, I., TSCHUNCKY, R., HERRMANN, H. G. **Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods**. Woodhead Publishing, 2016. p. 17-43.

JÜTTNER, K. Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) of corrosion processes on inhomogeneous surfaces. **Electrochemical Acta.**, v. 35, p. 1501-1508, 1990.

KAWAHARA, M.; KATO-NEGISHI, M. Link between aluminum and the pathogenesis of Alzheimer's disease: the integration of the aluminum and amyloid cascade hypotheses. **International Journal of Alzheimer's Disease.**, v. 2011, p. 1-17, 2011.

KALIVA, M. VAMVAKAKI, M. Nanomaterials characterization. *In*: NARAIN, R. **Polymer Science and Nanotechnology.**, Elsevier, 2020. cap. 17, p. 401-433.

KASTELLORIZIOS, M.; MICHANETZIS, G. P. A. K.; PISTILLO, B. R.; MOURTAS, S.; KLEPETSANIS, P.; FAVIA, P.; SARDELLA, E.; D'AGOSTINO, R.; MISSIRLIS, Y. F.; ANTIMISIARIS, S. G. aemocompatibility improvement of metallic surfaces by covalent

immobilization of heparin–liposomes. **International Journal of Pharmaceutics.**, v. 432, n. 1-2, p. 91-98, 2012.

KAUFMANN, C. R.; MANI, G.; MARTON, D.; JOHNSON, D. M.; AGRAWALL, C. M. Long-term stability of self-assembled monolayers on 316L stainless steel. **Biomedical Materials.**, v. 5, n. 2, p. 025008, 2010.

KAZEMZADEH-NARBAT, M.; CHENG, H.; CHABOK, R.; ALVAREZ, M. M.; FUENTE-NUNEZ, C.; PHILLIPS, S.; KHADEMHOSEINI, A. Strategies for antimicrobial peptide coatings on medical devices: a review and regulatory science perspective. **Critical Reviews in Biotechnology.**, v. 41, n. 1, p. 94-120, 2021.

KENDIG, M.; MANSFELD, F. AC electrochemical impedance of a model pit. Electrochemical Society Extended Abstracts. **Electrochemical Society.**, p 105-106, 1982.

KHELIFA, F.; ERSHOV, S.; HABIBI, Y.; SNYDERS, R.; DUBOIS, P. Free-radical-induced grafting from plasma polymer surfaces. **Chemical Reviews.**, v. 116, p. 3975–4005, 2016.

KOIVUNEN E.; WANG B.; DICKINSON C.D.; RUOSLAHTI E. Peptides in cell adhesion research. **Methods in enzymology.**, v. 245, p. 346-369, 1994.

KOWALSKA-KROCHMAL, B, DUDEK-WICHER, R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. **Pathogens.**, v. 10, p. 165, 2021.

LALLUKKA, M.; GAMNA, F.; GOBBO, V. A.; PRATO, M.; NAJMI, Z.; COCHIS, A.; RIMONDINI, L.; FERRARIS, S.; SPRIANO, S. Surface Functionalization of Ti6Al4V-ELI Alloy with Antimicrobial Peptide Nisin. **Nanomaterials.**, v. 12, n. 23, 2022.

LEYENS, C.; PETERS, M. **Titanium and titanium alloys: fundamentals and applications.** Wiley-vch, 2006.

LEE, H.; DELLATORE, S.M.; MILLER, W.M.; MESSERMITH, P.B. Musselinspired surface chemistry for multifunctional coatings. **Science.**, v. 318, p. 426–430, 2007.

LIN H.B.; GARCIA-ECHEVERRIA C.; ASAKURA S.; SUN W.; MOSHER D.F.; COOPER S.L. Endothelial cell adhesion on polyurethanes containing covalently attached RGD-peptides. **Biomaterials.**, v. 13, n. 13, 1992.

LIN H.B.; SUN W.; MOSHER D.F.; GARCIA-ECHEVERRIA C.; SCHAUFELBERG K.; LELKES P.I.; COOPER S.L.; **Journal of biomedical materials research.**, v. 28, n. 3, p. 329-342, 1994.

LOPEZ, L.C.; GRISTINA, R.; CECCONE, G.; ROSSI, F.; FAVIA, P.; d'AGOSTINO, R. Immobilization of RGD peptides on stable plasma-deposited acrylic acid coatings for biomedical devices. **Surface and Coatings Technology.**, v. 200, p. 1000-1004, 2005.

LYON, S. **Overview of corrosion engineering, science and technology.** *In:* Nuclear corrosion science and engineering. Woodhead Publishing, p. 3–30, 2012

MAESTRO, C. A. R.; MORETO, J. A.; CHIARAMONTE, T.; GELAMO, R. V.; OLIVEIRA, C. J. F.; SANTOS, M. M.; SILVA, V.; BUENO, A. H. S.; BALESTRA, R. M.; MALAFAIA, A. M. S. Corrosion behavior and biological responses of a double coating formed on the Ti-6Al-4V alloy surface by using thermal oxidation and biomimetic deposition of bismuth-doped CaP. **Surface & Coatings Technology.**, v. 425, p. 127717, 2021.

MAHAPATRO, A.; JOHNSON, D. M.; PATEL, D. N.; FELDMANN, M. D.; AYON, A. A.; AGRAWAL, M. The use of alkanethiol self-assembled monolayers on 316 L stainless steel for coronary artery stent nanomedicine applications: an oxidative and in vitro stability study. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.**, v. 2, n. 3, p. 182-190, 2006.

MAHLOBO, M.G.R.; CHIKOSHA, L.; OLUBAMBI, P.A. Study of the corrosion properties of powder rolled Ti-6Al-4V alloy applied in the biomedical implants. **Journal of Materials Research and Technology.**, v. 18, p. 3631-3639, 2022.

