

Avaliação da biofuncionalidade de adição de prata em superfície anodizada de aço AISI 316L

Evaluation of the biofunctionality of the addition of silver on anodized surface of AISI 316L steel

Evaluación de la biofuncionalidad de la adición de plata sobre superficie anodizada de acero AISI 316L

Recebido: 25/10/2022 | Revisado: 06/11/2022 | Aceitado: 09/11/2022 | Publicado: 15/11/2022

Magali Petry

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5275-5005>

Universidade Feevale, Brasil

E-mail: magalipetry@yahoo.com.br

Sandra Raquel Kunst

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8060-3981>

Projeto de Fixação de Recursos Humanos do CNPq - Nível A (RHAE), Brasil

E-mail: tessaro.sandra@gmail.com

Fernando Dal Pont Morisso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9653-9857>

Universidade Feevale, Brasil

E-mail: morisso@feevale.br

Débora Rech Volz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6136-1809>

Universidade Feevale, Brasil

E-mail: deborarech2011@gmail.com

Ana Luiza Ziulkoski

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0850-4003>

Universidade Feevale, Brasil

E-mail: analuiza@feevale.br

Cláudia Trindade Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4472-5359>

Universidade Feevale, Brasil

E-mail: ctofeevale@gmail.com

Resumo

O aço inoxidável austenítico AISI 316L é um material já utilizado amplamente na área da medicina, principalmente nos sistemas públicos de saúde por sua alta disponibilidade e baixo custo. Este estudo tem por objetivo buscar o aperfeiçoamento das propriedades de biocompatibilidade deste material. Amostras de AISI 316L foram anodizadas com eletrólito 10M de NaOH densidade de corrente de 0,6 mA.cm⁻² por 5 e 10 minutos. A amostra anodizada por 5 minutos teve adicionada prata à superfície. As superfícies anodizadas foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG/EDS), microscopia de força atômica (AFM), ângulo de contato. Os ensaios de biofuncionalidade englobaram a formação de hidroxiapatita, citotoxicidade e ação bactericida e antifúngica. Os resultados mostraram uma camada anodizada nanorugosa com hidrofília e biofuncionalidade satisfatória para uso como biomaterial. Todavia, as amostras com prata não apresentaram resultado satisfatório de ação bactericida. O desempenho mais satisfatório atingido nas caracterizações foi apresentado pela amostra anodizada por cinco minutos em relação a propriedade de rugosidade, apresentando bons resultados para formação de hidroxiapatita. Desta forma, esta camada obtida se mostra como uma alternativa promissora para futuras aplicações em áreas biomédicas quando comparada ao aço original AISI 316L utilizado atualmente para estas funcionalidades.

Palavras-chave: Anodização; Biomateriais; Aço inoxidável AISI 316L.

Abstract

AISI 316L austenitic stainless steel is a material already widely used in medicine, mainly in public health systems due to its high availability and low cost. This study aims to improve the biocompatibility properties of this material. AISI 316L samples were anodized with 10M NaOH electrolyte, current density of 0.6 mA.cm⁻² for 5 and 10 minutes. The sample anodized for 5 minutes had silver added to the surface. Anodized surfaces were analyzed by scanning electron microscopy (FESEM/EDS), atomic force microscopy (AFM), contact angle. The biofunctionality assays encompassed the formation of hydroxyapatite, cytotoxicity and bactericidal and antifungal action. The results showed a nanorough anodized layer with hydrophilicity and satisfactory biofunctionality for use as a biomaterial. However, the samples with silver did not show a satisfactory result of bactericidal action. The most satisfactory performance achieved in the

characterizations was presented by the sample anodized for five minutes in relation to the roughness property, showing good results for the formation of hydroxyapatite. In this way, this layer obtained shows itself as a promising alternative for future applications in biomedical areas when compared to the original AISI 316L steel currently used for these functionalities.

Keywords: Anodizing; Biomaterials; AISI 316L stainless steel.

Resumen

El acero inoxidable austenítico AISI 316L es un material ya ampliamente utilizado en medicina, principalmente en los sistemas de salud pública debido a su alta disponibilidad y bajo costo. Este estudio pretende mejorar las propiedades de biocompatibilidad de este material. Muestras de AISI 316L fueron anodizadas con electrolito NaOH 10M, densidad de corriente de $0,6 \text{ mA.cm}^{-2}$ durante 5 y 10 minutos. La muestra anodizada durante 5 minutos tenía plata añadida a la superficie. Las superficies anodizadas se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM-FEG/EDS), microscopía de fuerza atómica (AFM), ángulo de contacto. Los ensayos de biofuncionalidad abarcaron la formación de hidroxiapatita, citotoxicidad y acción bactericida y antifúngica. Los resultados mostraron una capa anodizada nanorugosa con hidrofilia y biofuncionalidad satisfactoria para su uso como biomaterial. Sin embargo, las muestras con plata no mostraron un resultado satisfactorio de acción bactericida. El desempeño más satisfactorio alcanzado en las caracterizaciones lo presentó la muestra anodizada por cinco minutos en relación a la propiedad de rugosidad, mostrando buenos resultados para la formación de hidroxiapatita. De esta forma, esta capa obtenida se muestra como una alternativa prometedora para futuras aplicaciones en áreas biomédicas en comparación con el acero AISI 316L original que se utiliza actualmente para estas funcionalidades.

Palabras clave: Anodizado; Biomateriales; Acero inoxidable AISI 316L.

1. Introdução

É comum o uso de materiais metálicos para a fabricação de implantes ortopédicos, os quais são definidos como dispositivos mecânicos artificiais que substituem ou suportam parte da estrutura do esqueleto do corpo humano (Mahapatro, 2015). Amplamente utilizado em aplicações traumatológicas e ortopédicas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, o aço inoxidável austenítico AISI 316L possui boa resistência à corrosão e baixo custo em relação aos demais biomateriais disponíveis (Pinheiro et al, 2010).

De forma geral o uso do aço inoxidável AISI 316L como biomaterial possui aspectos positivos e negativos, alguns relacionados a defeitos do processo de fabricação. São reportados na literatura falhas relativas por fratura plástica, fratura frágil, fadiga, desgaste ou por associação entre estes (Guerra-Fuentes et al., 2015). Corrosão do implante devido ao contato dos fluidos corpóreos em material com falhas na camada passivada, reações alérgicas devido a liberação de íons (Silva & Oliveira , 2011). Também pode-se destacar certo nível de incompatibilidade de propriedades mecânicas em relação ao osso e a superfície dos materiais. Porém para os sistemas de saúde pública se apresenta como a material mais disponível atendendo de forma razoável as necessidades apresentadas (Chen & Thouas, 2015).

Tratamentos de superfícies têm sido empregados sobre o aço inoxidável AISI 316L com o intuito de otimizar suas propriedades superficiais para fins de otimização do processo de osseointegração. O desenvolvimento e o uso dessas técnicas baseiam-se na teoria de que o aumento do contato osso/implante pode ser atingido pela mudança da topografia ou pelo aumento da rugosidade superficial do implante (Le Guéhennec et al., 2007). A oxidação anódica é um dos métodos mais comuns e flexíveis empregados para modificar superfícies metálicas em nanoescala. Também conhecida por anodização, esta técnica tem sido usada com sucesso para transformar superfícies metálicas em estruturas nanotubulares com diâmetros inferiores a 100 nm (Kowalski et al., 2013).

É possível ainda gerar aperfeiçoamentos destes tratamentos superficiais pela adição de nanopartículas funcionais como por exemplo a prata. A prata tem conhecido potencial como agente bactericida. Atualmente este material é utilizada numa infinidade de aplicações biomédicas como biomateriais ortodônticos, cateteres e como medicação para queimaduras graves (Kim et al., 2007). Também são relatados estudos da ação bactericida, antiviral e antifúngica de íons de prata, causando um grande interesse de diversas áreas da medicina no uso deste material, principalmente na área cirúrgica e hospitalar que enfrenta grandes desafios no campo das infecções por microrganismos patológicos (Chen, Thouas 2015; Mirzaee et al., 2016). Deve-se levar em

consideração sempre o custo-benefício do uso da prata em relação a citotoxicidade apresentada a células humanas (Sivaraj, Vijayalakshmi 2019).

2. Metodologia

Para realização deste trabalho, foram utilizadas chapas conformadas de aço inoxidável austenítico AISI 316L (grau médico) cortadas em peças de aproximadamente 2,5 x 2,5 cm.

Preparação da superfície

As amostras foram lixadas e polidas em polítriz de bancada modelo Polipan-U da marca Pantec, seguindo a sequência de lixa de grão 400, 600, 800, 1200, 2400 e espelhada com lixa grão 4000, finalmente lavada com álcool e seca com fluxo de ar. As amostras foram decaçadas em solução de HF:HNO₃ 1:3, por 30 segundos, imediatamente antes das anodizações. Após, foram enxaguadas em água corrente e água deionizada, respectivamente.

Processo de anodização

As anodizações foram realizadas utilizando uma fonte de tensão de 300V – 500 mA, acoplada a um computador para o registro de dados. A amostra foi conectada como ânodo e o cátodo utilizado foi um fio de platina, ambos a uma distância de 35 mm entre si. O processo foi realizado em modo galvanostático, ou seja, manteve-se a corrente constante, sem limitação de potencial. Foi utilizada uma densidade de corrente de 0,6 mA.cm⁻². O eletrólito utilizado foi de solução 10 M NaOH preparada a partir de reagente Hidróxido de Sódio PA. Fabricante Dinâmica. A anodização foi processada sob temperatura de 70°C e agitação constante para eliminação das bolhas de gás formadas.

Devido a variação visual observada, principalmente por coloração, optou-se em preparar amostras com tempos distintos de anodização. Sendo assim, foram obtidas amostras com 5 minutos e com 10 minutos de anodização. Desta forma foi adotada uma nomenclatura para cada amostra para um melhor entendimento da discussão dos resultados. A Tabela 1 exibe as nomenclaturas de cada tipo de amostra que foram caracterizadas até o momento.

Tabela 1. Definição das nomenclaturas das amostras.

| Amostras | Tratamento |
|-----------------|---|
| A-0 | Aço AISI 316L original lixado |
| A-5 | Aço AISI 316L lixado e anodizado por 5 minutos |
| A-10 | Aço AISI 316L lixado e anodizado por 10 minutos |

Fonte: Autores.

Na Tabela 1 observa-se pela nomenclatura das amostras que o A corresponde ao aço AISI 316L, e que a numeração 0, 5 e 10 minutos corresponde aos tempos de anodização estudados.

Ensaios de Caracterização Superficial

As amostras foram avaliadas quanto a morfologia em vista de topo por meio de análise em equipamento Microscópio Eletrônico de Varredura, assim como, análise de EDS para identificação dos elementos químicos presentes. Equipamento utilizado de marca Jeol e de modelo JSM-6510LV. Também foram realizadas análises de micrografia de MEV-FEG. O equipamento utilizado se trata do modelo INSPEC F50 30 kV da Fabricante FEI.

