

Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais -
PPGE3M

Funcionalização da Liga Ti6Al4V via Polimerização por Plasma Frio Empregando Óleo Essencial de *Eucalyptus globulus* como Precursor: Atividade Antibacteriana, Adesão e Viabilidade de Células-tronco Mesenquimais

MATHEUS DA SILVA BULLMANN

Porto Alegre – RS

Abril/2023

Ministério da Educação
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Escola de Engenharia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais -
PPGE3M

Funcionalização da Liga Ti6Al4V via Polimerização por Plasma Frio Empregando Óleo Essencial de *Eucalyptus globulus* como Precursor: Atividade Antibacteriana, Adesão e Viabilidade de Células-tronco Mesenquimais

Matheus da Silva Bullmann

Químico Bacharel

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Corrosão – LAPEC, da Escola de Engenharia da UFRGS, dentro do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais - PPGE3M, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Materiais

Porto Alegre – RS

2023

Orientadora: Prof.^a Dr^a. Célia de Fraga Malfatti

Coorientadora: Prof.^a Dr^a. Leliz Ticono Arenas

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Joel da Silva Rodrigues – IFSUL

Dra. Fernanda Cortez Lopes – UFRGS

Dra. Natasha Maurmann – UFRGS

Dr. Victor Velho de Castro - UFRGS

Prof. Dr. Afonso Reguly
Coordenador do PPGE3M/UFRGS

Agradecimentos

Agradeço toda a minha família por todo o apoio, amor e carinho durante todos esses anos.

Agradeço às minhas orientadoras Prof.^a Dr.^a. Célia de Fraga Malfatti e Prof.^a Dr.^a. Leliz Ticona Arenas por toda a ajuda e incentivo durante o projeto.

A todos os meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Corrosão –LAPEC por todo suporte, aprendizado e auxílio.

À CAPES pela oportunidade e apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Resumo

A adesão e formação de biofilmes em superfícies metálicas de implantes biomédicos estão relacionadas a múltiplos casos de infecções em ambientes hospitalares e causam sérias preocupações à saúde pública. Nesse sentido, a funcionalização dessas superfícies visando ação antibacteriana têm sido estudadas. Além disso, é desejável que os revestimentos sejam obtidos a partir de precursores com baixo impacto ambiental, e nesse contexto, os precursores naturais (*eco-friendly*), têm despertado o interesse. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana, adesão e viabilidade de células-tronco mesenquimais em filmes obtidos a partir de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, sobre a liga Ti6Al4V através da polimerização por plasma a frio, bem como, o efeito da esterilização sobre as propriedades do mesmo. Pelo processo de plasma a frio foi obtido um filme fino (espessura determinada por elipsometria, na ordem 105 nm), com grupos funcionais oxigenados (O-H e C=O), que foram identificados por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e espectroscopia Raman. O filme obtido apresentou uma topografia uniforme, conforme foi observado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Com baixos valores de rugosidade, revelados pelas medidas de microscopia de força atômica (AFM) e perfilometria óptica. A partir da análise de molhabilidade observou-se um ângulo de contato na ordem de 85°, o que caracteriza essa superfície como moderadamente hidrofóbica. Considerando-se que implantes devem ser submetidos a processo de esterilização prévio, no presente estudo, foi avaliado o efeito dos processos da esterilização por radiação ultravioleta (UV-C), óxido de etileno (ETO), autoclave e plasma de ar, sobre a composição química e a morfologia do filme. Dentre esses processos a esterilização por radiação ultravioleta (UV-C) foi aquela que causou menos danos ao filme. A formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* foi significativamente reduzida na superfície funcionalizada, que também não apresentou toxicidade para as células-tronco mesenquimais. Esses efeitos podem ser atribuídos à retenção de grupos funcionais oxigenados no filme polimérico obtido, aliados ao seu baixo valor de rugosidade superficial e comportamento moderadamente hidrofóbico. O comportamento antimicrobiano e não citotóxico da liga Ti6Al4V funcionalizada por plasma a frio, empregando como precursor o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, sugere um potencial para a aplicação desses filmes em biomateriais.

Palavras-chave: Polimerização por plasma a frio, comportamento antibacteriano, modificação de superfície, óleo essencial de eucalipto, biomateriais, células-tronco mesenquimais.

Abstract

The adhesion and formation of biofilms on metal surfaces of biomedical implants are related to multiple cases of infections in hospital environments and cause serious concerns to public health. In this sense, the functionalization of these surfaces aiming at antibacterial action has been studied. Furthermore, it is desirable that coatings be obtained from precursors with low environmental impact, and in this context, natural precursors (eco-friendly) have aroused interest. This work aims to evaluate the antibacterial activity and cytotoxicity of films obtained from essential oil of *Eucalyptus globulus*, on the Ti6Al4V alloy through cold plasma polymerization, as well as the effect of sterilization on its properties. By the cold plasma process, a thin film was obtained (thickness determined by ellipsometry, in the order of 105 nm), with oxygenated functional groups (O-H and C=O), which were identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy. The film obtained showed a uniform topography, as observed by scanning electron microscopy (SEM). With low roughness values, revealed by atomic force microscopy (AFM) and optical profilometry measurements. Considering that implants must be submitted to a previous sterilization process, in the present study, the effect of the sterilization processes by ultraviolet radiation (UV-C), ethylene oxide (ETO), autoclave and air plasma, on the chemical composition and morphology of the film. Among these processes, sterilization by ultraviolet radiation (UV-C) was the one that caused less damage to the film. From the wettability analysis, a contact angle of around 85° was observed, which characterizes this surface as moderately hydrophobic. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* was significantly reduced on the functionalized surface, which also showed no toxicity to mesenchymal stem cells. These effects can be attributed to the retention of oxygenated functional groups in the obtained polymeric film, combined with its low surface roughness value and moderately hydrophobic behavior. The antimicrobial and non-cytotoxic behavior of the Ti6Al4V alloy functionalized by cold plasma, using *Eucalyptus globulus* essential oil as a precursor, suggests a potential for the application of these films in biomaterials.

Keywords: *Cold plasma polymerization, antibacterial behavior, surface modification, eucalyptus essential oil, biomaterials, mesenchymal stem cell.*

Índice de Figuras

Figura 1: Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais ao longo de seu desenvolvimento (HOLZAPFEL <i>et al.</i> , 2013; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).....	7
Figura 2: Diferenças entre as estruturas do precursor, polímero convencional e polímero formado por polimerização a plasma. Adaptado de THIRY <i>et al.</i> (2016).	11
Figura 3: Distribuição energética de Maxwell–Boltzmann dos elétrons presentes em descargas de baixa pressão. Adaptada de THIRY <i>et al.</i> (2016).	12
Figura 4: Descrição esquemática do mecanismo de polimerização a plasma em etapas. Adaptada de YASUDA (2004).....	13
Figura 5: Reatores de polimerização por plasma frio mais comuns utilizados na literatura. (a) Eletrodos internos paralelos; (b) Eletrodos externos paralelos. (GERCHMAN, 2019).....	14
Figura 6: Mecanismo geral de polimerização por plasma frio. Adaptada de THIRY <i>et al.</i> (2016).....	15
Figura 7: Estrutura química do 1,8-cineol (eucaliptol), componente majoritário do óleo essencial de <i>E. globulus</i> (DAMJANOVIĆ-VRATNICA <i>et al.</i> , 2011; DOUGNON; ITO, 2020).....	17
Figura 8: Esquema dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano. No estágio (i), as bactérias planctônicas aderem a uma superfície sólida. No estágio (ii), a adesão torna-se irreversível. O estágio (iii) se inicia a fundação da micro colônia. O estágio (iv) mostra a maturação e o crescimento do biofilme em comunidades bacterianas tridimensionais. No estágio (v), ocorre a dispersão e as células	

planctônicas livres são liberadas do aglomerado de para colonizar novos locais. Adaptado de SAUER <i>et al.</i> (2022).	19
Figura 9: Molécula de óxido de etileno (ETO) (LEROUGE, 2019).	29
Figura 10: Curva de eficiência germicida da radiação ultravioleta em diferentes comprimentos de onda (nm). Adaptado de (LED, 2021).	30
Figura 11: Fluxograma das etapas de obtenção do filme por plasma frio, caracterizações e análises biológicas.	31
Figura 12: Reator utilizado na Polimerização por Plasma Frio do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i>	33
Figura 13: Variação de espessura do filme obtido por polimerização a plasma com variação do tempo de deposição.	39
Figura 14: Mudança de coloração na superfície das amostras em relação à espessura do filme.	40
Figura 15: Imagem obtida por MEV-FEG do filme polimerizado por plasma durante 15 segundos.	41
Figura 16: Perfis tridimensionais obtidos por AFM e por Perfilometria Óptica 3D do (a) e (c) substrato Ti6Al4V polido, e (b) e (d) filme derivado do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i>	42
Figura 17: Molhabilidade obtida através da medição do ângulo de contato da gota de água. (a): Substrato Ti6Al4V; (b): Amostra funcionalizada com filme polimérico (15 s).	46
Figura 18: Sobreposição dos espectros de FTIR do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i> (verde) e filme polimérico (azul) formado via polimerização à plasma.	49
Figura 19: Espectro RAMAN do filme formado via polimerização a plasma do óleo essencial de eucalipto.	51

Figura 20: Espectro de massas do 1,8-cineol (eucaliptol) obtido por CG/MS do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i>	53
Figura 21: Aspecto visual topográfico do filme polimérico obtidos por Microscopia Óptica e AFM após esterilização por: (a) autoclave, (b) plasma de ar, (c) óxido de etileno (ETO) e (d) radiação ultravioleta (UV-C).....	56
Figura 22: Espectros de FTIR do filme polimérico após esterilização por (a) óxido de etileno (ETO), (b) plasma de ar e (c) radiação ultravioleta (UV-C).	57
Figura 23: Unidades Formadoras de Colônias/mL em superfícies do substrato Ti6Al4V polido e com a deposição do filme polimérico, para <i>S. aureus</i> . (a) Esterilização por ETO; (b) Esterilização por UV-C. ** indica resultados com $p < 0,01$ em relação aos demais grupos experimentais por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.....	59
Figura 24: Unidades Formadoras de Colônias/mL em superfícies do substrato Ti6Al4V polido e com a deposição do filme polimérico, para <i>E. coli</i> . ** indica resultados com $p < 0,01$ em relação aos demais grupos experimentais por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.	62
Figura 25: Ensaio de adesão de células-tronco fixadas e coradas com DAPI 3 horas após a semeadura. (a) Dados expressos em média e DP da quantificação de núcleos corados por campo do microscópio. (b) Imagens de microscopia de fluorescência. Fotos representativas dos núcleos das células coradas com DAPI em azul. Aumento de 200x.	65
Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura das células-tronco mesenquimais aderidas no polímero formado por plasma. Magnificação: (a) 500x, (b) 1000x e (c) 2000x.	66

Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura das células-tronco mesenquimais aderidas no substrato de Ti6Al4V polido. Magnificação: (a) 500x, (b) 1000x e (c) 2000x. 66

Figura 28: Avaliações após 1 e 4 dias de células-tronco tratadas com o extrato dos materiais. (a) Ensaios de viabilidade (MTT) indireto. (b) Imagens representativas de microscopia ótica das CTM cultivadas com o extrato dos materiais, com aumento de 50, 100 e 200x. Controle corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura e “Triton” representa o controle de morte (células cultivadas nas placas e tratadas com 1% de Triton X-100). Dados expressos em média e DP. ** indica resultados com $p < 0,01$ em relação aos demais grupos experimentais por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. 68

Figura 29: Ensaios de citotoxicidade (MTT) de contato direto após 1 dia. Controle corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura e “Triton” representa o controle de morte (células cultivadas nas placas e tratadas com 1% de Triton X-100). Dados expressos em média e DP. ** indica resultados com $p < 0,01$ em relação aos demais grupos experimentais por ANOVA seguida pelo teste de Tukey. ... 69

Índice de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros de rugosidade obtidos por Microscopia de Força Atômica (AFM) e Perfilometria Óptica 3D..... 43

Tabela 2: Atribuições dos picos para espectros de FTIR óleo essencial de eucalipto e polímero formado por plasma. Modos vibracionais: ν_a = alongamento assimétrico, ν_s = alongamento simétrico, ν = alongamento, δ_a = deformação assimétrica, δ_s = deformação simétrica..... 50

Lista de Abreviaturas

3D	Três Dimensões
AFM	Microscopia de Força Atômica
ANOVA	Análise de Variância
ATR	Reflexão Total Atenuada
CG/MS	Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas
CTM	Células-tronco Mesenquimais
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Meio Eagle Modificado da Dulbecco
DNA	Ácido-desoxirribonucleico
ETO	Óxido de Etileno
FEG	Feixe Eletrônico por Emissão de Campo
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
ISO	Organização Internacional de Normalização
LAPEC	Laboratório de Pesquisa em Corrosão
LB	Luria Bertani
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-di-fenil brometo de tetrazolina)
PBS	Tampão Fosfato-salino
Ti6Al4V	Liga Titânio, Alumínio e Vanádio
TI-cp	Titânio Comercialmente Puro
UV	Radiação Ultravioleta
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Lista de Símbolos

#	Grana
%	Porcentagem
λ	Comprimento de onda
α	Alfa
β	Beta
\pm	Mais ou menos
\approx	Aproximado
$>$	Maior que
$<$	Menor que
$^{\circ}$	Grau
$^{\circ}\text{C}$	Grau celsius
μatm	Microatmosferas
μg	Microgramas
μL	Microlitro
μm	Micrometro
Al	Alumínio
Ar	Argônio
C	Carbono
cm	Centímetro
Cr	Cromo
Co	Cobalto
δ_a	Deformação Assimétrica
δ_s	Deformação Simétrica
eV	Elétron-volt
H	Hidrogênio
ν	Frequência da radiação incidente
ν_a	Alongamento Assimétrico
ν_s	Alongamento Simétrico
I	Corrente
K	Temperatura Kelvin
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
mm	Milimetro
mA	Miliampere
m/z	Razão massa-carga
nm	Nanometro
P_{value}	Valor-P
R_a	Rugosidade Média
R_{kur}	Rugosidade Curtose
R_{sk}	Rugosidade Assimétrica

R _q	Rugosidade do Desvio Médio Quadrático
R _z	Rugosidade de Profundidade Média
U	Unidades
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
s	Segundos
S	Enxofre
T	Temperatura
Ti	Titânio
V	Vanádio
W	Watts
x	Vezes

Sumário

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
2.1. Objetivo Geral:.....	5
2.2. Objetivos Específicos:	5
3. Revisão da Literatura.....	6
3.1. Biomateriais metálicos: Titânio e suas ligas	6
3.2. Polimerização por Plasma Frio	9
3.3. Óleo Essencial de Eucalipto	15
3.4. Contaminação de Superfícies por Biofilme Bacteriano.....	18
3.4.1. Staphylococcus aureus.....	21
3.4.2. Escherichia coli.....	22
3.5. Polimerização por Plasma de Metabólitos Secundários de Plantas	23
3.6. Adesão de Células-tronco e Citotoxicidade em Superfícies Polimerizadas.....	26
3.7. Esterilização e Desinfecção de Biomateriais	28
4. Metodologia	31
4.1. Fluxograma.....	31
4.2. Preparação do Substrato Metálico.....	32
4.3. Polimerização por Plasma Frio	32
4.4. Caracterizações.....	33
4.5. Efeito da Esterilização	35
4.6. Ensaio de Adesão Bacteriana.....	36
4.7. Ensaio de Adesão e Viabilidade de Células-tronco Mesenquimais	36
5. Resultados e Discussões.....	39
5.1. Polimerização e Caracterizações de Superfície	39
5.2. Caracterizações Químicas.....	47
5.3. Influências da Esterilização no Polímero por Plasma	54
5.4. Análise da Atividade Antibacteriana do Revestimento.....	59
5.5. Adesão e Viabilidade de Células-tronco	64
6. Conclusões	71
Trabalhos Futuros.....	73
Referências.....	74

1. Introdução

Implantes médicos são materiais de grande importância para os sistemas de saúde atuais, contudo, seu uso está associado a diversos casos de infecções hospitalares, que causam complicações à saúde de pacientes, restringem a qualidade de vida e aumentam significativamente as taxas de mortalidade e os custos hospitalares para tratamento das infecções (BATONI; MAISETTA; ESIN, 2016; VEERACHAMY *et al.*, 2014).

Infecções em ambientes hospitalares são normalmente associadas à formação de biofilme de bactérias (CARVALHO *et al.*, 2017). Dentre eles, biofilmes da espécie *Staphylococcus aureus* demonstram o maior índice de incidência nesses casos de infecções (MCNEIL *et al.*, 2021; ROSTEIUS *et al.*, 2018; YU *et al.*, 2021).

Esses biofilmes consistem em uma matriz de polissacarídeos, DNA e proteínas (KUMAR; ROY; DEY, 2021; PEREZ; GRAZIANO, 2006). Depois de aderidos em superfícies sólidas, esses biofilmes são capazes de compartilhar nutrientes e são protegidos de fatores danosos do ambiente, como a dissecação, antibióticos e ao sistema imune humano (TORTORA *et al.*, 2016).

Assim, é de fundamental importância desenvolver superfícies que inibam a adesão desses microrganismos, e que impeçam a formação de biofilmes. Uma promissora classe de compostos com atividade antimicrobiana comprovada através de ensaios clínicos, que poderiam ser aplicados nas superfícies de biomateriais (UNALAN; BOCCACCINI, 2021), são os óleos essenciais (BURT, 2004; CARSON; MEE; RILEY, 2002; SONBOLI; BABAKHANI; MEHRABIAN, 2006; TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004).

Os óleos essenciais se destacam por serem de origem natural, por possuírem natureza renovável, baixo custo, e por estarem disponíveis de forma abundante, além de apresentarem baixa toxicidade (SWAMY; AKHTAR; SINNI AH, 2016). Dentre eles, o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* tem sido estudado e resultados indicam atividade antibacteriana expressiva, principalmente contra espécies Gram-positivas, em sua forma líquida e vaporizada (CIMANGA *et al.*, 2002; DAMJANOVIĆ-VRATNICA *et al.*, 2011; ELAISSI *et al.*, 2011; HENDRY *et al.*, 2009; TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004). Além disso, dentre as espécies florestais cultivadas no Brasil, o uso do eucalipto se destaca principalmente nos setores de celulose e papel, produtos sólidos de madeira e na produção de energia de maneira indireta através do carvão vegetal (JÚNIOR; COLODETTE, 2013), sendo de interesse nacional o desenvolvimento de novas aplicações para compostos provenientes dessa matéria prima.

Nos óleos essenciais extraídos de espécies de eucalipto, o 1,8-cineol (eucaliptol) é o componente isolado majoritário (APEL *et al.*, 2017; DAMJANOVIĆ-VRATNICA *et al.*, 2011). Essa substância demonstrou sucesso como revestimento polimerizado por plasma em substratos de vidro e poliméricos (ABRIGO; KINGSHOTT; MCARTHUR, 2015; EASTON; JACOB, 2009b; MANN; FISHER, 2017; PEGALAJAR-JURADO *et al.*, 2014). Esses estudos demonstraram a possibilidade de depositar revestimentos à base desse terpeno isolado (1,8-cineol) em condições de plasma com parâmetros únicos, inclusive obtendo sucesso no controle de crescimento de biofilmes. Porém, sua aplicação em funcionalizações de superfícies por métodos convencionais é um desafio. Pesquisadores empregaram técnicas para produzir revestimentos sólidos a partir de óleos essenciais e seus constituintes (ALVAREZ *et al.*, 2020; BAKRY *et al.*, 2016; EASTON; JACOB, 2009b; KUORWEL *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2007; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2011; ZIVANOVIC; CHI; DRAUGHON, 2005), dentre elas se destaca

a polimerização por plasma em baixas temperaturas, que possibilita a produção de filmes finos a partir de precursores orgânicos.