MAKIHIRA, S.; SHUTO, T.; NIKAWA, H.; OKAMOTO, K.; MINE, Y.; TAKAMOTO, Y.; OHARA, M.; TSUJI, K. Titanium immobilized with an antimicrobial peptide derived from histatin accelerates the differentiation of osteoblastic cell line, MC3T3-E1. **International Journal of Molecular Sciences.**, v. 11, p. 1458-1470, 2010.

MARTINS, D. B.; PACCA, C. C.; SILVA, A. M. B.; SOUZA, B. M.; ALMEIDA, M. T. G.; PALMA, M. S. Comparing activity, toxicity and model membrane interactions of Jelleine-I and Trp/Arg analogs: analysis of peptide aggregation. **Amino Acids.**, v. 52, n. 5, p. 725-741, 2020.

MASSIA S.P.; HUBBELL J.A. Covalent surface immobilization of Arg-Gly-Asp-and Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. **Analytical biochemistry.**, v. 187, n. 2, p. 292-301, 1990.

MASSIA S.P.; HUBBELL J.A. Covalently Attached GRGD on Polymer Surfaces Promotes Biospecific Adhesion of Mammalian Cells. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, v. 589, n. 1, p. 261-270, 1990.

MISCHLER, S.; MUNOZ, A. **Tribocorrosion.** *In: Encyclopedia of Interfacial Chemistry. Reference Module in Chemistry*, Klaus Wandelt, Elsevier, p. 504-514, 2017.

MORETO, J.A.; MARINO, C.E.B.; BOSE FILHO, W.W.; ROCHA, L.A.; FERNANDES, J.C.S. SVET, SKP and EIS study of the corrosion behaviour of high strength Al and Al-Li alloys used in aircraft fabrication. **Corrosion Science.**, v. 84, p. 30-41, 2014.

MUTREJA, I.; YE, Z.; APARICIO, C. Cell responses to titanium and titanium alloys. *In: Handbook of Biomaterials Biocompatibility.* Woodhead Publishing, 2020, p.423-452.

NASCIMENTO, J. P. L.; FERREIRA, M. O. A.; GELAMO, R. V.; SCARMÍNIO, J.; STEFFEN, T. T.; SILVA, B. P.; AOKI, I. V.; SANTOS JR, A. G.; CASTRO, V. V.; MALFATTI, C. F.; MORETO, J. A. Enhancing the corrosion protection of Ti-6Al-4V alloy through reactive sputtering niobium oxide thin films. **Surface & Coatings Technology.**, v. 428, p. 127854, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Tradução: Carla Dalmaz, Carlos Termignoni, Maria Luiza Saraiva Pereira. Porto Alegre: Artmed, 2019.

NI, J.; HAO, X. Carbon nitride films prepared by PECVD in CH₄-NH₃ precursor. **Advanced Materials Research**., v. 538, p.124–127, 2012

NICHOLSON, J. W. Titanium Alloys for Dental Implants: A Review. **Prosthesis**., v. 2, n. 2, p. 100-116, 2020.

NIINOMI, M. Mechanical biocompatibilities of titanium alloys for biomedical applications. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**., v. 1, n. 1, p. 30-42, 2008.

NILSSON K, MOSBACH K. Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides. **Biochemical and biophysical research communications**., v. 102, n. 1, 1981.

PANAYOTOV, I. V.; VLADIMIROV, B. S.; DUTILLEUL, P. Y. C.; LEVALLOIS, B.; CUISINIER, F. Strategies for immobilization of bioactive organic molecules on titanium implant surfaces: a review. **Folia Medica**., v. 57, n. 1, p. 11-18, 2015.

PARK, J. W.; KURASHIMA, K.; TUSTUSMI, Y.; AN, C. H.; SUH, J. T.; DOI, H.; NOMURA, N.; NODA, K.; HANAWA, T. Bone healing of comercial oral implants with RGD immobilization through electrodeposited poly(ethylene glycol) in rabbit cancellous bone. **Acta Biomaterialia**., v. 7, n. 8, p. 3222-3229, 2011.

PRANDO, D.; BRENNNA, A.; DIAMANTI, M. V.; BERETTA, S.; BOLZONI, F.; ORMELLESE, M.; PEDEFERRI, M. Corrosion of titanium: Part 1: aggressive environments and main forms of degradation. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**., v. 15, n. 4, p. e291-e302, 2017.

PIERSCHBACHER M.D.; RUOSLAHTI E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, **Nature**., v. 309, p. 30-33, 1984.

PELTONEN, J.; JARN, M.; AREVA, S.; LINDEN, M.; ROSENHOLM, J. B. Topographical Parameters for Specifying a Three-Dimensional Surface. **Langmuir**., v. 20, n. 22, p. 9428-9431, 2004.

PETRIN, T.H.; FADEL, V. MARTINS, D. B.; DIAS, S. A.; CRUZ, A.; SERGIO, L. M. Synthesis and Characterization of Peptide-Chitosan Conjugates (PepChis) with Lipid Bilayer Affinity and Antibacterial Activity. **Biomacromolecules**., v.20, n. 7, p. 2743-2753, 2019.

POPA, MV.; VASILESCU, E.; DROP.; VASILESCU, P.C.; DROB, S.L.; MARECI, D.; ROSCA, J.C.M. Corrosion resistance improvement of titanium base alloys. **Química Nova**., v. 33, p. 1892-1896, 2010.

RAMANATHAN, A. N. K. G.; NAIR, A. J.; SUGUNAN, V. S. A review on Royal Jelly proteins and peptides. **Journal of Functional Foods**., v. 44, p. 255-264, 2018.

ROESSLER, S.; BORN, D.; SCHARNWEBER, H.; WORCH, H. Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.**, v. 12, n. 10, p. 871-877, 2001.