A análise de hidrofobicidade foi feita por meio de medição de ângulo de contato em solução líquida de SBF, com uso

de equipamento para medição da marca Labcontrol, de modelo OCA 15EC. O ensaio foi realizado em triplicata e a aquisição de dados foi feita através do Software SCA20_U, da Dataphysics Instruments.

Foi realizada análise de microscopia de força atômica (AFM) com objetivo de determinar a rugosidade das amostras pela avaliação por medidas de rugosidade média (Ra). Foi utilizado o microscópio de força atômica Tosca 400 fabricante Anton Paar, modo contato, cantiléver fabricante Nanoworld, tipo Arrow CONTR, mesa de isolamento ativo de vibração para bancadas. Área de varredura de 5 μm^2 em 3 regiões distintas. Estes ensaios foram realizados pela empresa Anton Paar.

Incorporação de nanocargas de prata

Após a análise e discussão dos resultados da caracterização das superfícies anodizadas, foi selecionada a metodologia que apresentou resultado mais promissor para o processo de incorporação de prata na superfície. A incorporação de prata foi realizada em metodologia adaptada de Ferreira et al. (2019) que consiste na agitação ultrassônica da amostra em solução de 5 mM de nitrato de prata por 1 hora em intervalos de 15 minutos para resfriamento da solução. Após a amostra foi seca por 48 horas em temperatura ambiente.

Ensaio de biofuncionalidade

As amostras de aço AISI 316L anodizadas e original foram imersas em SBF (fluido corpóreo simulado) para avaliação da bio-mineralização através da capacidade de formação de hidroxiapatita. Após serem imersas em um frasco esterilizado contendo 10 mL de SBF permanecendo em estufa a 80° C por 5 dias, as amostras foram lavadas com água deionizada e, em seguida, secas ao ambiente (Huang et al., 2018; Lin et al., 2002). A morfologia da superfície das amostras após imersão no SBF foi caracterizada por uma varredura de emissão de campo microscopia eletrônica (MEV) e análise de espectroscopia por energia dispersiva (EDS) para identificação dos elementos químicos presentes. Na Tabela 2 estão apresentados os reagentes utilizados na composição do SBF, assim como a quantidade e a ordem em que foram dissolvidos em água destilada (Kokubo et al., 2006).

Tabela 2 - Reagentes para a preparação de 1 litro de solução de SBF (Kokubo et al., 2006).

| Ordem | Reagente | Composição (g) | Pureza |
|--------------|--|-----------------------|---------------|
| 1 | Cloreto de sódio (NaCl) | 8,035 | 99,5 |
| 2 | Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃) | 0,355 | 99,5 |
| 3 | Cloreto de potássio (KCl) | 0,225 | 99,5 |
| 4 | Fosfato de potássio dibásico trihidratado (K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O) | 0,231 | 99 |
| 5 | Cloreto de magnésio hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O) | 0,311 | 98 |
| 6 | Ácido clorídrico [HCl (1,0 M)] | 39 mL | - |
| 7 | Cloreto de cálcio (CaCl ₂) | 0,292 | 95 |
| 8 | Sulfato de sódio (Na ₂ SO ₄) | 0,072 | 99 |
| 9 | Tris(hidroximetil)aminometano [(OHCH ₂) ₃ CNH ₂] | 6,118 | 99 |
| 10 | Ácido clorídrico [HCl (1,0 M)] | 0-5 mL | - |

Fonte: Autores.

Na Tabela 2 é mostrado os reagentes utilizados para a preparação de 1 litro de solução de SBF. Entre as diversas técnicas desenvolvidas para o estudo do comportamento de biomateriais, a utilização de uma solução de SBF (*simulated body fluid*), como eletrólito para avaliação do comportamento eletroquímico, têm se mostrado bastante promissora para fins de simulação das condições do ambiente corpóreo (Kokubo et al., 2006).

A análise de viabilidade celular foi realizada a fim de determinar a citotoxicidade das amostras. Para tanto se avaliou a viabilidade celular de células tipo NIH-3T3. A linhagem celular NIH-3T3 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro

(BCRJ); foi cultivada em meio DMEM (Dubelco's Modified Eagle's Medium, Sigma®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®). As culturas foram mantidas em atmosfera úmida a 5% de CO₂, 37°C, em sistema semiaberto, utilizando o processo de tripsinização para sua manutenção. Para os diferentes ensaios, 30 000 células/poço foram plaqueadas em microplacas de poliestireno de 96 poços, sendo mantidas em condições usuais até atingirem subconfluência.

Para obtenção dos meios de extração (ME), fragmentos das amostras de aço foram pesados em tubos de 15 mL e em seguida imersos em meio de cultivo sem soro mantendo a proporção de 1 g para cada 5 mL de meio. Essa preparação foi mantida em geladeira (5 a 7°C) por 24 horas, e a seguir esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose 0,22 µm. O meio assim obtido foi determinado como ME 100%, sendo as demais concentrações (75, 50 e 25%) obtidas por simples mistura com meio de cultivo usual.

Para a exposição aos MEs, o meio de cultivo celular foi trocado pelos MEs nas diferentes concentrações suplementado com 1% de soro bovino fetal, em quadruplicatas, e as culturas foram mantidas em exposição durante 24 horas. Como controle negativo foram utilizados cultivos mantidos em meio de cultivo com 1% de soro bovino fetal, e como controle positivo foram utilizadas culturas incubadas com peróxido de hidrogênio 1% (Synth®) por 60 minutos.

A citotoxicidade foi avaliada no final do período de incubação através do ensaio de redução do MTT (Sigma®), que determina a funcionalidade mitocondrial. Brevemente, as células foram lavadas com CMF (solução salina tamponada sem cálcio e magnésio), adicionando-se CMF contendo 200 µg/mL de MTT e os cultivos foram mantidos em estufa por 2 horas. Após descarte desse meio, os cristais de *formazan* (produtos cromogênicos artificiais resultantes da redução de sais tetrazólio por desidrogenases e redutases) foram dissolvidos com DMSO, seguido por leitura em espectrofotômetro de microplacas (Spectramax M3, Molecular Devices®) à 570nm.

Para a avaliação de formação de biofilme sobre mini placas metálicas foram cultivadas as cepas bacterianas (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. aureus* ATCC 12598) e a cepa fungica (*C. albicans* ATCC 10231) em ágar sangue. Nas 24h seguintes foram utilizadas as cepas para preparação dos inóculos para a formação do biofilme; esses inóculos foram preparados com Mueller Hinton Broth, próximos a escala 0,5 de MacFarland, que equivale à 1,5 X10⁸ UFC/mL (unidades formadoras de colônias). Em placas estéreis de cultivo celular recobertas por 400 µL ágar Mueller Hinton foram fixadas as placas de metal e aproximadamente 30 min depois foram adicionados 400 µL dos inóculos cobrindo a superfície superior das placas de metal. As placas foram incubadas em estufa (36°C) por 24h. Após, as placas de metal foram transferidas com o auxílio de pinças estéreis para novas placas de cultivo celular onde foram recobertas por 500 µL de Mueller Hinton Broth e permaneceram em estufa por 72h.

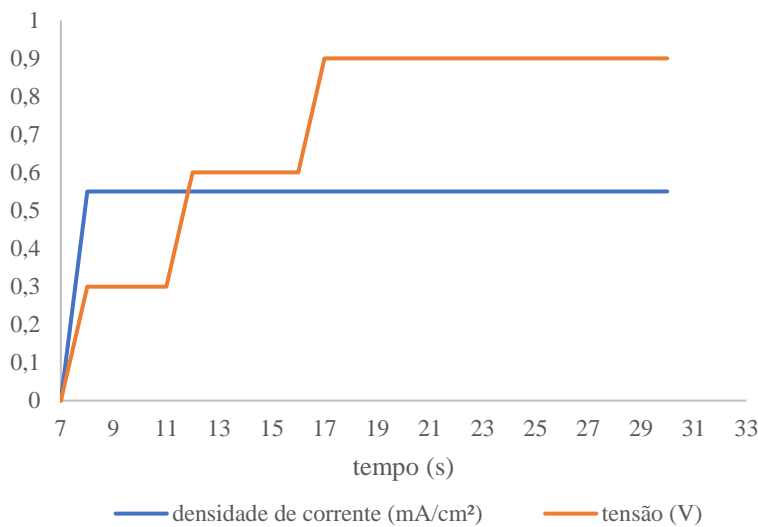
Quando completas as 48h de incubação as placas de metal foram coradas por Cristal Violeta. Primeiramente foram adicionados 400 µL de Formaldeído 4% para fixação durante 15min. Em seguida com auxílio de micropipeta removeu-se a parte líquida e foi adicionado o corante, o volume variou conforme necessário para que a superfície das mini placas fossem cobertas em torno de 400-600 µL, durante 30 min. Após esse período foi removido o excesso de cristal, com o auxílio de um papel absorvente, e as mini placas de metal foram transferidas para outros poços de cultivo celular. Para a solubilização foram adicionados 300 µL de álcool etílico absoluto e lidas no comprimento de 580nm pelo espectrofotômetro. O corante violeta fixa-se na membrana celular, sendo assim, a intensidade da cor é diretamente proporcional a quantidade de microrganismos presente nas placas de metal.

3. Resultados e Discussão

Transientes de anodização

A Figura 1 ilustra o gráfico do comportamento do potencial e da densidade de corrente. As medidas de densidade de corrente e de potencial iniciam a partir de 7s em função de atraso na medida assim que o equipamento é ligado. É possível observar que enquanto a densidade de corrente rapidamente se estabiliza o potencial ainda aumenta em patamares até alcançar a estabilidade. Isso possivelmente pode ser explicado pela formação inicial de Fe(OH)_2 por dissolução dos íons Fe, ainda oferecendo baixa diferença de potencial em relação a dissolução proveniente de íons Fe da nova camada barreira formada após decorrido um certo tempo (Wang et al.,2020).

Figura 1 - Comportamento da densidade de corrente e potencial de aço AISI 316L durante anodização em solução 10 M NaOH.



Fonte: Autores.

É possível observar na Figura 1 um pico inicial de densidade de corrente e potencial nos segundos iniciais de anodização atingindo 0,9 V e uma densidade de corrente de 0,55 mA/cm². Estes valores se mantêm constantes até o fim da anodização em ambos tempos analisados e foram obtidos de forma experimental através da otimização dos parâmetros de anodização como concentração e temperatura do eletrólito, potencial, densidade de corrente e pré-tratamentos da amostra. De forma experimental elevou-se a densidade de corrente e o potencial de anodização, porém observou-se que o sistema passou a priorizar a evolução de oxigênio (observação visual da formação de bolhas e coloração esbranquiçada do eletrólito) em detrimento da formação de filme anódico. Isto indica que o sistema passou para novo equilíbrio de propriedades da região transpassiva do ferro com potencial acima de 2 V (Gentil, 2012). Este baixo valor de potencial para obtenção de filme de óxido também foi empregado por Asoh et al. (2016) mesmo utilizando um eletrólito ácido de 5 M H₂SO₄ em aço AISI 304. Da mesma forma o aumento da densidade de corrente também inibiu o crescimento de filme anódico devido a dissolução do aço na região transpassiva.