No processo de polimerização a plasma em baixas temperaturas, as partículas que constituem o plasma estão em constante movimento e colidem entre si, transferindo energia cinética umas às outras (THIRY *et al.*, 2016). Devido a presença de elétrons e íons reativos que induzem diversas reações químicas sem alterar a estrutura do material através da temperatura excessiva, os plasmas de não equilíbrio são particularmente atraentes para o processamento de materiais (MICHELMORE *et al.*, 2013a). Operando em baixa temperatura, e podendo revestir uma ampla gama de substratos, aliado a ausência da necessidade do uso de solventes, a funcionalização de superfícies metálicas, baseada na aplicação do plasma em precursores orgânicos, é cada vez mais explorada no meio acadêmico no combate a formação de biofilmes (ABRIGO; KINGSHOTT; MCARTHUR, 2015; EASTON; JACOB, 2009a; MANN; FISHER, 2017).

Portanto, é importante avaliar a atividade antibacteriana, viabilidade e adesão celular em filmes finos produzidos via polimerização a plasma, a partir de precursores derivados do óleo essencial de eucalipto. Considerando que titânio e suas ligas como a liga Ti6Al4V são amplamente utilizados devido às suas propriedades atrativas como resistência à corrosão e biocompatibilidade (CHEN; WANG; YUAN, 2013), é importante avaliar esses efeitos aplicados diretamente sobre essa liga de Ti6Al4V. Além disso, pouco se conhece sobre a obtenção de filmes por plasma utilizando o óleo essencial de eucalipto *in natura* como precursor, e sobre os efeitos causados por diferentes parâmetros de deposição em substratos metálicos de Ti6Al4V.

Dessa forma, neste estudo foi desenvolvido o processo de funcionalização de superfície da liga Ti6Al4V com filmes finos, através da técnica de polimerização por

plasma a frio, utilizando o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, de origem brasileira, como precursor orgânico em um reator de fabricação própria.

Visando correlacionar os parâmetros operacionais com as propriedades obtidas no revestimento formado e avaliar a utilização do revestimento em aplicações tecnológicas, os filmes foram caracterizados morfológicamente por microscopia de força atômica (AFM), elipsometria, perfilometria óptica 3D, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ângulo de contato. A caracterização química foi analisada por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia RAMAN e cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas (CG/MS).

Considerando que na aplicação de biomateriais, a esterilização pode ser considerada a última etapa na modificação da superfície dos implantes (BALDIN *et al.*, 2018), o método de esterilização deve ser criteriosamente selecionado, pois pode causar alterações no material (SAVARIS; SANTOS; BRANDALISE, 2016; WILSON; NAYAK, 2013). Nesse contexto, no presente trabalho também foi avaliado o efeito da esterilização por UV-C, autoclave, plasma de ar e por óxido de etileno sobre a integridade morfológica e química do filme. Analisaram-se também as propriedades antibacterianas contra as espécies *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além da adesão e viabilidade celular de células-tronco mesenquimais.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral:

Funcionalizar a superfície da liga Ti6Al4V através do processo de polimerização por plasma a frio, empregando óleo essencial de *Eucalyptus globulus* como precursor, visando ação antibacteriana.

2.2. Objetivos Específicos:

- Obter filmes de cobertura homogênea e regular sobre a liga Ti6Al4V, via polimerização por plasma frio, empregando como precursor o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*;
- Caracterizar a morfologia e composição química do filme formado;
- Avaliar a atividade antibacteriana do filme contra as espécies *S. aureus* e *E.coli*;
- Avaliar o comportamento celular sobre a liga Ti6Al4V funcionalizada via polimerização por plasma através de ensaios de adesão e viabilidade empregando células-tronco mesenquimais;
- Indicar o processo de esterilização mais adequado para essa aplicação a partir da avaliação do efeito de diferentes procedimentos de esterilização sobre a morfologia e composição química no filme obtido.

3. Revisão da Literatura

3.1. Biomateriais metálicos: Titânio e suas ligas

Segundo a Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982, um biomaterial é definido como: “Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo” (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008).

A partir de características físicas e químicas, um biomaterial deve satisfazer exigências do organismo. As interações entre os tecidos vivos e o material implantado são classificados da seguinte forma (ANTONINI, 2016; PEREIRA, 2021):

- *Incompatíveis*: Substâncias tóxicas são liberadas no organismo pelo material, causando efeitos danosos e morte às células e tecidos, portanto, não devem ser utilizados;
- *Biotoleráveis*: Os materiais são apenas tolerados pelo organismo. Encontram-se isolados dos tecidos adjacentes do organismo devido à formação de uma camada envoltória de tecido fibroso, onde, quanto maior a espessura dessa camada, menor a tolerância dos tecidos ao material. Ex.: Polímeros sintéticos e alguns metais, como aço inox;
- *Bioinertes*: Materiais tolerados pelo organismo, onde a formação de tecido fibroso é mínima, não apresentando toxicidade e reações adversas as células. Ex.: titânio e suas ligas, carbono, zircônia e alumina;
- *Bioativos*: Materiais biologicamente ativos, onde ocorrem ligações químicas entre sua superfície e os tecidos vivos. Ex.: Hidroxiapatita e fosfatos de cálcio;

- **Bioabsorvíveis:** Materiais que em contato com os tecidos, ao longo do tempo, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Ex.: Fosfato Tricálcico e poli(ácido láctico).

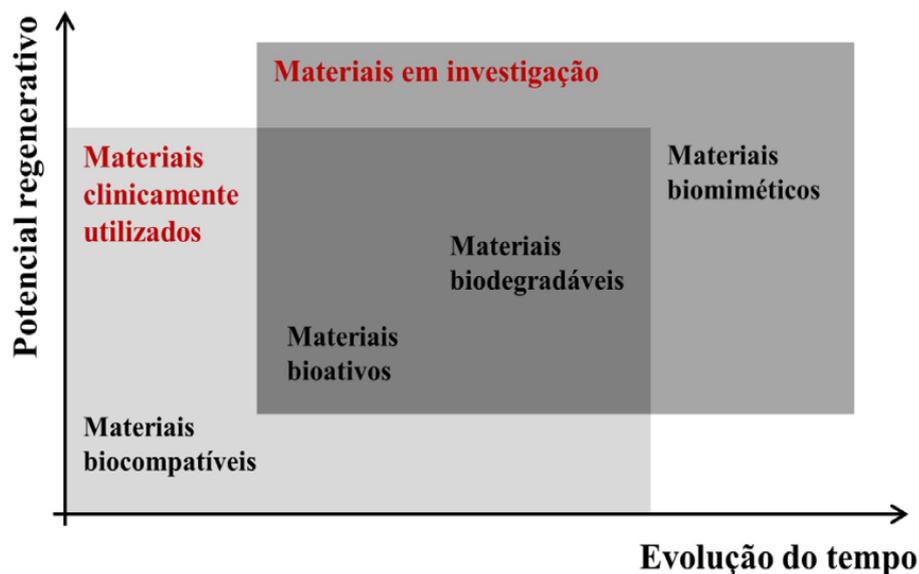


Figura 1: Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais ao longo de seu desenvolvimento (HOLZAPFEL *et al.*, 2013; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

De acordo com a aplicação desejável, diversos biomateriais podem ser utilizados para implantes em organismos vivos, dentre eles se destacam: os metais (aço inox, ligas Co-Cr e ligas de titânio), cerâmicos (alumina, biovidros e fosfatos de cálcio) e polímeros sintéticos (polietileno e silicone) (KULKARNI *et al.*, 2014; LIU; LIU; WANG, 2019).

Entre os materiais metálicos, o titânio e suas ligas possuem propriedades atrativas para a utilização como biomateriais (KULKARNI *et al.*, 2015). Devido ao seu baixo módulo de elasticidade, alta resistência à corrosão e excelente biocompatibilidade, esses materiais são amplamente utilizados em cirurgias cardiovasculares, e como substitutos ósseos em cirurgias ortodônticas e ortopédicas

(AWAD; EDWARDS; MORSI, 2017). Naturalmente o titânio sofre reações de oxidação quando exposto à água e ao oxigênio do ar (DIENER *et al.*, 2005). Essas reações induzem a formação de uma camada passiva de óxido de titânio (TiO₂) na superfície do material, esse óxido possui uma excelente resistência a corrosão. Além disso, atribui estabilidade biológica ao implante, apresentando baixa solubilidade e baixa reatividade com moléculas orgânicas (KUMAR, N. *et al.*, 2018).

Essas propriedades inerentes do titânio podem ser melhoradas a partir da adição de elementos de liga ao material (PITCHI *et al.*, 2020). Esses elementos de liga atribuem ao titânio comercialmente puro (Ti-cp) propriedades mecânicas e anticorrosivas, dentre eles, o alumínio e o vanádio atuam na rede cristalina do titânio como α -estabilizadores e β -estabilizadores, respectivamente (ZIMMER, 2011).

Atualmente a liga Ti6Al4V é a mais utilizada em implantes cirúrgicos, possuindo uma excelente passivação oxidada, altos valores de limite de resistência à tração e limite de escoamento associado a um baixo módulo de elasticidade (GOMES, 2010). Mesmo possuindo características atrativas para a aplicação em biomateriais, a liberação de elementos de liga como alumínio e vanádio em organismos vivos têm sido relacionadas a respostas inflamatórias indesejáveis no corpo humano (SAJNÓG *et al.*, 2018; SARMIENTO-GONZÁLEZ *et al.*, 2009).

Além disso, segundo RODRÍGUEZ-CANO *et al.*, 2013, a superfície do implante constitui um ambiente adequado para adesão e proliferação bacteriana, levando a formação de biofilmes que podem causar danos irreparáveis ao biomaterial. Assim, modificações superficiais de implantes de titânio têm sido essenciais para melhorar seu desempenho quanto a propriedades mecânicas, anticorrosivas, biocompatibilidade e inibição a formação de biofilmes (BAZAKA *et al.*, 2020; JEMAT *et al.*, 2015; MEREDITH *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2021).

3.2. Polimerização por Plasma Frio

O plasma por definição é um gás em elevado estado de energia, constituído por elétrons livres, íons, espécies neutras e fótons, sendo descrito pela primeira vez por Irving Langmuir em 1920, enquanto trabalhava no desenvolvimento de tubos de vácuo para a passagem de grandes correntes elétricas (THIRY *et al.*, 2016). Na natureza o plasma é encontrado nos raios gerados em tempestades, estrelas e no próprio fogo. Em muitos casos é gerado a partir de reações exotérmicas que fornecem energia térmica ao sistema ionizando os átomos (FRIEDRICH, 2011, 2012). Entretanto, para fins tecnológicos a elevada temperatura dos plasmas térmicos limita a sua aplicação.