OHTSUKA, T.; OTSUKI, T. The influence of the growth rate on the semiconductive properties of titanium anodic oxide films. **Corrosion Science.**, v. 40, n. 6, p. 951-958. 1998.

OKASAKI, Y.; GOTOH, E. Comparison release from various metallic biomaterials in vitro. **Biomaterials.**, v. 26, n. 1, p. 11-21, 2005.

OYA, K.; TANAKA, Y.; SAITO, H.; KURASHIMA, K.; K. NOGI, K.; TSUTSUMI, H.; TSUTSUMI, Y.; DOI, H.; NOMURA, N.; HANAWA, T. Calcification by MC3T3-E1 cells on RGD peptide immobilized on titanium through electrodeposited PEG. **Biomaterials.**, v. 30, p. 1281-1286, 2009.

ROCHA, K.R.; PERINI, H.F.; de SOUZA, C.M.; SCHUELER, J.; TOSONI, N.F.; FURLANETO, M.C.; FURLANETO-MAIA, L. Inhibitory effect of bacteriocins from enterococci on developing and preformed biofilms of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria innocua*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.**, v. 35, p. 1–11, 2019.

RYU, J.J.; PARK, K.; KIM, H.S.; JEONG, C.M.; HUH, J.B. Effects of Anodized Titanium with Arg-Gly-Asp (RGD) Peptide Immobilized Via Chemical Grafting or Physical Adsorption on Bone Cell Adhesion and Differentiation. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants.**, v. 28, 2013.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1462, n. 1-2, p. 55-70, 1999.

SARDELLA, E.; GRISTINA, R.; MILELLA, A.; D'AGOSTINO, R.; FAVIA, P. Functionalization of Biomedical Polymers by Means of Plasma Processes: Plasma Treated Polymers with Limited Hydrophobic Recovery and PE-CVD of -COOH Functional Coatings. **Journal of Photopolymer Science and Technology.**, v. 15. n. 2. p. 341-350, 2002.

SANDHYRANI, N. **Electrochemical Biosensors**. Amsterdam: Elsevier, 2019.

SEO, H. S.; KO, Y. M.; SHIM, J. W.; LIM, Y. K.; KOOK, J.; CHO, D.; KIM, B. H. Characterization of bioactive RGD peptide immobilized onto poly (acrylic acid) thin films by plasma polymerization. **Applied Surface Science.**, v. 257, n. 2, p. 596-602, 2010.

SHARMA, G.; SHARMA, S.; SHARMA, P.; CHANDOLA, D.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of Applied Microbiology.**, v. 121, p. 309–319, 2016.

SEAL B.L.; PANITCH A. **Biomaterials: an overview**. Wiley, New York. 1987.

SEO, M.D.; WON, H.S.; KIM, J.H.; MISHIG-OCHIR, LEE B.J. Antimicrobial Peptides for Therapeutic Applications: A Review. **Molecules.**, v. 17, n. 10, p. 12276-12286, 2012.

SINGH, M.; KAUR, N.; COMINI, E. The role of self-assembled monolayers in electronic devices. **Journal of Materials Chemistry C.**, v. 8, n. 12, p. 3938-3955, 2020.

SLOW, K. S.; BRITCHER, L.; KUMAR, S.; GRIESSER, H. J. Plasma Methods for the Generation of Chemically Reactive Surfaces for Biomolecule Immobilization and Cell Colonization - A Review. **Plasma Process and polymers.**, v. 3. n. 6-7, p. 392-418, 2006.

SIVAKUMAR, B.; KUMAR, S.; NARAYANAN, S. Fretting corrosion behaviour of Ti-6Al-4V alloy in artificial saliva containing varying concentrations of fluoride ions. **Wear.**, v 270. n. 3-4, p.317-324, 2011.

SLADE, N. B. L. **The electrostatic and non electrostatic interactions of bioactive peptides with model membranes.** 2014. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, SP, 2014.

SOUSA, T. S. G. **Efeito da rugosidade no desgaste e punções de conformação a frio.** 2016. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2016.

SOUZA, B.M; MENDES, M.A.; SANTOS, L.D.; MARQUES, M.R.; CÉSAR, L.M.M.; ALMEIDA, R.N.A.; PAGNOCCA, F.C.; KONNO, K.; PALMA, M.S. Structural and functional characterization of two novel peptide toxins isolated from the venom of the social wasp *Polybia paulista*. **Peptides.**, v. 26 p. 2157–2164, 2005.

STANKEVICH, K.S.; DANILENKO, N.V.; GADIROV, R.M.; GORENINSKII, S.I.; TVERDOKHLEBO, S.I.; FILIMONOV, V.D. A new approach for the immobilization of poly(acrylic) acid as a chemically reactive cross-linker on the surface of poly(lactic)acid-based biomaterials. **Materials Science and Engineering: C.**, v. 71, p. 862–869, 2017.

SULAIMAN M.G.A.M. Diode laser-induced Gum Arabic G-Acrylic Acid. **MATTER: International Journal of Science and Technology.**, v. 5, p. 86–97, 2019.

TAN, H.C.; POH, C.K.; CAI, Y.; WANG, W. Anti-fibrosis effect of BMP-7 peptide functionalization on cobalt chromium alloy. **Journal of Orthopaedic Research.**, v. 31, p. 983-990, 2013.

TEUGHEL, W.; ASSCHE, N.V.; SLIEPEN, I.; QUIRYNEN, M. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. **Clinical Oral Implants Research.**, v.17, p. 68–81, 2006.

TAMILSELVI, S.; RAMAN, V.; RAJENDRAN, N. Corrosion behaviour of Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V ELI alloys in the simulated body fluid solution by electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta.**, v. 52, n. 3, p. 839-846, 2006.