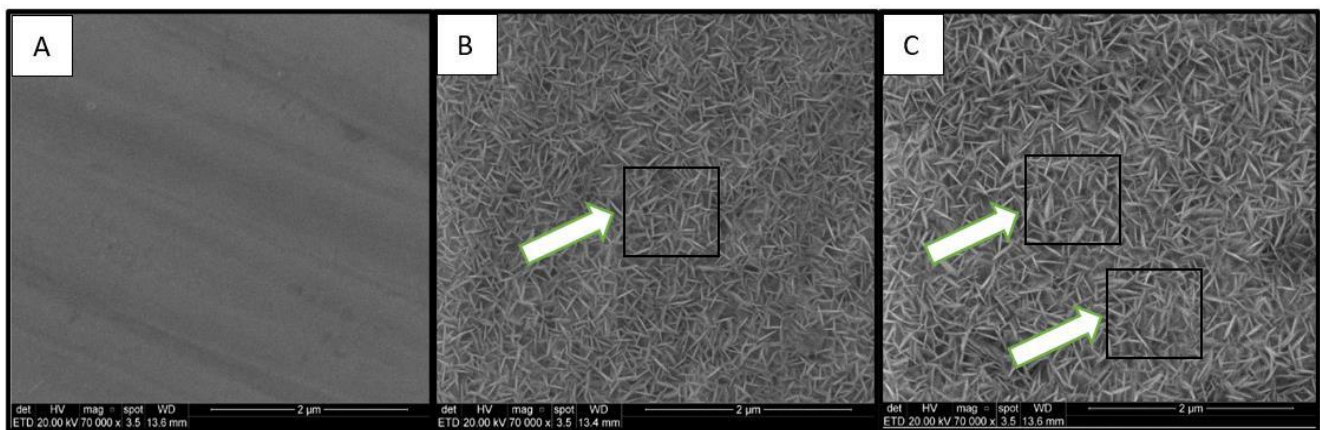
O comportamento constante da densidade de corrente pode ser explicado devido à dissolução do ferro ser catalisada na presença de íons OH⁻ em solução alcalina. Isso é observado também em soluções ácidas mesmo com a mínima concentração de íons OH⁻. O processo de dissolução tem forte envolvimento de íons hidroxila, com a formação inicial de Fe(OH)_2 ou Fe(OH)^+ que rapidamente se decompõem em Fe^{2+} na solução. Isso sugere que o catalisador cuja concentração muda lentamente com o potencial é o íon hidroxila adsorvido e que o processo real de dissolução envolve OH⁻ livre (Young, 1961).

As teorias dos mecanismos de crescimento dos filmes passivos em aços inoxidáveis, como da condução mista, incluem diferentes estágios da formação da camada passiva, partindo da superfície exposta do metal até o estado estacionário de passividade. Os dados obtidos por STM (microscopia de varredura por tunelamento) em solução tampão de borato aumentam as evidências de que a formação de filmes passivos passa por um processo de nucleação, seguido pelo crescimento do óxido até a formação de um filme regular contínuo (Marcus e Maurice 2000). Esta teoria de crescimento pode relacionar o aumento do potencial em etapas no início do processo com a formação das ilhas de óxido ou hidróxido.

Análise da topografia superficial por MEV-FEG

A Figura 2 apresenta as micrografias obtidas ao MEV-FEG em vista de topo para as amostras A-O, A-5 e A-10 na magnitude de 70 000 vezes.

Figura 2 - Micrografias obtidas ao MEV-FEG em vista de topo das amostras: (a) amostra A-O; (b) amostra A-5 e (c) amostra A-10 em 70 000 vezes.



Fonte: Autores.

Observa-se na micrografia da Figura 2a que se refere ao aço AISI 316L original (A-O) apenas polido que não há presença de nenhuma estrutura específica que indica que a superfície do aço é uniforme e homogênea. As micrografias concordam com os resultados obtidos para o aço AISI 316L sem tratamentos por Saha et al. (2019) e Longhi et al. (2021). A literatura indica que existe uma formação de fina camada de óxido passivo natural da ordem de 1 a 3 nm de espessura, devido a este valor muito baixo de espessura é difícil identificar qualquer estrutura com os recursos de equipamento aqui utilizado (Saha et al., 2019).

Na Figura 2b é possível observar a formação de estruturas com arranjo de nanoplacas com ângulos bem definidos. Porém como se esperava não ocorreu formação de poros com aberturas circunferenciais de acordo com o resultado obtido por Burleigh et al. (2009) utilizando eletrólito de 12,5 M de NaOH e substrato de aço de composição com baixo teor de cromo. Estas diferenças em relação ao estudo realizado aqui podem explicar a morfologia diferenciada obtida nas amostras A-5 e A-10.

De acordo com o observado na amostra A-5, a amostra A-10 (Figura 2c) apresentou comportamento similar, destacando-se uma sutil diferença no comprimento das nanoplacas resultantes, indicando um comprimento maior com maior tempo de anodização.

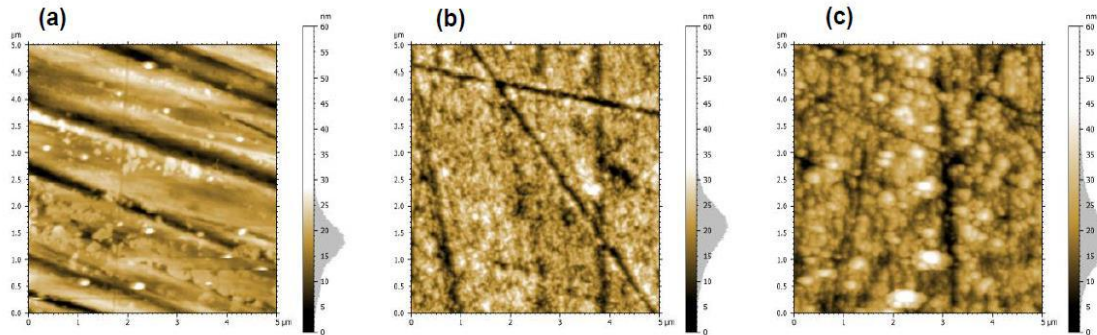
Nas micrografias da Figura 2 (b e c) observa-se que o crescimento das nanoplacas ocorre de forma perpendicular a superfície dos contornos de grãos. Isto leva ao indício que o mecanismo predominante de crescimento da camada de óxido ocorre por eletroestricção em detrimento ao mecanismo de dissolução-precipitação. Se o mecanismo de dissolução-precipitação fosse

dominante, resultaria em uma camada de óxido homogênea e compacta, característica de filmes tipo barreira (Burleigh, Schmuki, Virtanen 2009).

Análise da topografia superficial por microscopia de força atômica (AFM)

A Figura 3 apresenta as imagens bidimensionais obtidas por microscopia de força atômica (AFM) com área de $5 \mu\text{m}^2$ para as amostras A-O, A-5 e A-10.

Figura 3 - Imagens 2D obtidas por microscopia de força atômica com área de $5 \mu\text{m}^2$ das amostras: (a) A-O; (b) A-5 e (c) A-10.



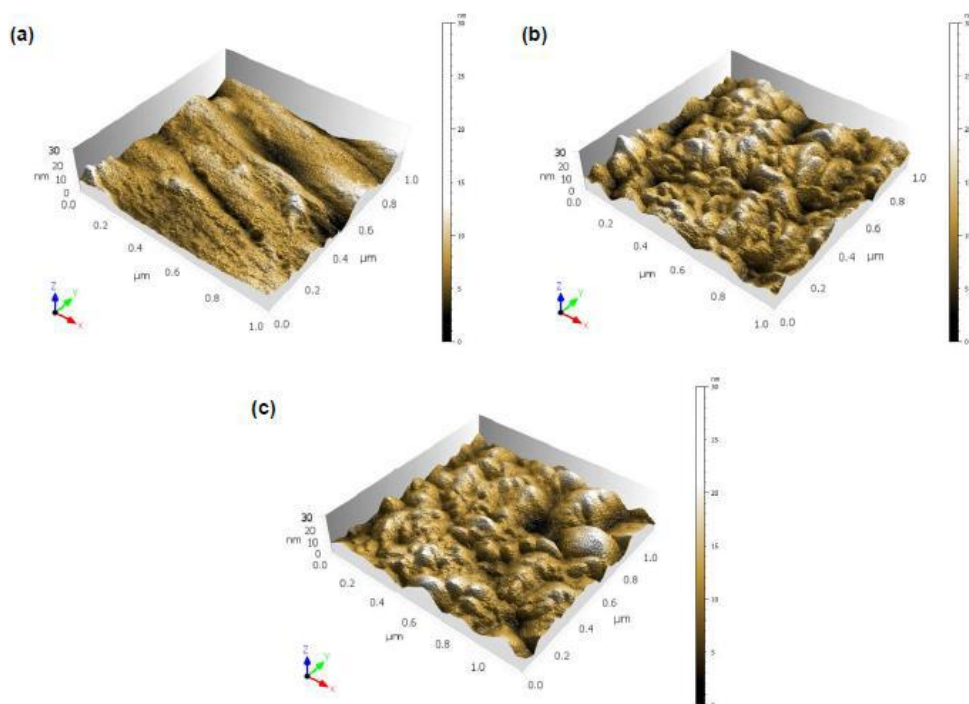
Fonte: Autores.

Na Figura 3 pode-se observar que a amostra A-O apresenta uma superfície mais homogênea em relação as amostras A-5 e A-10. Nas 3 amostras são percebidos riscos direcionais característicos da preparação das amostras em politriz, porém observa-se que a medida que aumenta o tempo de anodização os riscos se tornam menos profundos, sendo ocupados por pequenas partículas de óxido.

A Figura 4 apresenta as imagens tridimensionais obtidas por microscopia de força atômica (AFM) com área de $5 \mu\text{m}^2$ para as amostras A-O, A-5 e A-10. É possível observar uma diferença interessante quanto a superfície de aço original, mais uniforme e regular em relação as amostras anodizadas A-5 e A-10. Estes resultados se complementam aos observados pelas micrografias ao MEV-FEG (Figura 2) sendo que nas amostras anodizadas formaram-se pequenas estruturas nodulares de uma camada de óxido condizente com as nanoplacas vistas nas micrografias.

A Figura 4 também reforça a evidência do mecanismo proposto de crescimento do filme de óxido. Uma vez que houve um preenchimento dos riscos de forma homogênea e perpendicular a superfície, observa-se que quanto maior o tempo de anodização, maior o volume dos nódulos formados, o que vem de encontro com a proposta da formação de ilhas de óxidos com crescimento por precipitação e eletroestricção (Marcus, Maurice 2000; Wang et al. 2020).