As partículas que constituem o plasma estão em constante movimento e colidem entre si, transferindo energia cinética umas às outras. Cada partícula do plasma é caracterizada por uma temperatura relacionada à sua energia e é expressa pela unidade de Elétron-volt (eV) (HEGEMANN *et al.*, 2016), sendo 1 eV equivalente à 11606 K.

De acordo com sua energia, o plasma pode ser classificado em duas classes: plasma em equilíbrio termodinâmico e plasma em não-equilíbrio termodinâmico. No primeiro caso, todas as partículas são caracterizadas por uma temperatura única, onde, $T_{\text{elétrons}} = T_{\text{neutras}} = T_{\text{íons}}$. Em plasmas de não-equilíbrio, a temperatura do elétron difere intensamente das partículas mais pesadas, como os íons e espécies neutras, onde, $T_{\text{elétrons}} \gg T_{\text{íons}} \geq T_{\text{neutras}}$. Nesse caso, enquanto a temperatura do elétron normalmente varia entre 1 a 10 eV, as temperaturas das demais partículas estão próximas a temperatura ambiente, com valores de 0,025 eV (298 K) (THIRY *et al.*, 2016). O plasma de não-equilíbrio também é conhecido como “plasma frio” e embora a temperatura dos elétrons seja alta, sua baixa densidade e pouca capacidade de transferir calor permitem que as superfícies ao redor do plasma permaneçam em temperaturas relativamente

baixas (BOGAERTS *et al.*, 2002), essa propriedade de não equilíbrio se torna particularmente atraente para o processamento de materiais, pois os elétrons podem induzir diversas reações químicas sem alterar a estrutura do material através da temperatura excessiva (MICHELMORE *et al.*, 2013b).

A baixa temperatura de operação dos plasmas frios permitem a funcionalização de diversos tipos de substratos, possuindo alta versatilidade, permitindo modular as propriedades de uma determinada superfície, como por exemplo, a morfologia, rugosidade e composição química do material depositado a partir do ajuste dos parâmetros operacionais utilizados na síntese do material (MICHELMORE *et al.*, 2013b; STRUZZI *et al.*, 2015).

A funcionalização de superfícies metálicas baseada na aplicação do plasma a frio em precursores orgânicos é cada vez mais explorada no meio acadêmico, através do método de polimerização a plasma, que permite a formação de filmes finos orgânicos sólidos e possui importantes aplicações na fabricação de superfícies antibacterianas (BAZAKA *et al.*, 2011b; VASILEV; COOK; GRIESSER, 2009), super-hidrofóbicas (HENRY *et al.*, 2012), *biochips* de proteínas (JONKHEIJM *et al.*, 2008), imobilização de biomoléculas para crescimento celular (BHATT; PULPYTEL; AREFI-KHONSARI, 2015; COAD *et al.*, 2013; HAYCOCK, 2011) e revestimentos de liberação controlada de fármacos (BHATT *et al.*, 2013; VASILEV *et al.*, 2010).

A deposição de filmes sólidos a partir de compostos orgânicos utilizando descargas elétricas não é nova, foi relatada pela primeira vez em 1796 (THIRY *et al.*, 2016). Desde então esses revestimentos têm se tornado alvo de estudos e caracterizações, sua natureza difere dos polímeros convencionais que possuem blocos de repetição periódicos. Os polímeros produzidos via polimerização por plasma frio são formados por uma rede aleatória de ligações, apresentando uma densidade de

reticulação significativamente maior que os polímeros convencionais (Figura 2) (KRAMER; YEH; YASUDA, 1989; MERCHE; VANDENCASTEELE; RENIERS, 2012a).

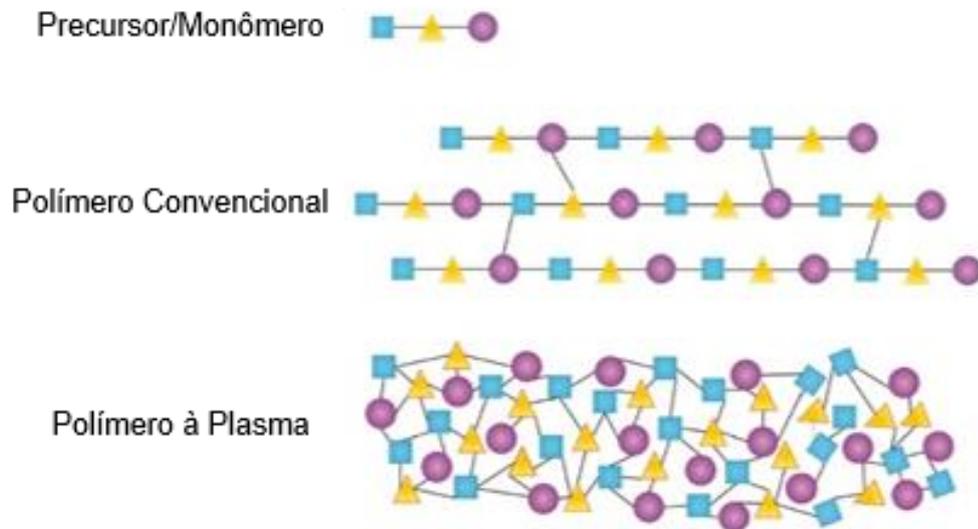


Figura 2: Diferenças entre as estruturas do precursor, polímero convencional e polímero formado por polimerização a plasma. Adaptado de THIRY *et al.* (2016).

Como os elétrons são os transmissores de energia no regime do plasma, a sua magnitude e densidade são de crucial importância para compreender os processos reativos que ocorrem na fase gasosa. A partir da teoria cinética dos gases, a função de distribuição de energia dos elétrons pode ser aproximada através da equação de Maxwell-Boltzmann, como ilustrado na Figura 3 (THIRY *et al.*, 2016). Os elétrons presentes no sistema de polimerização a plasma geralmente possuem uma energia cinética em torno de 1 a 2 eV, valores que englobam a faixa das energias de ligações dos compostos orgânicos (Figura 3), assim, os elétrons excitados com alta energia cinética colidem com as moléculas do precursor e como a sua típica distribuição energética engloba a faixa da energia das ligações orgânicas, o precursor tem suas ligações fragmentadas (CHABERT; BRAITHWAITE, 2011; FRIEDRICH, 2012).

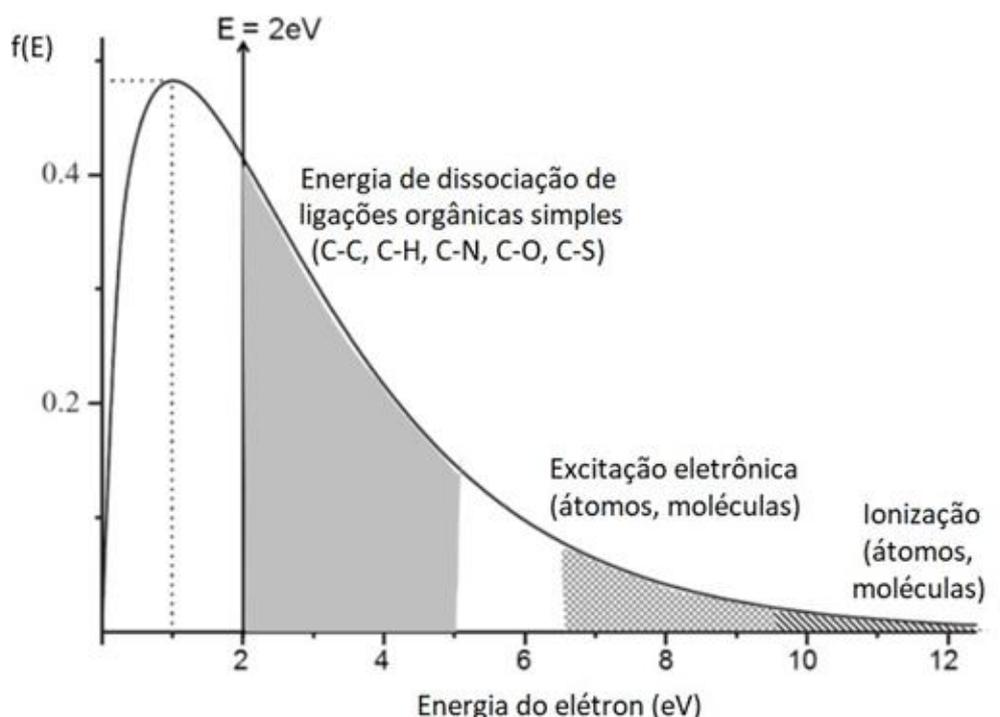


Figura 3: Distribuição energética de Maxwell–Boltzmann dos elétrons presentes em descargas de baixa pressão. Adaptada de THIRY *et al.* (2016).

A primeira etapa da polimerização consiste na volatilização de um precursor orgânico em um sistema de deposição isolado. A ativação do plasma ocorre através da fase gasosa e provoca colisões aleatórias entre elétrons energéticos e moléculas do precursor, esses choques de espécies ativas desenvolve reações de dissociação do gás, resultando na formação de radicais livres do precursor. Após a fragmentação do precursor ocorre à recombinação dos radicais formados no plasma em uma rede de ligações cruzadas, o crescimento da cadeia polimérica envolve tanto reações na fase gasosa quanto na superfície do material (GUIMOND *et al.*, 2011; YASUDA, 1981).

O mecanismo de formação do polímero gerado por plasma mais aceito foi proposto por Yasuda, e está esquematicamente representado na Figura 4. Após a ativação do plasma ocorre à radicalização do monômero, então dois tipos de reações de formação do filme podem ocorrer: a polimerização induzida por plasma (ciclo 1) e polimerização no regime de plasma (ciclo 2). No ciclo 1 não ocorre a fragmentação

completa das moléculas de precursor e a cadeia polimérica é formada através da combinação de unidades moleculares reativas como radicais livres e fragmentos em estados excitados ou ionizados. Sendo assim, é esperado que o filme possua uma estrutura parecida com o monômero original. Quando a polimerização ocorre de forma prioritária no regime de plasma (ciclo 2), existe a fragmentação do precursor pela colisão com elétrons excitados que gera uma grande quantidade de espécies reativas permitindo a recombinação dos fragmentos, dando origem a novas cadeias poliméricas (ALBA-PEREZ *et al.*, 2020; BONES, 2019).