TANAKA, Y.; MATIN K.; GYO, M.; OKADA, A.; TSUTSUMI, Y, DOI, H.; NOMURA, N.; TAGAMI, J.; HANAWA, T. Effects of electrodeposited poly(ethylene glycol) on biofilm adherence to titanium. **Journal of Biomedical Materials Research.**, v. 95A, n. 4, p. 1105-1113, 2010.

TOPALA, I.; DUMITRASCU, N., POPA, G. Properties of the acrylic acid polymers obtained by atmospheric pressure plasma polymerization. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B.**, v. 267, n. 2, p. 442-445, 2009.

TRINO, L. D.; BRONZE-UHLEA, E. S.; RAMACHANDRANB, A. LISBOA-FILHOS, P. N.; MATHEW, M. T.; GEORGE, A. Titanium surface bio-functionalization using osteogenic peptides: Surface chemistry, biocompatibility, corrosion and tribocorrosion aspects. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.**, v. 81. p. 26-38, 2018.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Peptide Science: Original Research on Biomolecules.**, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.

TOPTAN, F.; ALVES, A.C.; CARVALHO, O.; BARTOLOMEU, F.; PINTO, A.M.P.; SILVA, F.; MIRANDA, G. Corrosion and tribocorrosion behaviour of Ti6Al4V produced by selective laser melting and hot pressing in comparison with the commercial alloy. **Journal of Materials Processing Technology.**, v. 266, p 239-245, 2019.

UMOREN, S. A. LI, Y. WANG, F. H. Effect of polyacrylic acid on the corrosion behaviour of aluminum in sulphuric acid solution. **Journal of Solid State Electrochemistry.**, v. 14, n. 12, p. 2293–2305, 2010.

ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical reviews.**, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, 1996.

ULBRICHT, M.; RIEDEL, M. Ultrafiltration membrane surfaces with grafted polymer ‘tentacles’: preparation, characterization and application for covalent protein binding. **Biomaterials.**, v. 19, n. 14, p. 1229-1237, 1998.

VASILESCU, E.; DROB, P.; RADUCANU, D.; CINCA, I.; MARECI, D.; CALDERON MORENO, J.M.; POPA, M.; VASILESCU, C.; MIRZA ROSCA, J.C. Effect of thermo-mechanical processing on the corrosion resistance of Ti6Al4V alloys in biofluids. **Corrosion Science.**, v. 51, n. 12, p 2885-2896, 2009.

VREULS, C.; ZOCCHI, G.; THIERRY, B.; GARITTE, G.; GRIESSE, S.S.; ARCHAMBEAU, C.; WEERDT, C.V.; MARTIAL, J.; GRIESSER, H. Prevention of bacterial biofilms by covalent immobilization of peptides onto plasma polymer functionalized substrates. **Journal of Materials Chemistry.**, v. 20, p. 8092-8098, 2010.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. Porto Alegre: ArtMed, 2013.

SANDHYRANI, N. **Electrochemical Biosensors**. Amsterdam: Elsevier, 2019.

XIAO S.J.; TEXTOR M.; SPENCER N.D. Covalent Attachment of Cell-Adhesive, (Arg-Gly-Asp)-Containing Peptides to Titanium Surfaces. **Langmuir.**, v. 14, p. 5507-5516, 1998.

ZHU, S.; LI, W.; O’BRIEN-SIMPSON, N.; SEPAROVIC, F.; SANI, MARC-ANTOINE. C-terminus amidation influences biological activity and membrane interaction of maculatin 1.1. **Amino Acids.**, v. 53, n. 5, p. 769-777, 2021.

ZAVERI, N.; MAHAPATRA, M.; DECEUSTER, A.; PENG, Y.; LI, L.; ZHOU, A. Corrosion resistance of pulsed laser-treated Ti-6Al-4V implant in simulated biofluids. **Electrochimica Acta.**, v. 53, n. 15, p. 5022-5032, 2008.

ZORN, G.; GOTMAN, I.; GUTMANAS, Y.; ADADI, R.; SUKENIK, C.N. Surface modification of Ti45Nb alloy by immobilization of RGD peptide via self-assembled monolayer. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.**, v. 7, p. 1309-1315, 2007.

ZHANG, Z.; KOU, N.; YE, W.; WANG, S.; LU, J.; LU, Y.; LIU, H.; WANG, X. Construction and characterizations of antibacterial surfaces based on self-assembled monolayer of antimicrobial peptides (Pac-525) derivatives on gold. **Coatings.**, v. 11, p. 1014, 2021.

ZHOU, L.; LAI, Y.; HUANG, W.; HUANG, S.; XU, Z.; J. CHEN, J.; WU, DU. Biofunctionalization of microgroove titanium surfaces with an antimicrobial peptide to enhance their bactericidal activity and cytocompatibility, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 128, p. 552-560, 2015.

ZHOU, L.; LIN, Z.; DING, J.; HUANG, W.; CHEN, J.; WU, J.D. Inflammatory and biocompatibility evaluation of antimicrobial peptide GL13K immobilized onto titanium by silanization, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 160, 581-588, 2017.

WANG, D. HAAPASALO, M.; GAO, Y.; MA, J.; SHEN, Y. Antibiofilm peptides against biofilms on titanium and hydroxyapatite surfaces. **Bioactive materials.**, v. 3, n. 4, p. 418-425, 2018.

WU, B.; Z, PAN.; S, LI.; D, CUIURI, D.; DING, D.; H, LI. The anisotropic corrosion behaviour of wire arc additive manufactured Ti-6Al-4V alloy in 3.5% NaCl solution. **Corrosion Science.**, v. 137, p. 176-183, 2018.