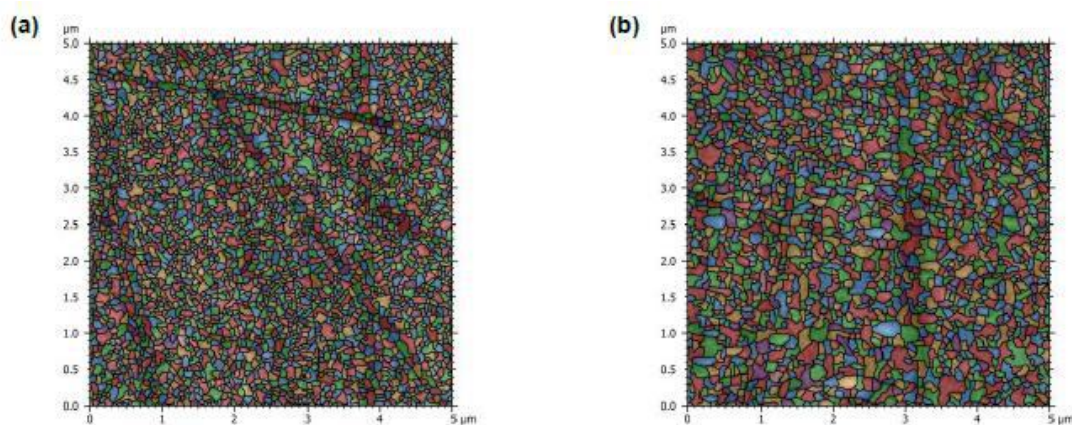
Figura 4 - Imagens 3D obtidas por microscopia de força atômica com área de $5\mu\text{m}^2$ das amostras: (a) A-O; (b) A-5 e (c) A-10.



Fonte: Autores.

De forma complementar foi realizada análise do tamanho médio de partículas nas amostras A-5 e A-10, utilizando software específico, onde se nota a predominância de partículas maiores de forma homogênea que corrobora com as imagens obtidas em 3D. A Figura 5 apresenta a análise de tamanho médio de partículas das amostras A-5 e A-10.

Figura 5 - Análise de tamanho médio de partículas das amostras (a) A-5 e (b) A-10.



Fonte: Autores.

Observa-se na Figura 5 que mesmo no interior dos riscos a formação dos nódulos é proporcional aos formados na superfície mais plana. A Tabela 3 apresenta os resultados de tamanho médio de partículas na área analisada de $5\mu\text{m}^2$.

Tabela 3 - Resultados medições de tamanho médio de partículas.

| Amostras | Área média das partículas (μm^2) | Desvio quadrático médio |
|----------|---|--------------------------|
| A-5 | $8,4 \times 10^{-3}$ | $\pm 0,3 \times 10^{-3}$ |
| A-10 | $13,9 \times 10^{-3}$ | $\pm 2,0 \times 10^{-3}$ |

Fonte: Autores.

Na Tabela 3 observa-se que apesar de estarem na mesma ordem de grandeza os valores da área média das partículas ficou maior para a amostra A-10 do que para a amostra A-5 o que era esperado devido ao aumento do tempo de anodização.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros de rugosidade média (R_a) e desvio quadrático médio obtidos no ensaio de AFM.

Tabela 4 - Resultados de rugosidade média das amostras analisadas.

| Amostras | Valor de R_a (nm) | Desvio quadrático médio |
|----------|---------------------|-------------------------|
| A-0 | 6,7 | $\pm 3,2$ |
| A-5 | 6,0 | $\pm 1,1$ |
| A-10 | 5,1 | $\pm 1,2$ |

Fonte: Autores.

Na Tabela 4 observa-se que nenhuma das amostras apresentou um valor de rugosidade (R_a) com diferença significativa, conforme observado, todas as amostras apenas apresentaram microrugosidade baixa. Conforme Costa et al. (2014), a estabilidade primária do implante com morfologia microrugosa foi confirmada com taxas de sucesso relativamente mais altas, devido ao aumento da camada de óxido disponível, que é um dos fatores mais relevantes no processo de adesão celular, auxiliando assim o crescimento ósseo diretamente na superfície.

Segundo muitos autores, o comportamento frente à processos corrosivos, pode ser relacionado com a rugosidade da superfície. De modo geral, quanto maior o parâmetro de rugosidade da superfície de um sistema, isto é, mais rugoso, menor é a sua resistência à corrosão, visto que, a rugosidade superficial aumenta a área de contato do revestimento às soluções responsáveis pelos ataques químicos, no caso de biomateriais, o fluido corpóreo, acelerando assim o processo de corrosão que venha a acontecer e deteriorando inicialmente a superfície do substrato (Brooks et al., 2017; Parra et al. 2006).

Todavia, para biomateriais, uma superfície lisa, sem rugosidade, não permite uma boa biocompatibilidade, pois a integração de implantes ao tecido ósseo in vivo está relacionada com um aumento da rugosidade da superfície do implante, uma vez que, os osteoblastos humanos se aderem melhor a superfícies rugosas em detrimento as lisas. A adesão normalmente aumenta em superfícies com rugosidade média (R_a) em até $1\mu\text{m}$ (Anderson et al., 2016; Pfeiffer et al. 2003).

Algumas células possuem preferência por topografias ásperas e outras suaves, como é o caso dos osteoblastos ou análogas que preferem superfícies mais rugosas da ordem de $2\mu\text{m}$, enquanto fibroblastos, tipo de célula mais comumente encontrada no tecido conjuntivo, possuem melhor aderência a superfícies mais suaves da ordem de $0,04\mu\text{m}$ (Kunzler et al., 2007).

Busca-se um biomaterial que apresente um equilíbrio entre propriedades de resistência a corrosão e biocompatibilidade, a amostra A-5 mais uma vez apresentou-se promissora na boa relação de superfície com microrugosidade mais visível que a amostra de aço original (A-O).

Ângulo de Contato

O ensaio de molhabilidade foi realizado em todas amostras, com uso de eletrólito SBF ($\text{pH} = 7,4$). A Tabela 5 apresenta

os valores médios de ângulo de contato, em ordem crescente, obtidos pelo método da gota séssil.

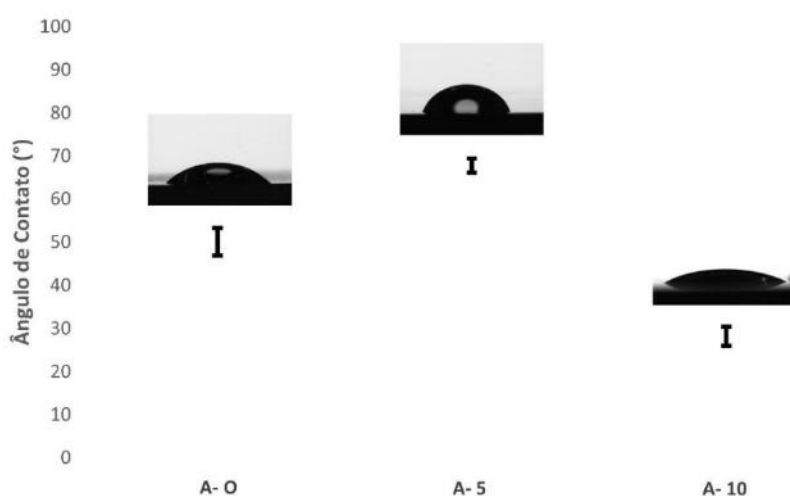
Tabela 5 - Ângulo de contato obtido pela gota séssil.

| Amostra | Média (°) | Desvio Padrão (°) |
|---------|-----------|-------------------|
| A-0 | 50,10 | 3,20 |
| A-5 | 67,85 | 1,64 |
| A-10 | 28,20 | 2,17 |

Fonte: Autores.

Pela análise dos resultados da Tabela 6 permite afirmar que todas as amostras avaliadas possuem uma superfície com caráter hidrofílico, com valores de ângulo de contato inferiores a 90° (superfície com molhamento parcial). A hidrofobicidade da superfície está diretamente ligada a energia superficial do sólido. Ela pode ser avaliada pelo ângulo de contato formado por uma gota de líquido com a superfície. Uma adesão maior de líquidos resulta em um ângulo menor de contato, indicando assim um caráter hidrofílico na superfície. Desta forma, quanto maior for a energia livre superficial, maior será a molhabilidade e consequentemente maior a adesão de líquidos (Francisco, 2013). Todavia, proporcional ao ângulo de contato do líquido com a superfície do revestimento, o grau de hidrofobicidade de uma superfície está diretamente relacionado com sua capacidade de proteção anticorrosiva (Evans, Leiva-Garcia, Akid 2018; Gama, 2014). A Figura 6 ilustra imagem do ângulo entre as amostras para fins de análise comparativa.

Figura 6 - Ângulo de contato obtido pela gota séssil.



Fonte: Autores.

Em biomateriais se deseja que o ângulo de contato não seja superior a 70° priorizando certa rugosidade atrelada a molhabilidade nas interações do material com o tecido ósseo (Vogler, 1998). Todas as amostras apresentaram valor adequado como pode ser observado na Figura 6. Nota-se que a amostra de aço original (A-0) apresenta valor mais baixo de ângulo de contato que a amostra anodizada por 5 minutos (A-5) possivelmente pelo fato de ter sido lixada em lixa grão 4000. O aço AISI 316L é usado como biomaterial em implantes por décadas de modo satisfatório, sendo este valor de ângulo de contato adequado para sua finalidade (Maximo et al., 2016; Strnad et al., 2016).

A amostra A-5 também apresentou um valor satisfatório para uso como biomaterial. A camada de filme passivo formada indica a ocorrência de ativação de energia livre e de certa porosidade. Todavia, o ângulo de contato obtido também traz certo

benefício quanto à resistência à corrosão por não ser tão hidrofílica em comparação a amostra A-10 (Anderson et al. 2016; Ansell et al., 1978).

Em estudo de Anderson et al., (2016) o aumento da rugosidade se mostrou como aspecto favorável para uma maior ativação dos macrófagos do tecido ósseo, também chamados de osteoclastos, responsáveis pela preparação da superfície para que os osteoblastos iniciem a neoformação óssea. Os osteoblastos, por sua vez, são responsáveis por sintetizar a parte orgânica da matriz óssea, concentrando fosfato de cálcio e participando da mineralização. A amostra A-10 que apresenta boa qualidade hidrofílica concorda com o fato de possuir uma camada mais espessa de óxido, por consequência maior porosidade. Deve-se considerar também que a anodização foi realizada em eletrólito de 10 M NaOH implicando em uma ativação da superfície com íons hidroxila livre que favorecem a hidratação e a atração de cátions de cálcio, magnésio e potássio presentes no SBF e principais precursores da formação da apatita (substância presente no tecido ósseo). A formação desta substância em coberturas de implantes obteve bons resultados de ativação de células anti-inflamatórias (Bian et al., 2019; Lin et al., 2002).