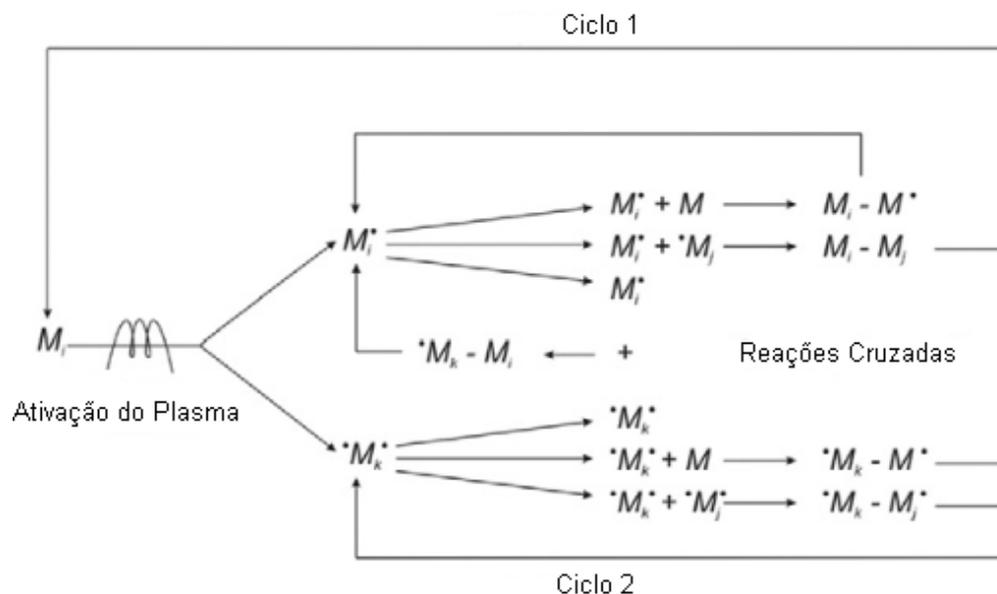


Figura 4: Descrição esquemática do mecanismo de polimerização a plasma em etapas. Adaptada de YASUDA (2004).

A composição química e grau de reticulação dos filmes finos são diretamente afetados pelos parâmetros de deposição como a fonte de energia do plasma, potência aplicada na descarga, pressão do sistema, fluxo e concentração do precursor e temperatura do substrato (MERCHE, VANDENCASTEELE E RENIERS, 2012; WONG *et al.*, 2016; YASUDA, 1985).

Parâmetros geométricos relacionados ao reator também afetam as propriedades do revestimento sintetizado via plasma. Popularmente dois modelos de reatores são utilizados nas pesquisas envolvendo a polimerização a plasma de compostos orgânicos, estão representados na Figura 5 (GERCHMAN, 2019).

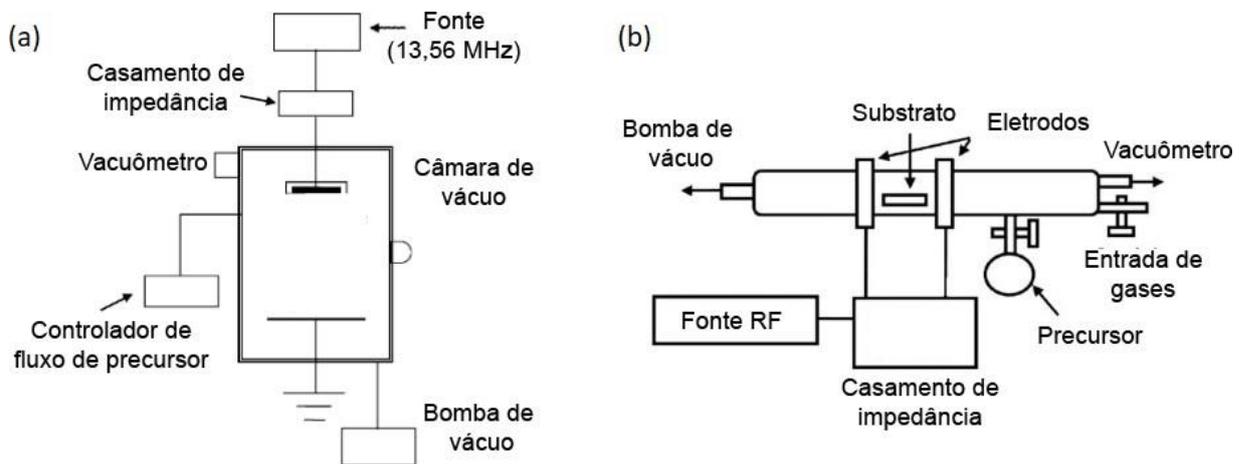


Figura 5: Reatores de polimerização por plasma frio mais comuns utilizados na literatura. (a) Eletrodos internos paralelos; (b) Eletrodos externos paralelos. (GERCHMAN, 2019).

Na Figura 5 (a) é apresentado o reator de placas paralelas internas, nesse sistema os elétrons que possuem uma mobilidade muito maior que os íons e espécies neutras, carregam negativamente o eletrodo metálico formando uma região próxima ao eletrodo com deficiência de elétrons e consequentemente concentrada de íons positivos, essa região gera uma diferença de potencial que acelera os radicais em direção ao eletrodo metálico em que a amostra se encontra, agindo como um capacitor entre o plasma e o metal, tal fenômeno é conhecido como plasma *sheath* (PLASMA, THE FOURTH STATE OF MATTER, 2021).

Os filmes produzidos via plasma de baixa temperatura, com uma fonte de energia alternada e em baixa pressão são capazes de possuir uma boa estabilidade química, fortes ligações covalentes com o substrato e alta retenção de grupos funcionais do monômero original, tornando possível ajustar através dos parâmetros

operacionais a funcionalidade química e morfologia da superfície (BAZAKA *et al.*, 2015).

A Figura 6 exemplifica o mecanismo geral de síntese de revestimentos via polimerização por plasma de um precursor orgânico.

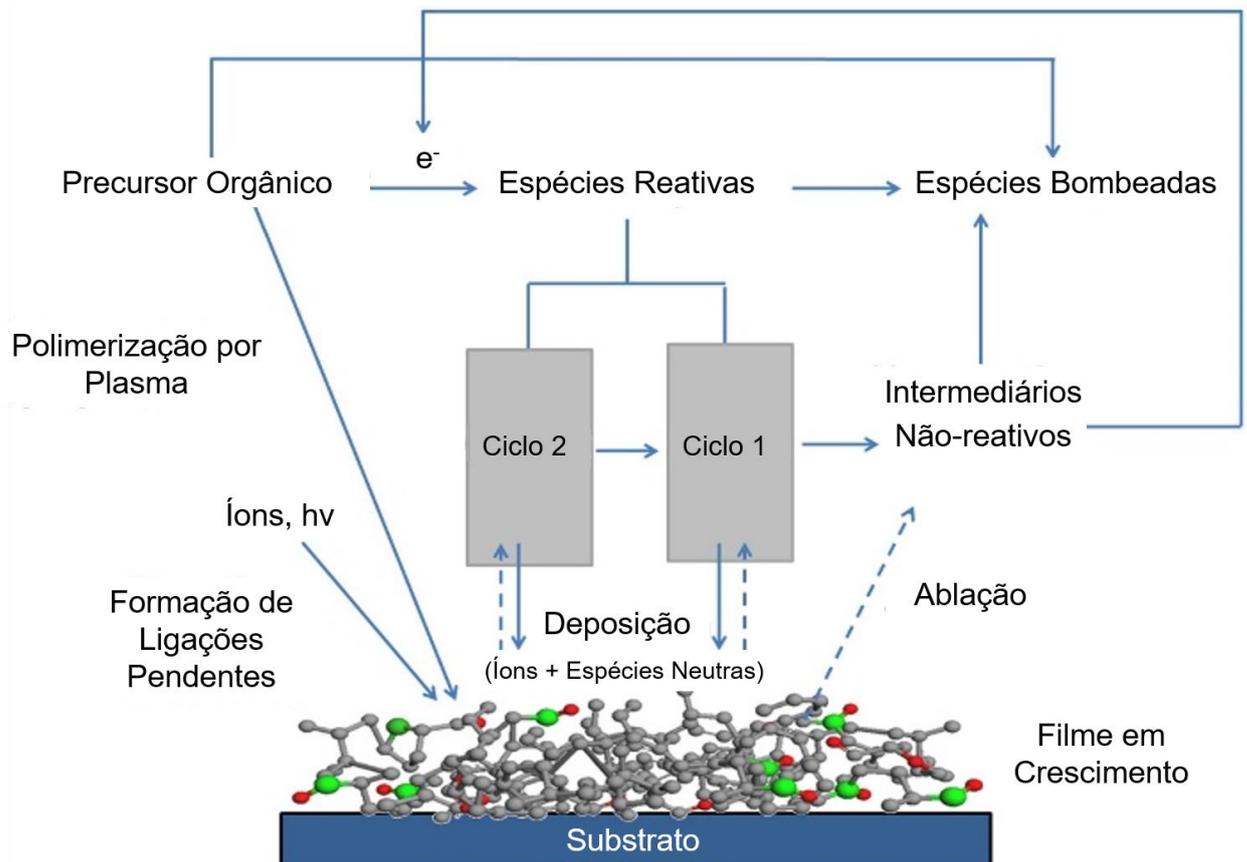


Figura 6: Mecanismo geral de polimerização por plasma frio. Adaptada de THIRY *et al.* (2016).

3.3. Óleo Essencial de Eucalipto

Fisiologicamente os óleos essenciais são produzidos por diferentes estruturas secretoras que podem estar localizadas tanto em uma parte específica da planta, como nela por um todo (VITTI; BRITO, 2003). São compostos por misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis e lipofílicas, geralmente possuem um odor marcante e são líquidas em condições ambiente (ELAISSI *et al.*, 2011). Essas misturas possuem uma alta gama de constituintes químicos e grupos funcionais das mais diversas

classes: hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos e ácidos orgânicos (ELAISSI *et al.*, 2011; TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004). Mais de 250 tipos desses óleos sintetizados naturalmente são comercializados anualmente no mercado global, estimando um valor de mercado de 1,2 bilhão de dólares (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016).