APÊNDICE A - ARTIGOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

- I.** TEIXEIRA, G.T.L.; do NASCIMENTO, J.P.L.; GELAMO, R.V.; MORETO, J.A.; SLADE, N.B.L. Strategies for Functionalization of Metallic Surfaces with Bioactive Peptides: a Mini Review. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics.**, v. 29, n. 24, 2023. (Publicado)
- II.** TEIXEIRA, G.T.L.; GELAMO, R.V.; SANTOS OBATA, M.M.; de ANDRADE SILVA, L.E.; da SILVA, M.V.; de OLIVEIRA, C.J.F.; da SILVA, B.P.; AOKI, I.V.; MORETO, J.A.; SLADE, N.B.L. Exploring the functionalization of Ti-6Al-4V alloy with the novel antimicrobial peptide JIChis-2 via plasma polymerization. **Biofouling.**, p. 1-17, 2023. (Publicado)
- III.** AMARAL, E.F.; de ANDRADE, J.C.B.; de FREITAS, L.B.; TEIXEIRA, G.T.L.; do NASCIMENTO, J.P.L.; GELAMO, R.V.; SLADE, N.B.L.; MORETO, J.A. Sensores Eletroquímicos e Biossensores: Seus Princípios Básicos de Funcionamento e Algumas Aplicações. **Revista Virtual de Química.**, p. 1-18, 2023. (Publicado)
- IV.** CINTRA NETO, L.A.R.; PIETRO, L.R.; do NASCIMENTO, J.P.L.; FERREIRA, M.O.A.; TEIXEIRA, G.T.L.; SLADE, N.B.L.; GELAMO, R.V.; MORETO, J.A. A utilização da técnica de pulverização catódica reativa para a deposição de filmes finos de Nb₂O₅ na superfície da liga Ti-6Al-4V. **Revista Brasileira de Aplicações à Vácuo.**, v. 42, n. e0123, 2023. (Publicado)
- V.** TEIXEIRA, G.T.L.; GELAMO, R.V.; SLADE, N.B.L.; MORETO, J.A. New approaches regarding the electrochemical behaviour of the Ti6Al-4V alloy functionalized with antimicrobial peptide JI-2 via plasma polymerization. **Journal of Materials Engineering and Performance.**, 2023. (Submetido)
- VI.** FERREIRA, M.O.A.; TEIXEIRA, G.T.L.; CINTRA NETO, L.A.R.; PIETRO, L.R.; SLADE, N.B.L.; GELAMO, R.V.; PINTO, H.C.; AOKI, I.V.; MORETO, J.A. Effect of Nb₂O₅ coating on the global corrosion resistance of the 7050-T7451 aluminium alloy. **Journal of Materials Engineering and Performance.**, 2023. (Submetido)

I. Strategies for Functionalization of Metallic Surfaces with Bioactive Peptides: a Mini Review

International Journal of Peptide Research and Therapeutics (2023) 29:24
<https://doi.org/10.1007/s10989-023-10497-3>



Strategies for Functionalization of Metallic Surfaces with Bioactive Peptides: a Mini Review

Gabriella Teresinha Lima Teixeira^{1,3} · João Pedro Lopes do Nascimento^{1,3} · Rogério Valentim Gelamo^{2,3} · Jeferson Aparecido Moreto^{1,3} · Natália Bueno Leite Slade^{1,3}

Accepted: 4 February 2023

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2023

Abstract

The literature is rich in research that seeks strategies capable of improving the antimicrobial activity, antibiofilm and tissue interaction of metallic materials for biomedical purposes. Bioactive peptides appear as good candidates in the development of new biomaterials, since they are short molecules that have a wide range of biological activities. However, their use can be difficult given the susceptibility to degradation associated with the environment in which they interact. As a consequence, choosing the appropriate immobilization methodology is crucial to ensure the effectiveness of a biomaterial. Here we consider works published in indexed journals from the 1990s to the present to present a mini methodological review on the strategies to carry out modifications of metallic surfaces with bioactive peptides, their advantages and disadvantages. It was possible to verify the recurrent use of metallic materials such as titanium, cobalt, chromium and stainless steels for a multitude of applications in the biomedical area. With regard to bioactive peptides, the interest in those capable of increasing osseointegration and in those that can confer antimicrobial action and/or anti-biofilm formation is notable. Despite this, advances regarding the mechanism of action of immobilized peptides and their impact on the corrosion properties of materials are still needed.

Keywords Metallic surfaces · Bioactive peptides · Surface functionalization · Biofunctional material

Introduction

Metallic surface functionalization appears as an interesting strategy for the development of new materials, promoting an improvement in the corrosive, mechanical and biofunctional properties of the bare material. This can be done in order to protect the base material as well as enrich it with properties relevant to its applications. The process of functionalization is quite versatile, as it can be done with the most diverse

types of materials (natural and synthetic polymers, organic and inorganic compounds and nanoparticles, among others) and methods (physical, chemical, mechanical, physical–chemical and biochemical (Panayotov et al. 2015).

An intense effort has been made by the scientific community to functionalize different metals in the area of medical devices, in order to make them more biocompatible and with a long useful life in the physiological environment (Su et al. 2018). Numerous proposals have emerged based on techniques for the functionalization of metallic surfaces with biomolecules, whose applicability extends from medical to dental devices (Chen et al. 2013; Holmberg et al. 2013; Ananth et al. 2015; Rodriguez et al. 2017; Trino et al. 2018). Among these biomolecules are the bioactive peptides which are short proteins composed by up to 20 amino acids linked together by peptide bonds. They can present a wide range of biological activities, such: antihypertensive, antimicrobial, antithrombotic, antioxidant, anticancer, osteoprotective, and others (Bhandari et al. 2020). Their immobilization on surfaces constitutes an interesting strategy to promote their effective use for therapeutic purposes once it enables transfer

✉ Natália Bueno Leite Slade
natalia.slade@uftm.edu.br

¹ Institute of Exact and Natural Sciences and Education, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Avenida Doutor Randolpho Borges Júnior, Univerdecidade, Uberaba, MG 38064200, Brazil