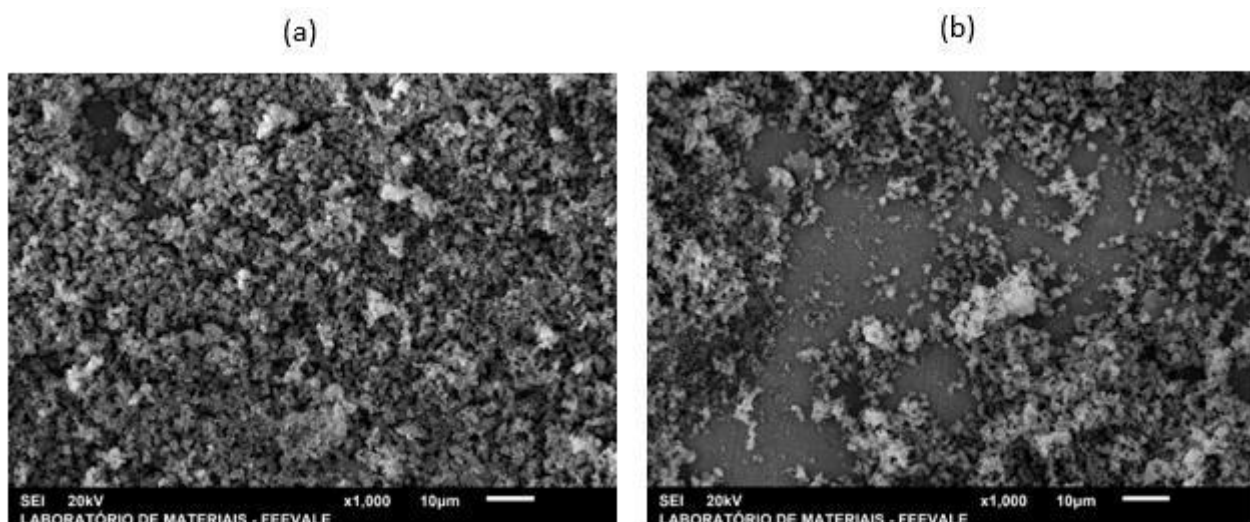
Por outro lado, ângulos de contato com valores acima de 70° , caracterizados hidrofóbicos se tratando de biomateriais, indicam dificuldade à permeação do eletrólito, bem como, a lixiviação de íons para o ambiente corpóreo, aumentando seu desempenho anticorrosivo (Y. Huang et al., 2018). Estas características também são desejáveis para o biomaterial, especialmente quando se trata de uma região de caráter inflamado, onde o fluido corpóreo apresenta pH mais baixo. Um ângulo de contato muito baixo pode indicar um desempenho anticorrosivo baixo e problemas de reações alérgicas, inflamações e rejeição do biomaterial (Peng et al., 2019; Yuan et al., 2019).

De forma geral, para biomateriais, superfícies hidrofílicas são mais desejadas, tendo em vista suas melhores interações com os fluidos corpóreos, células e tecidos durante o processo pós cirúrgico (Anderson et al. 2016; Coelho, Jimbo 2014).

Formação de hidroxiapatita

A Figura 7 apresenta as micrografias ao MEV após ensaio de formação de hidroxiapatita sobre a amostra A-5 (a) e amostra A-O (b). Optou-se em trabalhar somente com a amostra A-5 a partir desta fase do estudo, pois está apresentando resultados mais satisfatórios de molhabilidade e morfologia em relação a amostra A-10 que indicam uma melhor biofuncionalidade. Desta forma obteve-se uma comparação com o aço original que é utilizado normalmente como biomaterial.

Figura 7 - Micrografia ao MEV das amostras (a) A-5 e (b) A-O com magnificação de 1000x após ensaio de formação de hidroxiapatita.



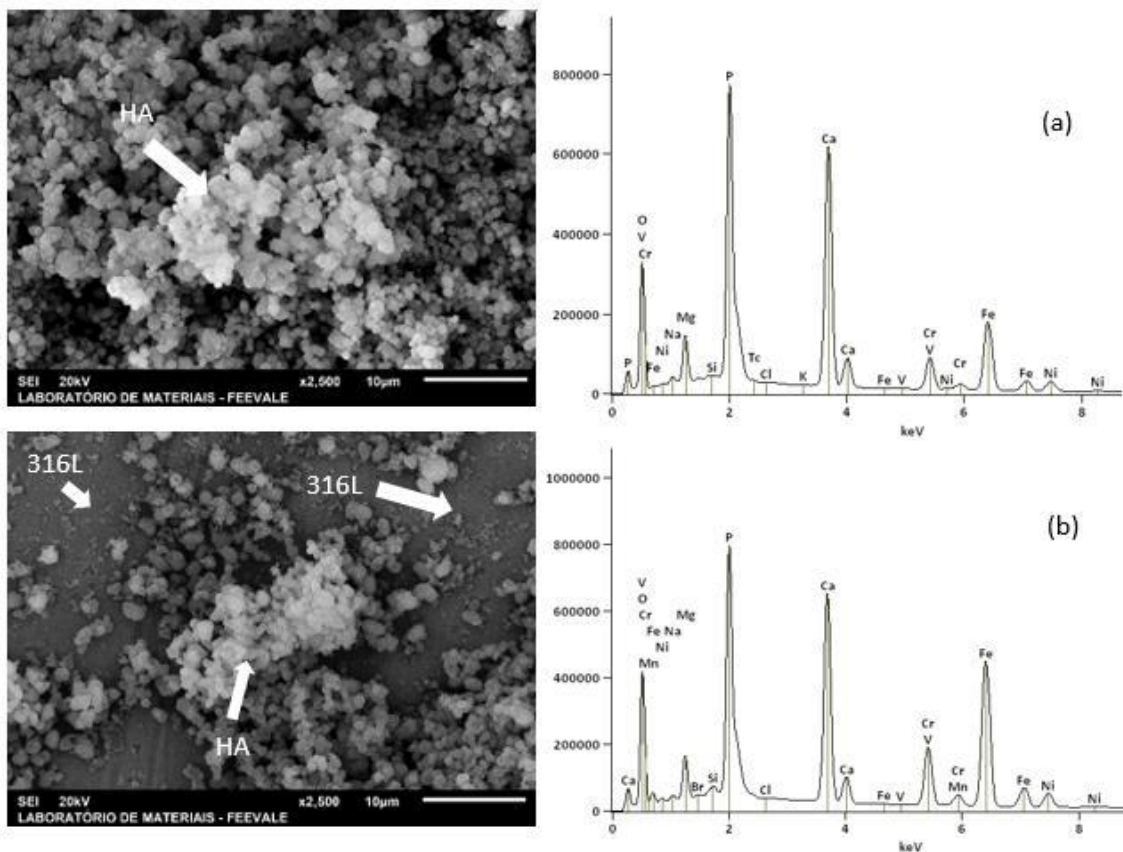
Fonte: Autores.

Na Figura 7 é possível observar que a amostra A-5 apresentou um resultado de formação mais homogênea e regular de recobrimento por hidroxiapatita. Este fato pode ser atribuído ao mecanismo de crescimento da camada anódica que resulta em uma superfície com radicais OH livres em abundância (Marcus, Maurice 2000).

Esta característica cria uma grande afinidade com os cátions presentes na solução de SBF como Ca^{2+} , Na^+ , K^+ e Mg^{2+} , iniciando uma nucleação mais intensa devido ao aumento da concentração de cátions para a superfície, atraindo os ânions da solução de SBF, principalmente o ânion fosfato e desta forma aumentando a camada de hidroxiapatita (Huynh, Ngo, Golden 2019).

Na Figura 8 estão apresentadas as micrografias ao MEV e EDS das amostras A-5 e A-O com magnificação de 2500x.

Figura 8 - Micrografia ao MEV e EDS das amostras (a) A-5 e (b) A-O com magnificação de 2500x após ensaio de formação de hidroxiapatita.



Fonte: Autores.

Com estes resultados na Figura 8 se torna claro como houve baixa cobertura de camada de hidroxiapatita na amostra de aço original (A-O). Na Figura 8b é possível visualizar áreas nítidas de substrato de aço AISI 316L aparentes. Os conglomerados brancos indicados pelas setas se referem a hidroxiapatita conforme indicam os resultados de EDS. Na amostra A-O nota-se uma dificuldade de dispersão, indicada pela nucleação concentrada observada. No EDS verifica-se que a intensidade de elementos do substrato como ferro, cromo e níquel é superior na amostra A-O em relação à amostra anodizada (A-5).

A presença de um intercomposto na camada anodizada com presença de sódio e cromo também pode atuar como catalisador da formação de hidroxiapatita. Uma conexão entre material metálico (substrato aço AISI 316L) e um material cerâmico (hidroxiapatita presente no tecido ósseo) pode ser a chave para uma biocompatibilidade de sucesso (Lin et al., 2002).

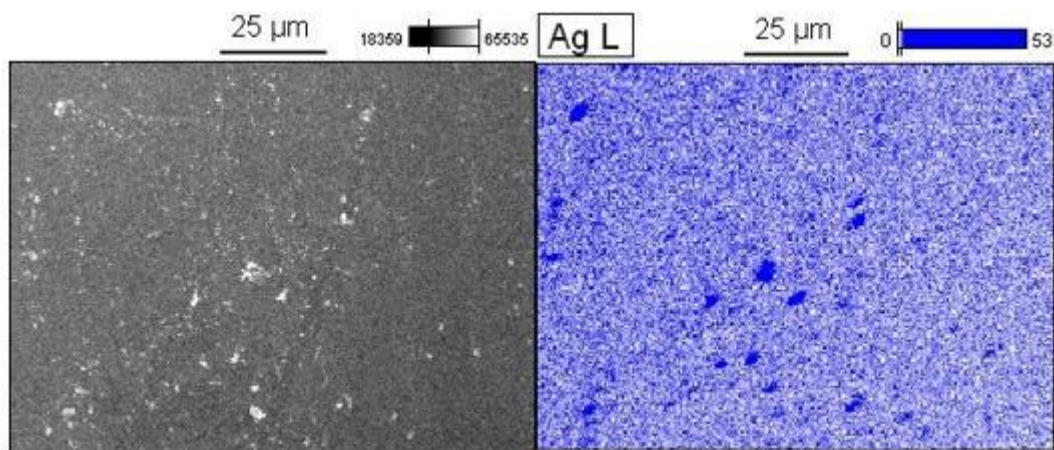
O fator de topografia da superfície, discutido no item anterior deste estudo também pode ser relacionado ao melhor resultado obtido na formação de hidroxiapatita na amostra anodizada. Em estudo de eletrodeposição de HA sobre camada de nanotubos anodizados de titânio para implantes odontológicos, foi observado que ocorreu uma interligação mecânica maior entre a camada de HA na superfície com nanotubos mais profundos (Parcharoen, Kajitvichyanukul, Sirivisoot, & Termsuksawad, 2014).