Por exemplo, a biossíntese do óleo essencial é realizada a partir das folhas na espécie nativa da Austrália, *Eucalyptus globulus*. Em sua estrutura foliar encontram-se distribuídas pequenas cavidades globulares que biossintetizam o óleo, que participa do metabolismo secundário da planta, conferindo a capacidade de adaptação ao ambiente em que está inserida, como na defesa da planta contra insetos, frio ou calor (DORAN; BROPHY, 1990; VITTI; BRITO, 2003).

Os óleos das folhas de eucalipto são compostos por ricas misturas de substâncias orgânicas, onde se estima que 50 a 100 componentes diferentes sejam biossintetizados, dentre eles alguns apresentam maior concentração e são conhecidos como componentes majoritários, enquanto as substâncias presentes em menores concentrações são denominadas de componente traço. O componente majoritário é o constituinte

de principal interesse pelo qual ocorre a exploração econômica das plantas produtoras de óleo (TOMAZ *et al.*, 2014; VITTI; BRITO, 2003; VIVAN *et al.*, 2011).

Com o objetivo de investigar as propriedades presentes no óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, os autores Damjanović-Vratnica, *et. al* (2011), caracterizaram quimicamente os componentes do óleo utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG/MS. As análises demonstraram

concentrações de 85,8% para o 1,8-cineol (Figura 7), sendo este o componente majoritário do óleo, seguido dos terpenos α -pineno e β -mirceno.

Diferentes percentagens de 1,8-cineol podem ser encontradas de acordo com a localização geográfica e bioma que a planta está inserida. As seguintes concentrações do terpeno principal do *E. globulus* foram relatadas: 64,5% no Uruguai, 77% em Cuba, 58% a 82% no Marrocos, e 50% a 65% na Argentina (VITURRO; MOLINA; HEIT, 2003).

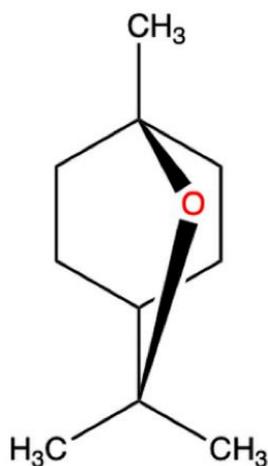


Figura 7: Estrutura química do 1,8-cineol (eucaliptol), componente majoritário do óleo essencial de *E. globulus* (DAMJANOVIĆ-VRATNICA *et al.*, 2011; DOUGNON; ITO, 2020).

Extrações obtidas de outras espécies de eucalipto se diversificam nas suas composições químicas e aplicações comerciais. A espécie *E. citriodora*, por exemplo, tem como seus componentes majoritários o citronelal e o geraniol, compostos explorados com diversas finalidades na indústria, com destaque na produção de repelentes contra insetos (AHMAD *et al.*, 2015).

Uma das principais propriedades observadas em estudos com o 1,8-cineol envolve a capacidade do composto de retardar e até inibir em altas porcentagens a atividade de bactérias em diferentes ambientes (CIMANGA *et al.*, 2002; TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004). Onde a inibição da atividade microbiana advinda dos óleos essenciais, especialmente os de eucalipto, estão relacionadas com a presença de

compostos como álcoois, cetonas, aldeídos e éteres encontrados em abundância nesses óleos (ELAISSI *et al.*, 2011).

3.4. Contaminação de Superfícies por Biofilme Bacteriano

Na natureza, as bactérias raramente vivem em sua forma planctônica, mas sim em sistemas biológicos organizados em uma comunidade funcional e coordenada chamada de biofilme (SAUER *et al.*, 2022).

As células bacterianas são capazes de aderir a praticamente todos os tipos de superfícies naturais e artificiais. Os micro-organismos se movem ou são movidas do ambiente para uma superfície através de efeitos de forças físicas, como atração de van der Waals, forças gravitacionais, efeito da carga eletrostática da superfície e interações hidrofóbicas (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004).

Após aderidas em superfícies sólidas, ocorre a fixação e o crescimento do biofilme através de um processo de cinco etapas, sendo elas a (i) adesão reversível, (ii) adesão irreversível; (iii) desenvolvimento inicial; (iv) maturação e (v) liberação das células persistentes (Figura 8) (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; RABIN *et al.*, 2015; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). A primeira etapa consiste na adesão das bactérias em sua forma planctônica, acontece de forma reversível e é mantida por interações físico-químicas não específicas entre os organismos e o substrato. A segunda fase consiste na mudança do estágio reversível para o irreversível, pois passam a produzir substâncias que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada peptídica que envolve o biofilme. Na terceira e quarta etapa há o início da formação de micro colônias e do desenvolvimento da estrutura do biofilme maduro. A última fase da formação do biofilme ocorre quando o ambiente não é mais favorável para sua manutenção, e consiste no descolamento do biofilme desenvolvido em forma

de células planctônicas que depois de desprendidas podem colonizar novos ambientes, reiniciando a formação de novos biofilmes (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000; RABIN *et al.*, 2015; STOODLEY *et al.*, 2002).

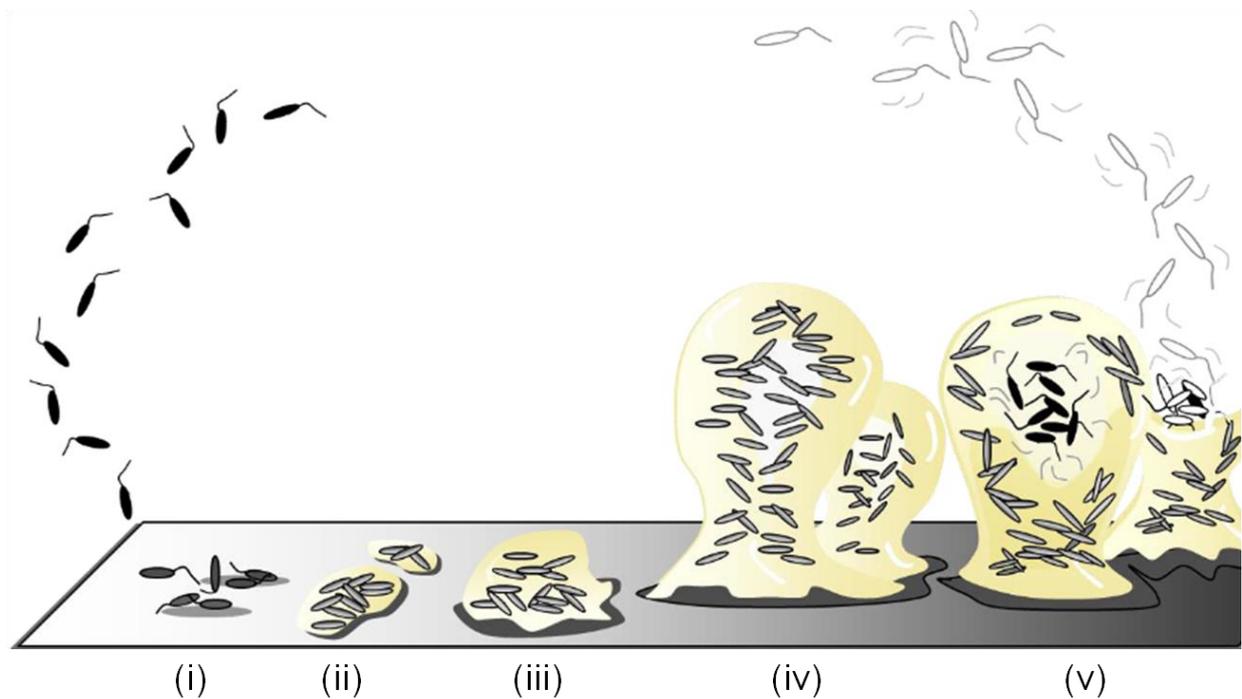


Figura 8: Esquema dos estágios de desenvolvimento do biofilme bacteriano. No estágio (i), as bactérias planctônicas aderem a uma superfície sólida. No estágio (ii), a adesão torna-se irreversível. O estágio (iii) se inicia a fundação da micro colônia. O estágio (iv) mostra a maturação e o crescimento do biofilme em comunidades bacterianas tridimensionais. No estágio (v), ocorre a dispersão e as células planctônicas livres são liberadas do aglomerado de para colonizar novos locais. Adaptado de SAUER *et al.* (2022).

Um grande número de espécies de bactérias causadoras de infecções é capaz de sobreviver e se desenvolver mesmo em locais limpos, como clínicas e hospitais. Entre esses organismos estão os do tipo Gram-positivo *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Streptococcus viridans* e do tipo Gram-negativo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, e *Pseudomonas aeruginosa* (LANDINI *et al.*, 2010). Tais espécies representam uma ameaça considerável para a sociedade atual, por exemplo, a espécie *P. aeruginosa* é um patógeno multirresistente a antibióticos, atua como um micro-organismo oportunista

em hospedeiros imunocomprometidos causando infecções pulmonares agudas e crônicas que resultam em altas taxas de morbidade e mortalidade (MURRAY; PORRECA; COWAN, 1988). As espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* comprovadamente aderem com facilidade em superfícies metálicas e formam biofilmes em implantes médicos, como parafusos e placas ortopédicas, causando a biocorrosão e falha potencial do material (PRADEEP KUMAR; EASWER; MAYA NANDKUMAR, 2013).

Condições hidrodinâmicas, fisiológicas e ecológicas influenciam diretamente a estrutura do biofilme. Por exemplo, a espessura média de um biofilme formado em boas condições pela espécie *P. aeruginosa* é de cerca de 24 μm , enquanto para a *S. epidermidis* a espessura média do biofilme é relativamente maior, apresentando 32,3 μm de espessura, em um meio propício para seu desenvolvimento o biofilme pode chegar a mais de 400 μm em algumas espécies (MA *et al.*, 2009).