² Institute of Technological and Exact Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Avenida Doutor Randolpho Borges Júnior, Univerdecidade, Uberaba, MG 38064200, Brazil

³ Department of Physics, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, MG 38064300, Brazil

II. Exploring the functionalization of Ti-6Al-4V alloy with the novel antimicrobial peptide JIChis-2 via plasma polymerization

BIOFOULING
<https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2183121>



Exploring the functionalization of Ti-6Al-4V alloy with the novel antimicrobial peptide JIChis-2 via plasma polymerization

Gabriella Teresinha Lima Teixeira^{a,b}, Rogério Valentim Gelamo^{b,c}, Malu Mateus Santos Obata^d, Leonardo Eurípedes de Andrade Silva^d, Marcos Vinícius da Silva^d, Carlo José Freire de Oliveira^d, Brunela Pereira da Silva^e, Idalina Vieira Aoki^e, Jeferson Aparecido Moreto^{a,b} and Natália Bueno Leite Slade^{a,b}

^aInstitute of Exact and Natural Sciences and Education, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Univerdecidade, Uberaba, Minas Gerais, Brazil; ^bDepartment of Physics, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brazil; ^cInstitute of Technological and Exact Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Univerdecidade, Uberaba, Minas Gerais, Brazil; ^dDepartment of Immunology, Microbiology and Parasitology, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil; ^ePolytechnic School, Chemical Engineering Department, University of São Paulo, Av. Prof. Luciano Gualberto, São Paulo, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

This study aimed to characterize the immobilization of the novel JIChis-2 peptide on the Ti-6Al-4V alloy, widely used in the biomedical sector. The antimicrobial activity of JIChis-2 was evaluated in the Gram-negative bacterium *E. coli*. Its immobilization occurred by inducing the formation of covalent bonds between the N-terminus of the peptides and the surface previously submitted to acrylic acid polymerization via the PECVD technique. Coated and uncoated surfaces were characterized by FTIR, AFM, SEM and EDX. Studies of global and localized corrosion were carried out, seeking to explore the effects triggered by surface treatment in an aggressive environment. Additionally, the ability of the functionalized material to prevent *E. coli* biofilm formation evidenced that the strategy to immobilize JIChis-2 in the Ti-6Al-4V alloy via PECVD of acrylic acid resulted in the development of a functional material with antibiofilm properties.

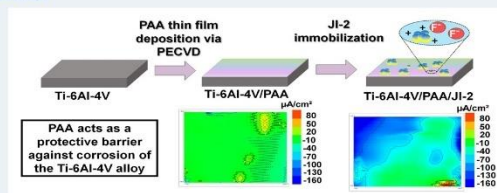
ARTICLE HISTORY

Received 10 November 2022
 Accepted 15 February 2023

KEYWORDS

Peptide immobilization; antimicrobial peptide; Ti-6Al-4V alloy; plasma polymerization; biomedical applications

GRAPHICAL ABSTRACT



Introduction

Commercially pure titanium (cp) and its alloys (e.g. Ti-6Al-4V) are the most commonly used metallic biomaterials in dental implants (Panayotov et al. 2015). The use of this alloy is justified by its good resistance to global and localized corrosive processes, mechanical properties, and biocompatibility with the human body (Zhao et al. 2013). Specifically, the biphasic alloy ($\alpha + \beta$) Ti-6Al-4V allows the production of devices with therapeutic properties of high mechanical strength due to its

low Young's modulus (101–120 GPa) (Oliver et al. 2019; Nicholson 2020). In addition, titanium-based implantable materials are considered bioinert, where no active interaction exists between these metallic materials and the host tissue (Mutreja et al. 2020). The bioinert nature of these biomaterials can have a positive effect on implantation due to their chemical stability. However, being bioinert can hinder the growth and differentiation of bone cells in the region of the devices, which can lead to surgical failures (Chen et al. 2013).

CONTACT Natália Bueno Leite Slade natalia.slade@uftm.edu.br

Supplemental data for this article can be accessed online at <https://doi.org/10.1080/08927014.2023.2183121>.

© 2023 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

III. Sensores Eletroquímicos e Biossensores: Seus Princípios Básicos de Funcionamento e Algumas Aplicações

Sensores Eletroquímicos e Biossensores: Seus Princípios Básicos de Funcionamento e Algumas Aplicações

Electrochemical Sensors and Biosensors: Their Basic Working Principles and Some Applications

Eduardo M. F. Amaral,^a Jean C. B. de Andrade,^a Leandro B. de Freitas,^b Gabriella T. L. Teixeira,^c João P. L. do Nascimento,^a Rogério V. Gelamo,^{a,b,c} Natália B. Leite,^{a,b,d} Jéferson A. Moreto^{a,b,d,*}

^a Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Avenida Doutor Randolpho Borges Júnior, Univerdecidade, CEP 38064-200, Uberaba-MG, Brasil.

^b Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Avenida Doutor Randolpho Borges Júnior, Univerdecidade, CEP 38064-200, Uberaba-MG, Brasil.

^c Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas, Avenida Doutor Randolpho Borges Júnior, Univerdecidade, CEP 38064-200, Uberaba-MG, Brasil.

^d Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação, Avenida Doutor Randolpho Borges Júnior, Univerdecidade, CEP 38064-200, Uberaba-MG, Brasil.

*E-mail: jeferson.moreto.uftm@gmail.com

Recebido em: 25 de Maio de 2022

Aceito em: 14 de Julho de 2022

Publicado online: 13 de Setembro de 2022

Electrochemical sensors are a class of devices in which the transducer component is the electrode. These devices are often seen as an effective tool for studying chemical and biological systems. This work offers an overview of electrochemical sensors and biosensors, as well as their basic working principles and some applications. It is expected to motivate young researchers to develop new methodologies and materials for the electrochemical sensors area, allowing the expansion of possibilities and the realization of applied and innovative research.