Os três fatores relacionados: superfície ativada com hidroxilas livres, intercomposto de óxido de cromo sódio e topografia podem estar operando simultaneamente para a explicar o resultado promissor observado na formação de HA sobre a superfície da amostra A-5.

Incorporação de nanocargas de prata na superfície anodizada

A Figura 9 apresenta o mapeamento por EDS da amostra A-5 após incorporação da prata. A amostra A-5 foi selecionada devido aos resultados promissores apresentados nas caracterizações da superfície para uso como biomaterial, destacando a molhabilidade e a resistência à corrosão.

Figura 9 - Micrografia ao MEV e mapeamento por EDS da amostra A-5 após incorporação da prata na superfície.



Fonte: Autores.

Na Figura 9 se observa que ocorreu uma dispersão muito favorável das espécies de prata, de aspecto homogêneo e regular sem áreas carentes de prata visíveis. De forma análoga ao efeito observado na formação de hidroxiapatita sobre a superfície, a presença de radicais hidroxila livres (Marcus, Maurice, 2000) é provável responsável pela ligação dos íons de prata à superfície. A grande dificuldade para dopagem de superfícies com prata está relacionada ao tamanho de partículas para um efeito bactericida satisfatório. Quanto menor a partículas de prata, maior o efeito bactericida (Kim et al. 2007; Sivaraj, Vijayalakshmi, 2019).

As partículas de prata tendem a criar aglomerados que não possuem um efeito agudo na capacidade de penetração de radicais de prata nas membranas das bactérias, afetando diretamente seu DNA. Este é um dos mecanismos propostos da ação bactericida da prata, que ainda não é totalmente conhecido (Ferreira et al., 2019; Kim et al., 2007). De fato, observa-se na Figura 9 alguns aglomerados que proporcionam baixa ativação de radicais de prata livre.

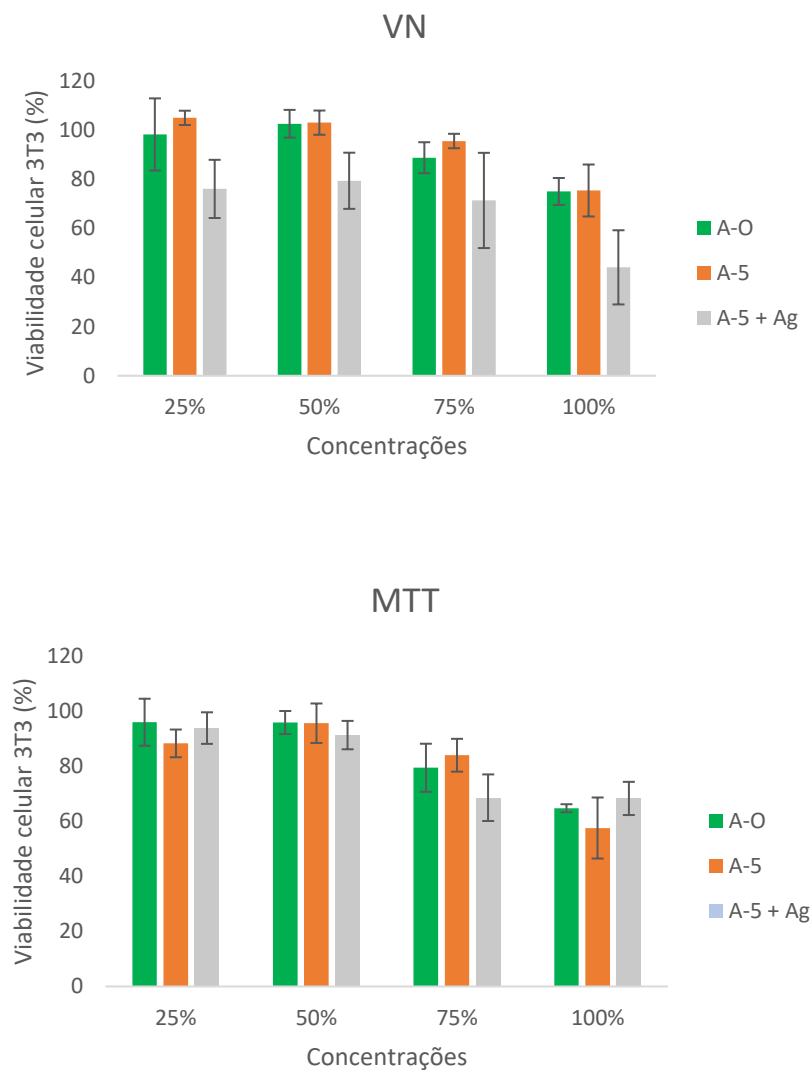
Para aplicações em biomateriais, deseja-se uma quantidade ideal de partículas de prata com ação bactericida, mas que ao mesmo tempo não comprometa a viabilidade celular dos osteoblastos e todos os processos envolvidos na recuperação do tecido ósseo afetado (X. Huang et al., 2019; Pfeiffer et al., 2003; Sheikh et al., 2015).

Avaliação de citotoxicidade

A Figura 10 apresenta a avaliação de citotoxicidade através dos ensaios *in vitro* de captação do Vermelho Neutro (VN) pelos lisossomos e a avaliação da atividade mitocondrial pelo ensaio de redução do corante MTT.

O significado dos efeitos citotóxicos para situações *in vivo* está relacionado principalmente a quatro áreas: 1) irritação e inflamação; 2) proliferação celular e hiperplasia; 3) estresse oxidativo; e 4) diminuição da função de um órgão. Todas essas injúrias citotóxicas podem levar a uma condição patológica se mantidas cronicamente (Andreoli et al., 2003).

Figura 10 - Citotoxicidade avaliada para as amostras aço original (A-O), aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag).



Fonte: Autores.

Tanto o ensaio de redução do MTT quanto o da recaptção do VN avaliam o funcionamento de organelas celulares que é interpretado, na maioria dos estudos, como viabilidade celular. Na Figura 10 observa-se que no ensaio VN ocorre nítida ação danosa da amostra com prata sobre a viabilidade celular à medida que a concentração do meio aumenta. A amostra de aço original (A-O) e anodizado (A-5) apresentam resultados próximos com a mesma tendência. Nas três amostras ocorre degradação da

função celular com aumento da concentração do meio de estudo, possivelmente ocorre relação proporcional com a quantidade de íons metálicos presentes no meio. Todavia, na amostra com prata (A-5 + Ag) este dano é mais acentuado e já presente em baixa concentração, enquanto as outras apresentam degradação celular a partir de 75% de concentração do meio. O lisossomo é a organela terminal da via endocítica, por isso o ensaio de recaptação do VN reflete o estado final da célula após exposição a um agente estressante (Figueiró, 2016; Svendsen et al. 2004).

No ensaio de avaliação da atividade mitocondrial (MTT) observa-se na Figura 10 que a amostra contendo prata acompanha a mesma tendência de diminuição da viabilidade celular com aumento da concentração. Não há variação significativa entre as três amostras. Deve-se observar que o cristal formado pelo reagente utilizado para este ensaio possui algumas características relevantes. Em células mortas, a mitocôndria pode manter intacta a atividade da enzima succinato desidrogenase, responsável pela formação do cristal, que pode ser erroneamente interpretada como sobrevivência. Citoplasma, compartimento endolisossomal e a membrana plasmática podem estar associados à redução do MTT. Estudos indicam que alguns compostos podem aumentar ou diminuir a atividade da succinato desidrogenase sem afetar a sobrevivência ou proliferação celular ou ainda interagir por si com o sal do MTT. Esse último pode ser particularmente importante se o complexo a ser estudado possuir substâncias com potencial redutivo intrínseco. Além disso pode ocorrer aumento no número de organelas sem que ocorra proliferação celular. Por causa dos resultados multifacetados, não é recomendado usar apenas o ensaio do MTT para monitorar a viabilidade celular, e é importante interpretar seu resultado como uma informação sobre o status mitocondrial (Andreoli et al. 2003; Figueiró, 2016; Figueiró et al. 2016).

Na Figura 10 os resultados ilustrados para atividade mitocondrial possivelmente houve a ocorrência de um fenômeno muito comum quando se trata de citotoxicidade de metais. Como o ensaio MTT é relativamente rápido, pode estar apresentando um cenário inicial de dano da atividade mitocondrial, onde a ação dos metais de caráter redutor estão causando um efeito de geração de radicais de oxigênio, que momentaneamente favorecem a atividade metabólica da mitocôndria, porém com o passar do tempo e da degradação de outras organelas, a mitocôndria também segue para o estado de depleção vital (Jafari, Simchi, Khakpash 2010; Krawczyńska et al. 2015; Song et al. 2010).

Observando os resultados das duas análises em conjunto, verifica-se que a adição da prata foi responsável pela diminuição da viabilidade celular, pois fica evidente sua ação pela resposta da atividade lisossômica. Em estudo com camada de hidroxiapatita funcionalizada com nanotubos de carbono e diversas concentrações de prata sobre aço AISI 316L, observou-se que ocorreu uma diminuição da viabilidade celular de osteoblastos humanos à medida que se aumentou a concentração de prata na camada. Os autores destacam a ação citotóxica da prata, porém ainda em níveis aceitáveis, indicando 75% de viabilidade celular em ensaio de MTT (Sivaraj, Vijayalakshmi 2019).

Foi reportado por Krawczyńska et al. (2015) efeito toxicológico em células do sistema neurológico em estudo com ratos que tiveram administração intravenosa de nanopartículas de prata. O estudo propõe que o acúmulo de nanopartículas de prata da origem a geração de espécies de oxigênio reativo, que são responsáveis por danos oxidativos e degradação da membrana celular.

A adição de prata em biomateriais deve seguir a premissa de não gerar danos às células e simultaneamente combater os agentes patogênicos como as bactérias, fungos e vírus. Esta relação é tênue e sensível (Y. Huang et al., 2018).

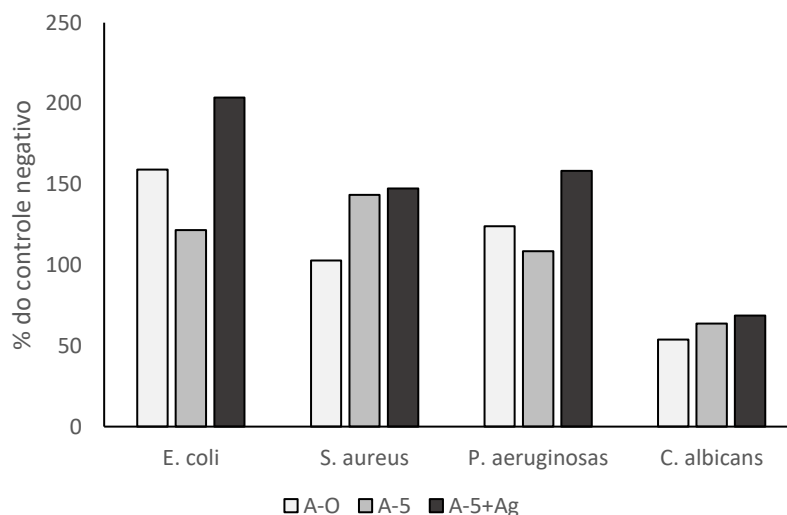
Destaca-se também que a amostra A-5 mais uma vez não teve perda de desempenho em relação ao aço original usado como biomaterial, não se destacou aumento de citotoxicidade e foram obtidos valores ligeiramente mais favoráveis nas concentrações de 75% de meio em ambos ensaios.