A eficácia da aderência dos micro-organismos a uma superfície metálica tem como base múltiplos aspectos, como forma e tamanho da célula, a topografia do substrato e o ângulo de contato (hidrofobicidade/hidrofilicidade) da superfície do material. Além disso, é compreendido que bactérias aderem preferencialmente a superfícies mais rugosas por três razões, a presença de uma maior área de contato disponível para fixação, proteção contra forças de cisalhamento e alterações químicas que causam interações físico-químicas fortes com a superfície (AMMAR *et al.*, 2015a; KUMAR; ROY; DEY, 2021; SCHEUERMAN; CAMPER; HAMILTON, 1998), enquanto que superfícies super lisas não favorecem a adesão bacteriana e formação de biofilme (TAYLOR *et al.*, 1998).

A interação entre os micro-organismos e a superfície é influenciada diretamente pela topografia, acredita-se que a fixação, proliferação e diferenciação das células sejam afetadas por estruturas de pico e vale que abrangem escalas micrométricas e

nanométricas (TRUONG *et al.*, 2010). Portanto, visando obter a atividade antibacteriana, é importante investigar os parâmetros de rugosidade que ordenam a geometria da superfície, entre eles temos a rugosidade média (R_a), a rugosidade quadrática média (R_q) e a rugosidade máxima (R_z). Mesmo amostras com a composição química das superfícies idênticas podem apresentar diferentes comportamentos de adesão celular devido a diversificadas arquiteturas e rugosidades da superfície (HASAN; CRAWFORD; IVANOVA, 2013).

3.4.1. *Staphylococcus aureus*

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* foram descritos pela primeira vez em 1880, pelo cirurgião Alexandre Ogston e atualmente constituem os patógenos mais comuns em infecções em todo mundo. Caracterizadas pela sua estrutura em cocos (esferas), com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, são imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Esse micro-organismo pode ser encontrado naturalmente no organismo do ser humano, estando presente em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (SANTOS *et al.*, 2007).

Atualmente, a espécie de maior interesse médico, é a *S. aureus*, que está frequentemente relacionada com infecções provenientes de implantes biomédicos. Após a formação do biofilme demonstram elevada resistência a agentes antimicrobianos, comprometendo a integridade e saúde do paciente (VEERACHAMY *et al.*, 2014). A relação da *S. aureus* com infecções ósseas está no fato de essa bactéria ser capaz de expressar numerosas proteínas de superfície, denominadas adesinas, que permitem a adesão aos componentes da matriz óssea. Quando um implante é inserido no corpo para aplicações de osseointegração, há competição entre as células humanas hospedeiras e as bactérias patogênicas para aderir à superfície do

biomaterial. Portanto, a rápida integração do implante no tecido hospedeiro é essencial, caso contrário, a adesão de bactérias na superfície do implante levará à colonização bacteriana e a formação de biofilme (AHMED; ZHAI; GAO, 2019).

Segundo Alam e Balani (2017), a rugosidade e molhabilidade desempenham um papel vital na adesão de biofilmes da espécie *S. aureus*. Quanto maior a rugosidade e a energia da superfície, maior é a força de adesão das bactérias. Superfícies da liga Ti6Al4V apresentaram altos índices de força de adesão, enquanto superfícies poliméricas com ângulo de contato com água de 81° demonstraram a menor taxa de adesão para essa espécie.

3.4.2. *Escherichia coli*

Pertencendo a família *Enterobacteriaceae*, a espécie *Escherichia coli* é um micro-organismo classificado como Gram-negativo, possui formato de bastonete, não esporulados, anaeróbios facultativos (HOCH, 2022).

Essa espécie normalmente coloniza o trato gastrointestinal de bebês humanos dentro de algumas horas após o nascimento. Normalmente, a *E. coli* e seu hospedeiro humano coexistem em boa saúde e benefício mútuo. No entanto, existem clones de *E. coli* altamente adaptados que adquiriram atributos de virulência específicos, conferindo maior capacidade de adaptação a novos meios causando diversos tipos de doenças. Dentre elas, três síndromes clínicas gerais podem resultar em infecções causadas por esse micro-organismo: doença entérica/diarreica, infecções do trato urinário e sepse/meningite. (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Quando os biomateriais são implantados no corpo humano, a colonização microbiana compete com a integração das células teciduais nas superfícies dos biomateriais, biofilmes de *Escherichia coli* provenientes de cultura contínua de uma

única espécie foram cultivados em dióxido de titânio (TiO₂), demonstrando o potencial de adesão do micro-organismo em superfícies de titânio (GEETHA *et al.*, 2009; LÜDECKE *et al.*, 2014).

3.5. Polimerização por Plasma de Metabólitos Secundários de Plantas

Extratos vegetais e óleos essenciais podem ser utilizados em diversos procedimentos de tratamentos anti-inflamatórios e antivirais (ABERS *et al.*, 2021; ALEKSIC SABO; KNEZEVIC, 2019).

Os compostos químicos produzidos pelas plantas são categorizados em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários, como carboidratos, lipídios e proteínas, estão diretamente envolvidos no desenvolvimento e crescimento das plantas (JAN *et al.*, 2021). Enquanto os secundários são metabólitos multifuncionais que estão tipicamente envolvidos na defesa das plantas e na comunicação ambiental (HARTMANN, 2007).

Entre os produtos metabólitos secundários, os terpenos são os principais componentes estudados para a produção de filmes finos via polimerização a plasma (ALVAREZ *et al.*, 2020; BAYRAM; SIMSEK, 2018; EASTON; JACOB; SHANKS, 2009; GERCHMAN *et al.*, 2019; JACOB *et al.*, 2008a, 2014). Suas ligações saturadas, insaturadas e estruturas cíclicas oxigenadas facilitam a polimerização catiônica, atuando como um caminho para a produção de polímeros biodegradáveis (BAZAKA *et al.*, 2015; THIRY *et al.*, 2016).

BAZAKA *et al.* (2011), estudaram a polimerização por plasma do terpeno isolado terpinen-4-ol, esse componente ativo do óleo de melaleuca, por se tratar de um terpeno alcoólico monocíclico, apresenta comportamento antibacteriano em filmes finos. Os autores constaram que a síntese com potências mais baixas (10 W) resultam em uma

conservação parcial de grupos biologicamente ativos do precursor original devido a menor taxa de fragmentação do precursor, mesmo apresentando uma superfície hidrofílica ($62,7^\circ$) cerca de 90% das células de *S. aureus* retidas no filme eram inviáveis. Quando produzidos em maior potência (25 W), esses filmes perderam sua atividade antibacteriana, e promoveram adesão e proliferação das células bacterianas mesmo com valores de ângulo de contato mais elevados (67°). Segundo os autores, a modificação das propriedades do material pela polimerização a plasma não só alterou a morfologia da superfície, mas também a sua composição química. O efeito combinado desses dois parâmetros pode influenciar fortemente a magnitude da adesão e proliferação bacteriana, preservando as propriedades do material inerentes ao substrato, como as propriedades mecânicas e físico-químicas.

O mesmo grupo de pesquisa polimerizou via plasma frio de baixa pressão um filme fino de terpinen-4-ol sobre quatro substratos de titânio diferentes (BAZAKA *et al.*, 2020). As amostras metálicas utilizadas neste estudo possuem topografias de superfície distintas que foram obtidas através do tratamento de superfície via polimento químico, polimento mecânico, prensagem angular em canais com seção transversal constante e ablação a laser de femtossegundo. Através das análises de caracterização das amostras revestidas foi observado que as superfícies de titânio funcionalizadas diferiram em suas propriedades físico-químicas, principalmente na molhabilidade e rugosidade, como por exemplo, valores de $87,3^\circ$ e $R_a = 0,8$ nm, $R_z = 22,9$ nm para o polimento químico e $68,5^\circ$ e $R_a = 41,7$ nm, $R_z = 310,0$ nm com polimento mecânico.

À medida que a rugosidade da superfície aumentou, os revestimentos de plasma tornaram-se menos uniformes e a sua atividade antibacteriana contra as espécies *P. aeruginosa* e *S. aureus* diminuiu. Os autores explicam que quando o plasma reativo entra em contato com as amostras, as espécies de polímeros começam a se depositar

primeiramente nos picos topográficos na superfície do titânio, e isso pode levar à formação de um forte campo elétrico tipo dipolo-dipolo que aumenta o fluxo de íons formados em direção à superfície. Essa distribuição de íons resulta na deposição aleatória do polímero gerando um preenchimento gradual das lacunas e vazios da superfície. Assim, substratos com menor rugosidade máxima (R_z) tendem a ser mais lisos e uniformes em sua composição química e espessura, e por esta razão tem o melhor desempenho antimicrobiano.

Estudos mais recentes utilizaram a polimerização por plasma simultânea de precursores derivados de metabólitos secundários de plantas (como o óleo essencial de gerânio e o terpinen-4-ol) e acetilacetato de zinco através da decomposição térmica do sal, este método resultou em filmes poliméricos orgânicos/inorgânicos mistos (AL-JUMAILI; BAZAKA; JACOB, 2017; KUMAR *et al.*, 2020). Ambos os trabalhos demonstraram uma atividade antibacteriana significativa para bactérias do tipo Gram-positivo e Gram-negativo. A redução percentual das células viáveis bacterianas foi de 40% a 70% para os revestimentos polimerizados de terpinen-4-ol sem a adição de zinco, enquanto a incorporação do componente de zinco aumentou a inibição do crescimento do biofilme para cerca de 85% (KUMAR *et al.*, 2020).

CHAN *et al.* (2016), fabricaram revestimentos a partir da polimerização por plasma do terpeno carvona, obtendo um filme liso e altamente reticulado que demonstrou um ótimo desempenho antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (redução de 86% em *E. coli* e redução de 84% em *S. aureus*), outro resultado relevante encontrado pelos autores foi a ausência de efeito citotóxico para células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) *in vitro*.

Além da disponibilidade de grupos funcionais provenientes da fragmentação e recombinação obtidos na polimerização a plasma, especulou-se que monômeros não

fragmentados presos dentro do polímero durante a deposição podem ser misturados durante a formação do polímero (BAZAKA *et al.*, 2015), contribuindo assim para a inibição da formação de biofilme devido às propriedades intrínsecas dos precursores em seus estados naturais (AGGARWAL *et al.*, 2002; AIT-OUAZZOU *et al.*, 2011; CIMANGA *et al.*, 2002; DAMJANOVIĆ-VRATNICA *et al.*, 2011; SONBOLI; BABAKHANI; MEHRABIAN, 2006).