Keywords: Analytical chemistry; electroanalytical; electrochemical sensors; electrodes; transducer component.

1. Introdução

O desenvolvimento dos sensores eletroquímicos promoveu uma grande revolução na química analítica, permitindo a detecção de vários parâmetros físicos, químicos e biológicos. Como reportado pela literatura, mais de 2000 mil dispositivos são desenvolvidos e publicados anualmente.¹⁻⁷ E, dentre todos estes dispositivos desenvolvidos, os sensores eletroquímicos constituem a classe de maior crescimento e são utilizados no setor agrícola, alimentício, farmacêutico etc.

Um sensor químico é um dispositivo que transforma uma informação química, desde a concentração de um determinado componente da amostra até sua composição total, em um sinal que pode ser transformado em dados analisáveis. Todo e qualquer sensor é composto por duas unidades básicas, um receptor e um transdutor.^{2,3} A Figura 1 mostra uma representação esquemática de um sensor eletroquímico e suas respectivas unidades básicas. O receptor é a parte quimicamente ativa do sensor, ou seja, é responsável por transformar a informação química em uma corrente elétrica. No que diz respeito ao transdutor, ele é responsável por transformar a corrente elétrica gerada pelo receptor em uma informação mensurável, denominada sinal analítico útil.

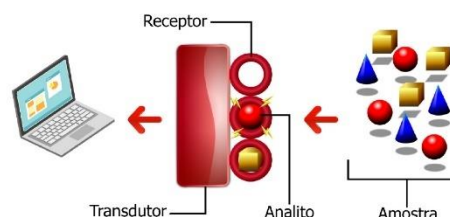


Figura 1. Representação simplificada de um sensor eletroquímico e suas unidades básicas. Os cones, as esferas e os cubos representam diferentes tipos de amostras. Fonte: Própria do Autor.

O constante desenvolvimento computacional, de instrumentação e da microeletrônica permitiu com que novos sensores pudessem ser obtidos com custos cada vez menores e com precisão cada vez maior. Dentre todos os tipos de sensores, os eletroquímicos merecem destaque,

IV. A utilização da técnica de pulverização catódica reativa para a deposição de filmes finos de Nb₂O₅ na superfície da liga Ti-6Al-4V

RBAV

<https://doi.org/10.17563/rbav.v42i1.1236>

ARTIGO DE REVISÃO



A utilização da técnica de pulverização catódica reativa para a deposição de filmes finos de Nb₂O₅ na superfície da liga Ti-6Al-4V

The use of reactive sputtering technique for the deposition of Nb₂O₅ thin films on the Ti-6Al-4V alloy surface

Luiz Augusto Ramos Cintra Neto¹ , Leonardo Rodrigues Pietro¹ , João Pedro Lopes do Nascimento¹ , Murilo Oliveira Alves Ferreira¹ , Gabriella Teresinha Lima Teixeira¹ , Natália Bueno Leite¹ , Rogério Valentim Gelamo¹ , Jeferson Aparecido Moreto^{2*}

1. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação – Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

2. Universidade Federal do Triângulo Mineiro – Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas – Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

Autor correspondente: jeferson.moreto.uftrm@gmail.com

Editor de seção: Antonio Renato Bigansolli

Recebido: Ago. 29, 2022 **Aceito:** Jan 10, 2023

RESUMO

Apresentação: A implantação cirúrgica de biomateriais artificiais é a solução mais difundida para sanar problemas musculoesqueléticos e acaba sendo utilizada em diversas partes do corpo humano, como por exemplo: na reposição de ombros, joelhos, quadris, cotovelos, estruturas orodentais, dentre outras. O sucesso da utilização de biomateriais depende da sinergia com o organismo, bem como a sua degradação no ambiente corporal. Desta forma, a utilização de materiais que não sejam tóxicos ao organismo, que apresentem estabilidade e compatibilidade tecidual, que possuam boas propriedades químicas e físicas são alguns dos requerimentos desejados no setor biomédico. **Objetivo:** Motivar jovens pesquisadores a desenvolverem novas metodologias para a utilização do Nb₂O₅ em pesquisas aplicadas e inovadoras na área biomédica. **Métodos:** Revisão integrativa a respeito da utilização da técnica de pulverização catódica reativa para a deposição de filmes finos de Nb₂O₅ na superfície da liga Ti-6Al-4V. **Resultados:** Verificou-se que apesar das interessantes propriedades do Nb₂O₅, existem pouquíssimos trabalhos na literatura que o utilizam para a funcionalização superficial de biomateriais. **Conclusão:** No presente trabalho, os últimos progressos referentes à obtenção de filmes finos de Nb₂O₅ via a técnica de pulverização catódica reativa foram apresentados e discutidos, trazendo importantes informações em relação às propriedades corrosivas e biofuncionais.

PALAVRAS-CHAVE: Titânio e suas ligas, Revestimento, Pentóxido de nióbio, Setor biomédico.

ABSTRACT

Background: The physiological implantation of biomaterials is the most widespread solution to remedy musculoskeletal problems and ends up being used in various parts of the human body, such as: transition of shoulders, knees, hips, orodental structures, among others. The successful use of biomaterials depends on their synergy with the body, as well as their degradation in the body environment. In this way, the use of materials that are not toxic to the organism, that present tissue stability and compatibility, that have good chemical and physical properties are some of the desired requirements in the biomedical sector. **Objective:** Motivate young researchers to develop new methodologies for the use of Nb₂O₅ in applied and innovative research in the biomedical area. **Methods:** Integrative review regarding the use of the reactive sputtering technique for the deposition of Nb₂O₅ thin films on the Ti-6Al-4V alloy surface. Despite the interesting properties of Nb₂O₅, there are very few works in the literature that use it for the surface functionalization of biomaterials. **Conclusion:** In the present work, the latest advances regarding the obtainment of the Nb₂O₅ thin films by using reactive sputtering technique were presented and discussed, bringing important information regarding corrosive and biofunctional properties.