Avaliação de ação bactericida e antifúngica

A Figura 11 apresenta os resultados da ação bactericida das amostras de aço original (A-O), aço anodizado (A-5) e aço

anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag) diante de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e ação antifúngica sobre *C. albicans*. Estes patógenos foram selecionados por sua presença recorrente em ambientes de blocos cirúrgicos (Nakamura et al., 2019). Desta forma a convivência com os dispositivos de aço utilizados em cirurgias ortopédicas que são o ponto focal deste estudo.

Figura 11 - Avaliação do crescimento de biofilme para as amostras aço original (A-O), aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag) em percentual do controle negativo.



Fonte: Autores.

Os resultados da Figura 11 são apresentados em função de percentual do controle. Não se observa alteração na amostra com prata em relação às amostras de aço original e aço anodizado como era esperado. Para as espécies bacterianas não se encontra um resultado de ação bactericida em nenhuma das amostras, indicando que para estas espécies o substrato se apresentou muito favorável para crescimento bacteriano.

Apenas para a *C. albicans* foi observada uma inibição de crescimento de biofilme em relação ao controle negativo. Todavia a anodização e incorporação de prata sugere ter favorecido o crescimento de biofilme para esta espécie, pois fica evidente que a própria superfície de aço original já proporciona uma dificuldade para o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*. Pesquisas revelam que tanto AgNPs quanto íons de prata tem capacidade de causar perda intracelular de potássio na espécie *C. albicans*, levando a uma dissipação do potencial da membrana citoplasmática e sua desestabilização (Artunduaga Bonilla et al. 2015; Vazquez-Muñoz et al., 2014).

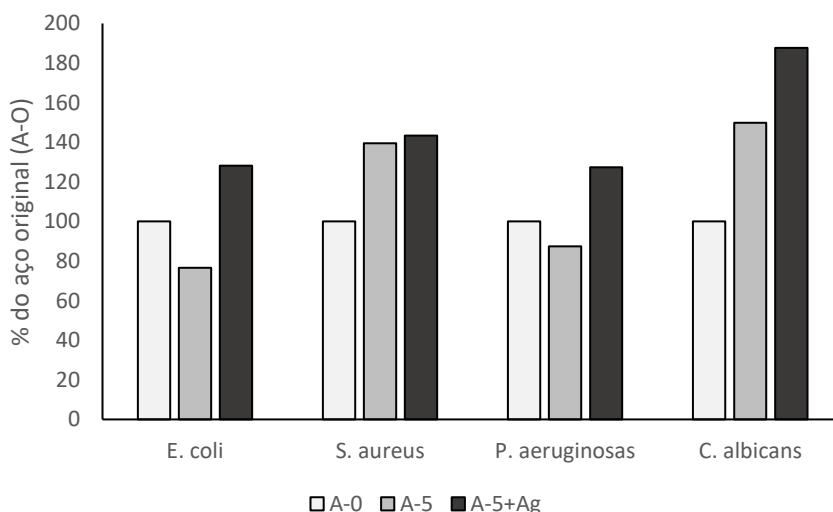
Alguns fatores podem ter contribuído para estes resultados: topografia favorável das superfícies, presença de nitrogênio e oxigênio na superfície, proporcionando nutrientes ao biofilme e concentração subinibitória de prata.

Estudos vem demonstrando que doses sub letais de AgNPs ou AgNO₃ estão inferindo em uma maior viabilidade celular de certas bactérias como *E. coli*. Os autores sugerem que o efeito hormético pode ter sido desencadeado pela presença em baixa dose destes conhecidos antimicrobianos. Desta forma, a presença de baixas doses de agentes tóxicos para as células bacterianas podem ativar mecanismos de reparo celular contra os efeitos nocivos. Observou-se como resposta destes estudos a maior formação de biofilme pelas bactérias, indicando um mecanismo de resistência. Os biofilmes podem proteger as bactérias de algumas condições ambientais adversas, como antibióticos e o sistema imune humano. O biofilme também aumenta a resistência à ação de sanitizantes físico-químicos (Hoffman et al., 2005; Xiu et al., 2012).

Em estudo de Jang et. al. (2018) verificou-se o efeito de nanotextura sobre o aço AISI 316L na adesão microbiana. Os autores constataram uma diminuição da adesão na superfície com nanoporos já reportada em estudos anteriores que estimaram

a interação das forças superfície-bactéria usando o cálculo estendido DVLO que demonstrou que a redução de adesão bacteriana da superfície nanoporosa se origina da repulsão sinérgica devido a eletrostática, forças repulsivas de caráter ácido-base e energia livre efetiva da superfície. Com base nos cálculos, os autores reportam que o diâmetro de poro eficaz para inibir a adesão bacteriana é de 15 a 25 nm. A rugosidade média (Ra) também é um parâmetro importante que afeta o comportamento da adesão bacteriana. Superfícies com rugosidade média entre 1,68 e 5,18 nm apresentam resultados favoráveis de diminuição da adesão bacteriana. Destaca-se também que nanoprotusões da superfície exibem um caráter bactericida atribuído a tensão mecânica exercida sobre a membrana da bactéria aderida, resultando em alongamento, ruptura e morte da membrana (Anderson et al., 2016; Jang et al., 2018). Foi observado nos resultados uma melhora discreta da resposta bactericida nas amostras anodizadas (A-5) em relação ao aço original (A-O) nas espécies *E. coli* e *P. aeruginosa* conforme ilustra a Figura 12 onde são apresentados os resultados de crescimento de biofilme em relação ao resultado do aço original (A-O). Esta ação pode ser relacionada a nanotopografia obtida no processo de anodização conforme discutido na Figura 4. A Tabela 4 que apresenta os valores de rugosidade média aponta para valores próximos de 5,0 nm de acordo com os resultados encontrados por Jang et. al. Todavia a ação inibitória ainda foi muito insatisfatória.

Figura 12 - Avaliação do crescimento de biofilme para as amostras aço anodizado (A-5) e aço anodizado com incorporação de prata (A-5 + Ag) em percentual relativo ao aço original (A-O).



Fonte: Autores.

Outro ponto que se relaciona a baixa concentração de prata está na insuficiência de geração de oxigênio reativo que seria um dos mecanismos propostos para degradação do núcleo da célula bacteriana (Kim et al., 2007). A Figura 12 indica grande presença de prata na superfície de forma homogênea porém esta pode estar ligada aos hidróxidos da superfície anodizada e não sob forma de partícula elementar de Ag^0 ou íons livres Ag^+ que são muito mais reativos e responsáveis pela geração de danos celulares (Krawczyńska et al. 2015; Sivaraj, Vijayalakshmi 2019). Da mesma forma, a ligação de prata na superfície com energia livre devido à presença de radicais hidroxila também pode ser a responsável pela presença considerável de nitrogênio na superfície, observado pelo EDS da amostra A-5+Ag. Uma vez que uma grande quantidade de cátions é atraída para a superfície, ânions nitrato provenientes do nitrato de prata utilizado na incorporação de prata se ligaram aos radicais livres. Uma superfície porosa e com presença de nitrogênio e oxigênio cria um ambiente favorável para o crescimento de biofilme (Kora, Arunachalam 2011; Mahapatro, 2015)

A superfície ativa apresenta fatores positivos como a melhora da biofuncionalidade, evidenciada nos ensaios de

molhabilidade, formação de hidroxiapatita e de citotoxicidade. Porém também favorece o crescimento de espécies indesejadas em um procedimento cirúrgico, por exemplo. O desafio do desenvolvimento de materiais se tange na performance idealizada entre excelente biofuncionalidade e uma ação eficaz contra patógenos indesejados.

4. Conclusão

Com base nos resultados discutidos, que é possível obter uma camada nanorugosa em aço AISI 316L pelo processo de anodização em eletrólito de 10M NaOH. Esta camada adquire características distintas com a variação do tempo de anodização, quanto a morfologia, rugosidade e hidrofobicidade.

Os resultados de formação de hidroxiapatita na amostra A-5 mostraram que a superfície anodizada obtida possui grande afinidade com elementos cálcio e fósforo, proporcionando uma nucleação volumosa de hidroxiapatita com formação homogênea e densa.

A metodologia utilizada para incorporação de prata na superfície não apresentou os resultados esperados, necessitando de mais estudos para aperfeiçoar esta técnica e obter uma ação eficaz no que diz respeito às propriedades biocidas da superfície anodizada. Nos ensaios de ação bactericida ocorreu apenas uma leve ação na amostra A-5 em relação ao aço original em algumas espécies. As amostras com prata apresentaram aumento do crescimento de biofilme indicando que a superfície apresentava condições favoráveis como presença de nitrogênio e oxigênio e uma topografia salutar para o desenvolvimento das espécies.

O desempenho mais satisfatório atingido nas caracterizações foi apresentado pela amostra A-5 em relação as propriedades de molhabilidade, rugosidade, apresentando bons resultados para formação de hidroxiapatita, que é uma biofuncionalidade importante. Desta forma, esta camada obtida se mostra como uma alternativa promissora para futuras aplicações em áreas biomédicas, principalmente em implantes ortopédicos quando comparada ao aço original AISI 316L utilizado atualmente para estas funcionalidades.

Como trabalhos futuros pretende-se avaliar a possibilidade de inserir a prata na superfície durante o processo de anodização, analisar outros métodos de incorporação com nanopartículas de prata na superfície que apresentem uma resposta mais satisfatória quanto a ação bactericida e avaliar a funcionalidade da superfície para outras aplicações como metais hospitalares e dispositivos de instrumentação cirúrgica que carecem de propriedades bactericidas e antifúngicas.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio da CNPq, entidade do governo brasileiro focada na formação de recursos humanos. Os autores também agradecem ao apoio financeiro de agências brasileiras: CAPES, FAPERGS e FINEP.

Referências

- Anderson, J. A., Lamichhane, S., & Mani, G. (2016). Macrophage responses to 316L stainless steel and cobalt chromium alloys with different surface topographies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, *104*(11), 2658–2672.
- Andreoli, C., Gigante, D., & Nunziata, A. (2003). A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicology in Vitro*, *17*(5–6), 587–594.
- Ansell, R. O., Dickinson, T., & Povey, A. F. (1978). of the Films on Coloured Stainless Steel, *18*(December 1976).
- Artunduaga Bonilla, J. J., Paredes Guerrero, D. J., Sánchez Suárez, C. I., Ortiz López, C. C., & Torres Sáez, R. G. (2015). In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against fluconazole-resistant *Candida* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *31*(11), 1801–1809.
- Bian, T., Zhao, K., Meng, Q., Tang, Y., Jiao, H., & Luo, J. (2019). The construction and performance of multi-level hierarchical hydroxyapatite (HA)/collagen composite implant based on biomimetic bone Haversian motif. *Materials and Design*, *162*, 60–69. The Authors. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.11.040>
- Brooks, E. K., Brooks, R. P., & Ehrensberger, M. T. (2017). Effects of simulated inflammation on the corrosion of 316L stainless steel. *Materials Science and Engineering C*, *71*, 200–205. Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.012>
- Burleigh, T. D., Schmuki, P., & Virtanen, S. (2009). Properties of the Nanoporous Anodic Oxide Electrochemically Grown on Steel in Hot 50% NaOH. *Journal*

of *The Electrochemical Society*, 156(1), C45.

Chen, Q., & Thouas, G. A. (2015). Metallic implant biomaterials. *Materials Science and Engineering R: Reports*, 87, 1–57. Elsevier B.V.

Coelho, P. G., & Jimbo, R. (2014). Osseointegration of metallic devices: Current trends based on implant hardware design. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561, 99–108. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.033>

Evans, C., Leiva-Garcia, R., & Akid, R. (2018). Strain evolution around corrosion pits under fatigue loading. *Theoretical and Applied Fracture Mechanics*, 95(February), 253–260. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.tafmec.2018.02.015>

Ferreira, C. C., Sousa, L. L. de, Ricci, V. P., Rigo, E. C. da S., Ramos, A. S., Campos, M. G. N., & Mariano, N. A. (2019). Titanium Biomimetically Coated With Hydroxyapatite, Silver Nitrate and Polycaprolactone, for Use In Biomaterials (Biomedicine). *Materials Research*, 22(suppl 1), 1–9.

Figueiró, L. R. (2016). *Avaliação in vitro da Toxicidade do Thirdhand Smoke*. UFCSPA.

Figueiró, Luciana Rizzieri, Dantas, D. C. M., Linden, R., & Ziulkoski, A. L. (2016). Thirdhand tobacco smoke: procedures to evaluate cytotoxicity in cell cultures. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 26(5), 355–361.

Francisco, J. S. (2013). *Avaliação do Pré Tratamento a base de sulfossiloxano sobre aço galvannealed combinado com tintas anticorrosivas*. Universidade de São Paulo. https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde-08072014-123138/publico/Diss_JulianaFrancisco.pdf.

Gama, R. O. (2014). *Controle do comportamento hidrofílico/hidrofóbico de polímeros naturais biodegradáveis através da decoração de superfícies com nano e microcomponentes*. Universidade Federal de Minas Gerais. https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-9LFMQ8/1/tese_renata_de_oliveira_gama.pdf.

Gentil, V. (2012). *Corrosão* (6th ed.). Rio de Janeiro: LTC.

Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y. (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*. <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=AN=S0109564106001850&site=eds-live>

Guerra-Fuentes, L., Garcia-Sanchez, E., Juarez-Hernandez, A., & Hernandez-Rodriguez, M. A. L. (2015). Failure analysis in 316L stainless steel supracondylar blade plate. *Engineering Failure Analysis*, 57, 243–247. Elsevier Inc.

Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–1175.

Huang, X., Wang, D., Hu, L., Song, J., & Chen, Y. (2019). Preparation of a novel antibacterial coating precursor and its antibacterial mechanism. *Applied Surface Science*, 465(September 2018), 478–485. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.09.160>

Huang, Y., Wang, W., Zhang, X., Liu, X., Xu, Z., Han, S., Su, Z., et al. (2018). A prospective material for orthopedic applications: Ti substrates coated with a composite coating of a titania-nanotubes layer and a silver-manganese-doped hydroxyapatite layer. *Ceramics International*, 44(5), 5528–5542. Elsevier Ltd and Techna Group S.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2017.12.197>

Huynh, V., Ngo, N. K., & Golden, T. D. (2019). Surface Activation and Pretreatments for Biocompatible Metals and Alloys Used in Biomedical Applications. *International Journal of Biomaterials*, 2019.

Jafari, T., Simchi, A., & Khakpash, N. (2010). Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron-gold core-shell nanoparticles coated with polyglycerol. *Journal of Colloid and Interface Science*, 345(1), 64–71. Elsevier Inc.

Jang, Y., Choi, W. T., Johnson, C. T., García, A. J., Singh, P. M., Breedveld, V., Hess, D. W., et al. (2018). Inhibition of Bacterial Adhesion on Nanotextured Stainless Steel 316L by Electrochemical Etching. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 4(1), 90–97.

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., et al. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 95–101.

Kora, A. J., & Arunachalam, J. (2011). Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* and its mechanism of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1209–1216.

Kowalski, D., Kim, D., & Schmuki, P. (2013). TiO₂ nanotubes, nanochannels and mesosponge: Self-organized formation and applications. *Nano Today*, 8(3), 235–264. Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2013.04.010>

Krawczyńska, A., Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska, J., Lankoff, A., Herman, A. P., Oczkowski, M., Królikowski, T., et al. (2015). Silver and titanium dioxide nanoparticles alter oxidative/inflammatory response and renin-angiotensin system in brain. *Food and Chemical Toxicology*, 85, 96–105.

Kunzler, T. P., Drobek, T., Schuler, M., & Spencer, N. D. (2007). Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials*, 28(13), 2175–2182.

Lin, F. H., Hsu, Y. S., Lin, S. H., & Sun, J. S. (2002). The effect of Ca/P concentration and temperature of simulated body fluid on the growth of hydroxyapatite coating on alkali-treated 316L stainless steel. *Biomaterials*, 23(19), 4029–4038.

Mahapatro, A. (2015). Bio-functional nano-coatings on metallic biomaterials. *Materials Science and Engineering C*, 55, 227–251. Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.018>

Marcus, P., & Maurice, V. (2000). Passivity of Metals and Alloys. In R. W. Caren, P. Haseb, & E. J. Kramer (Eds.), *Material Science and Technology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

Maximo, F. S., Elias, C. N., Fernandes, D. J., Monteiro, F. de O., & Cavalcanti, J. (2016). Análise da superfície e osseointegração de implantes dentários com superfícies biomiméticas contendo Ca, Mg e F. *Revista Materia*, 21(1), 196–203.

- Mirzaee, M., Vaezi, M., & Palizdar, Y. (2016). Synthesis and characterization of silver doped hydroxyapatite nanocomposite coatings and evaluation of their antibacterial and corrosion resistance properties in simulated body fluid. *Materials Science and Engineering C*, 69, 675–684. Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.057>
- Nakamura, S., Sato, M., Sato, Y., Ando, N., Takayama, T., Fujita, M., & Ishihara, M. (2019). Synthesis and application of silver nanoparticles (Ag nps) for the prevention of infection in healthcare workers. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15).
- Parcharoen, Y., Kajitvichyanukul, P., Sirivisoot, S., & Termsuksawad, P. (2014). Hydroxyapatite electrodeposition on anodized titanium nanotubes for orthopedic applications. *Applied Surface Science*, 311, 54–61. Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.04.207>
- Parra, B. S., da Silva, E. N., Puolakkainen, P., Pinheiro, M. M., & Pinheiro, M. M. (2006). Rugosidade superficial de revestimentos cerâmicos. *Cerâmica Industrial*, 11, 4.
- Peng, C., Izawa, T., Zhu, L., Kuroda, K., & Okido, M. (2019). Tailoring Surface Hydrophilicity Property for Biomedical 316L and 304 Stainless Steels: A Special Perspective on Studying Osteoconductivity and Biocompatibility. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(49), 45489–45497.
- Pfeiffer, F., Herzog, B., Kern, D., Scheideler, L., Geis-Gerstorfer, J., & Wolburg, H. (2003). Cell reactions to microstructured implant surfaces. *Microelectronic Engineering*, 67–68, 913–922.
- Pinheiro, M. M., Ciconelli, R. M., Jacques, N. de O., Genaro, P. S., Martini, L. A., & Ferraz, M. B. (2010). O impacto da osteoporose no Brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(2), 113–120.
- Saha, S. K., Park, Y. J., Kim, J. W., & Cho, S. O. (2019). Self-organized honeycomb-like nanoporous oxide layer for corrosion protection of type 304 stainless steel in an artificial seawater medium. *Journal of Molecular Liquids*, 296, 111823. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111823>
- Sheikh, Z., Brooks, P. J., Barzilay, O., Fine, N., & Glogauer, M. (2015). Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials. *Materials*, 8(9), 5671–5701.
- Silva, E. F.; Oliveira, L. F. C. (2011). Caracterização química e metalográfica dos. *Acta Ortopédica Brasileira*, 19(5), 280–285.
- Sivaraj, D., & Vijayalakshmi, K. (2019). Enhanced antibacterial and corrosion resistance properties of Ag substituted hydroxyapatite/functionalized multiwall carbon nanotube nanocomposite coating on 316L stainless steel for biomedical application. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59(April), 104730. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104730>
- Song, M. M., Song, W. J., Bi, H., Wang, J., Wu, W. L., Sun, J., & Yu, M. (2010). Cytotoxicity and cellular uptake of iron nanowires. *Biomaterials*, 31(7), 1509–1517. Elsevier Ltd.
- Strnad, G., Chirila, N., Petrovan, C., & Russu, O. (2016). Contact Angle Measurement on Medical Implant Titanium Based Biomaterials. *Procedia Technology*, 22, 946–953.
- Svendsen, C., Spurgeon, D. J., Hankard, P. K., & Weeks, J. M. (2004). A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: Is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(1), 20–29.
- Vazquez-Muñoz, R., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2014). Ultrastructural analysis of candida albicans when exposed to silver nanoparticles. *PLoS ONE*, 9(10), 1–10.
- Vogler, E. A. (1998). Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 74(1–3), 69–117.
- Wang, Y., Li, G., Wang, K., & Chen, X. (2020). Fabrication and formation mechanisms of ultra-thick porous anodic oxides film with controllable morphology on type-304 stainless steel. *Applied Surface Science*, 505(May 2019), 144497. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144497>
- Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. J. (2012). Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano Letters*, 12(8), 4271–4275.
- Young, L. (1961). *Anodic oxide films*.
- Yuan, Y., Jin, S., Qi, X., Chen, X., Zhang, W., Yang, K., & Zhong, H. (2019). Osteogenesis stimulation by copper-containing 316L stainless steel via activation of akt cell signaling pathway and Runx2 upregulation. *Journal of Materials Science and Technology*, 35(11), 2727–2733. The editorial office of Journal of Materials Science & Technology. Retrieved from <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2019.04.028>.