KEYWORDS: Titanium and its alloys, Coating, Niobium pentoxide, Biomedical sector.



V. New approaches regarding the electrochemical behaviour of the Ti6Al-4V alloy functionalized with antimicrobial peptide JI-2 via plasma polymerization

Page 7 of 53

Journal of Materials Engineering and Performance

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

New approaches regarding the electrochemical behaviour of the Ti-6Al-4V alloy functionalized with antimicrobial peptide JI-2 via plasma polymerization

Gabriella Teresinha Lima Teixeira (gabriellalimateixeira@gmail.com)¹; Rogério Valentim Gelamo (rogelamo@gmail.com)²; Natália Bueno Leite (natalia.slade@uftm.edu.br)¹; Jéferson Aparecido Moreto (jeferson.moreto.uftm@gmail.com)^{1*}.

*Corresponding authors: jeferson.moreto.uftm@gmail.com

natalia.slade@uftm.edu.br

¹Institute of Exact Sciences, Naturals and Education, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM,) Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

²Institute of Technological and Exact Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

ORCID

Gabriella Teresinha Lima Teixeira: 0000-0001-8620-4773

Rogério Valentim Gelamo: 0000-0003-2124-3450

Natália Bueno Leite: 0000-0001-5442-1765

Jéferson Aparecido Moreto: 0000-0001-9837-3216

Abstract

Ti-6Al-4V alloy is widely used in the biomedical sector due to its excellent biocompatibility, corrosion resistance, and mechanical properties. However, the use of this material as an implant is still susceptible to failure due to bacterial adhesion on the surface. Initial studies performed by this research group demonstrated and characterized the functionalization process of the Ti-6Al-4V alloy with antimicrobial JI-2 peptide via plasma polymerization method. However, the electrochemical properties of the functionalized system are still little explored. Here, we present new insights regarding the global electrochemical behaviour of the functionalized Ti-6Al-4V with PAA/JI-2 in 0.6 mol L⁻¹ NaCl solution. Open circuit potential and electrochemical impedance spectroscopy techniques were used. The electrochemical tests were accompanied by a detailed microstructural analysis by SEM. The results demonstrated the PECVD technique was advantageous to produce thin films based on acrylic acid monomer on the Ti-6Al-4V surfaces. The PAA/JI-2 thin films shifted the corrosion potential (E_{corr}) of the Ti-6Al-4V alloy to more positive values, indicating a better thermodynamic stability. The capacitance of the barrier layer decreases for the uncoated specimens with increasing immersion time, suggesting an increase in the thickness of the native oxide layer. In contrast, the opposite effect was verified for the Ti-6Al-4V/PAA/JI-2.

Keywords: Global electrochemical tests; Biomaterial; Antimicrobial JI-2 peptide; Titanium alloy; PECVD.

VI. Effect of Nb₂O₅ coating on the global corrosion resistance of the 7050-T7451 aluminium alloy

Effect of Nb₂O₅ coating on the global corrosion resistance of the 7050-T7451 aluminium alloy

M. O. A. Ferreira¹; G. T. L. Teixeira¹; L. A. R. Cintra Neto¹; L. R. Pietro¹; N. B. Leite¹; Gelamo, R. V.²; H. C. Pinto³; I. V. Aoki⁴; J. A. Moreto^{1*}

¹Institute of Exact Sciences, Naturals and Education, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM). Avenida Doutor Randolfo Borges Júnior, Univerdecidade, 38064200 - Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

²Institute of Technological and Exact Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM). Avenida Doutor Randolfo Borges Júnior, Univerdecidade, 38064200 - Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

³São Carlos School of Engineering - EESC, University of São Paulo - USP, São Carlos 13563-120, SP, Brazil.

⁴Polytechnic School, Chemical Engineering Department, University of São Paulo, Av. Prof. Luciano Gualberto, travessa 3, 380 Cidade Universitária, São Paulo, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author: jeferson.moreto.uftm@gmail.com

Abstract

The aircraft industry has been searching for new materials to be used in their aircrafts, which provides good mechanical and corrosive properties. The 7xxx series aluminium alloys are widely used in structural components. However, these alloys are susceptible to localised corrosion processes when exposed to an aggressive environment, which affect their lifetime and performance. Surface treatment appears as a powerful tool to improve the corrosion resistance of these alloys, since the coating may act as a protective physical barrier. This work aims to present an innovative and applied research for the development of the Nb₂O₅ thin films on the 7050-T7451 aluminium alloy surface by using reactive sputtering technique. The open circuit potential, potentiodynamic polarization, electrochemical impedance spectroscopy as well as immersion tests were used to access the global corrosion behaviour of the 7050-T7451 aluminium alloy in 0.6 mol L⁻¹ NaCl solution. The morphology of the coated and uncoated specimens was verified by using optical microscopy, AFM and SEM/EDX techniques. Results demonstrated a difference of about 360 mV between the pitting potential (E_{pitting}) and corrosion potential (E_{corr}) for the coated material, indicating the positive effect of Nb₂O₅ thin films on the corrosion resistance of the alloy. In addition, EIS results displayed the reactive sputtering technique was advantageous, since the impedance modulus increased significantly. To the best of our acknowledgement, this is the first study concerning the improvement of the corrosion properties of 7050-T7451 aluminium alloy by using the methodology presented in this work.

Keywords: 7xxx series aluminium alloys; Global electrochemical tests; Niobium pentoxide; Aircraft industry.