3.6. Adesão de Células-tronco e Citotoxicidade em Superfícies Polimerizadas por Plasma

O titânio e suas ligas atuam como materiais de aplicações biomédicas, para isso, as células do organismo implantado precisam ser capazes de aderir à superfície do material e, em seguida, se espalhar para exercer atividades metabólicas sem comprometer substancialmente sua funcionalidade (FINKE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2019).

As células-tronco desenvolvem-se em micro-ambientes complexos, tendo como principal componente uma matriz extracelular. Elas possuem potencial para produção de todas as células do corpo, sendo capazes de se auto renovarem (BOYD *et al.*, 2009).

Os diferentes tecidos naturais, como o osso, cartilagem, nervos ou vasos sanguíneos são compostos por padrões topográficos que envolvem micro e nano escala (WANG *et al.*, 2019). Assim, a topografia da superfície é de vital importância para a adesão, migração, e diferenciação de células-tronco (ABAGNALE *et al.*, 2015).

Segundo ANSELME (2010), a rugosidade da superfície não deve ser considerada apenas pela amplitude de picos e vales, mas também em sua organização e distribuição na superfície. Topografias desordenadas tendem a promover uma baixa

adesão celular. Isso ocorre devido às irregularidades superficiais causarem uma inabilidade de estabelecer área de contato suficiente para a adesão celular.

Além da topografia, o efeito das propriedades químicas na adesão celular foi amplamente estudado. A adição de grupos funcionais como hidroxilas (OH), aminas (NH₂) e ácidos carboxílicos (COOH) em uma superfície demonstrou melhorar o desempenho quanto à adesão e o crescimento de células-tronco mesenquimais (BHATTACHARYYA *et al.*, 2010; BISSON *et al.*, 2002; FINKE *et al.*, 2014; FRANCE *et al.*, 1998).

KESELOWSKY *et al.* (2005), relataram que as superfícies ricas em grupos funcionais OH e NH₂ eram mais benéficas para a osteogênese de uma linhagem celular semelhante a osteoblastos. Além disso, a deposição de filmes finos ricos em grupos funcionais amina melhoram a biocompatibilidade de placas maxilofaciais de titânio, os implantes funcionalizados por plasma demonstraram um aumento na diferenciação osteoblástica e calcificação em condições *in vitro* e *in vivo* devido à presença desses grupos funcionais (JEONG *et al.*, 2019).

Filmes de precursores naturais polimerizados via plasma, ricos em grupos funcionais, promoveram a fixação de células-tronco diferenciadas como osteoblastos e fibroblastos (BAZAKA; DESTEFANI; JACOB, 2016; LEVCHENKO *et al.*, 2021; ROMORICO, JESUS *et al.*, 2022).

BAZAKA *et al.* (2015), polimerizaram via plasma do álcool monoterpênico derivado do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* em uma superfície de magnésio, seus ensaios *in vitro* demonstraram que o revestimento apresentou citocompatibilidade e aumentou a viabilidade das células estudadas.

Esses trabalhos sugerem que a funcionalização de superfícies com polímeros à base de plasma é uma tecnologia promissora para o desenvolvimento de biomateriais e expansão do conhecimento acerca de revestimentos poliméricos em áreas médicas.

3.7. Esterilização e Desinfecção de Biomateriais

O termo estéril é utilizado para indicar a probabilidade de um implante ou dispositivo possuir presença ou ausência de micro-organismos e é essencialmente um estado binário; um material é estéril ou contém micro-organismos. A desinfecção e esterilização são etapas críticas para garantir a segurança e o sucesso de implantes e dispositivos médicos. Para isso deve-se considerar não apenas os requisitos do material, mas também escolher o processo de esterilização adequado, para que a funcionalidade do material não seja prejudicada (HARRINGTON *et al.*, 2020).

Os princípios dos mecanismos de inativação dos micro-organismos dependem do método de esterilização utilizado. Dentre os principais procedimentos, alguns serão descritos a seguir.

- *Autoclave a Vapor*: é um dos métodos mais eficazes de esterilização. Opera através do método a vapor úmido, fornecendo pelo menos 7 vezes mais calor em uma base equimolar do que o calor seco na mesma temperatura de 121 °C. Geralmente é recomendado para materiais que provavelmente não sofrerão danos por calor ou água (ROGERS, 2012). Em temperaturas de calor úmido suficientemente alto, o procedimento pode inativar diversos micro-organismos, incluindo as espécies mais resistentes, através da coagulação de proteínas, causando a desnaturação do DNA (RUTALA; WEBER, 2008).

- *Plasma de Ar*: neste processo os micro-organismos são expostos a espécies reativas geradas por plasma eletromagnético em baixa pressão. A interação de fótons

ultravioleta (UV) emitidos após a descarga com ligações químicas nas fitas de DNA é um dos mecanismos propostos para a inativação dos micro-organismos. Outro mecanismo envolve a erosão das paredes dos esporos bacterianos por espécies quimicamente ativas geradas a partir dos vários gases presentes no plasma (ANTONINI *et al.*, 2021; HARRINGTON *et al.*, 2020).

- *Óxido de Etileno (ETO)*: esse método tem sido amplamente utilizado na indústria biomédica, bem como em centros de saúde, especialmente em materiais sensíveis à temperatura. O óxido de etileno (Figura 9) é um gás alquilante que reage com os constituintes celulares dos organismos, como o ácido nucléico e as proteínas funcionais, incluindo enzimas, impedindo o funcionamento do metabolismo celular normal e a capacidade de reprodução, tornando os micro-organismos inviáveis (MENDES; BRANDÃO; SILVA, 2007). A esterilização por ETO ocorre em uma câmara de esterilização sob vácuo para evitar o vazamento do gás tóxico. O teor de umidade varia entre 30% e 80% e a temperatura entre 40°C e 55°C, esses parâmetros devem ser cuidadosamente controlados ao longo do processo para garantir a sua eficiência (LEROUGE, 2019).

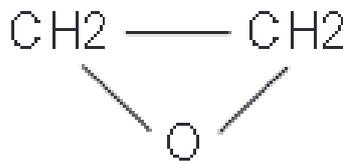


Figura 9: Molécula de óxido de etileno (ETO) (LEROUGE, 2019).

- *Radiação Ultravioleta (UV-C)*: A radiação ultravioleta (UV) é geralmente utilizada para desinfecção em laboratórios de análises clínicas e institutos de pesquisa. Sua natureza ondulatória não produz resíduos ou subprodutos tóxicos conhecidos. O espectro UV (Figura 10) é comumente subdividido em três categorias: UV-A

(400–315 nm), UV-B (315–280 nm) e UV-C (280–200 nm) (HASIRCI; HASIRCI, 2018). A radiação UV-C tem a maior energia devido à faixa de comprimento de onda e, portanto, é mais eficaz. Neste comprimento de onda, a luz destrói patógenos através da desativação do seu DNA, formando dímeros de pirimidina. Quando o micro-organismo interage com a alta energia de fótons proveniente do UV-C, suas ligações peptídicas e de dissulfeto se quebram e ficam permanentemente danificadas (RAMOS *et al.*, 2020). Este método pode ser considerado um agente germicida eficaz contra diferentes micro-organismos, reduzindo as taxas de infecção e contaminação. Porém, é importante ressaltar que existe uma redução da eficácia de descontaminação em três casos: quando se aumenta a distância entre a superfície alvo e o aparelho de luz UV-C, quando a superfície não está alinhada com o aparelho de luz UV-C e quando há presença de matéria orgânica. Por outro lado, observa-se um aumento da eficácia na redução de diferentes micro-organismos quando o inóculo é espalhado em uma área de superfície maior. Assim, esses fatores devem ser considerados para criar estratégias visando aumentar a eficiência do processo de UV-C (WEBER *et al.*, 2016).

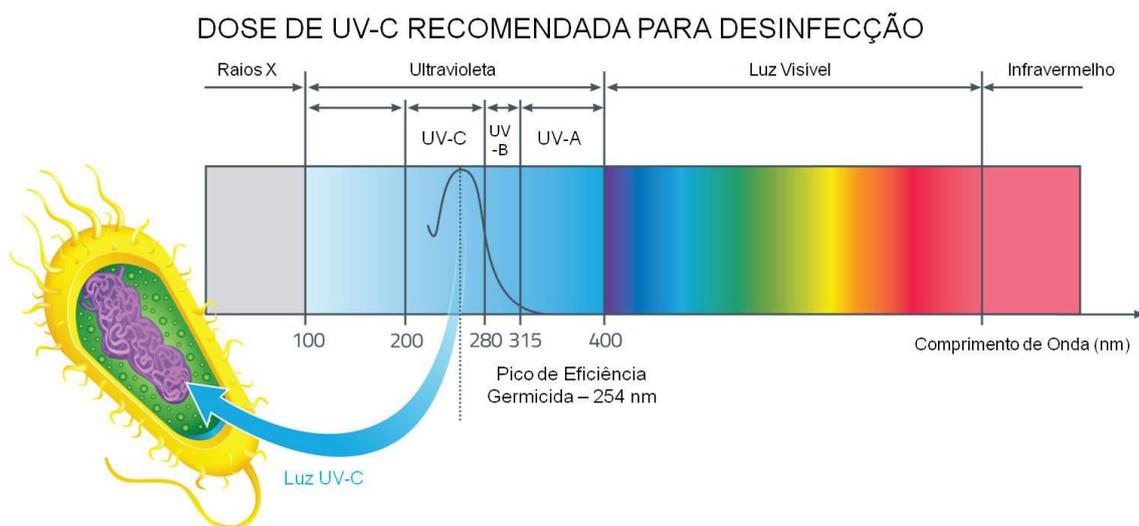


Figura 10: Curva de eficiência germicida da radiação ultravioleta em diferentes comprimentos de onda (nm). Adaptado de (LED, 2021).

4. Metodologia

4.1. Fluxograma

Na Figura 11 é apresentado o fluxograma da metodologia empregada no estudo.

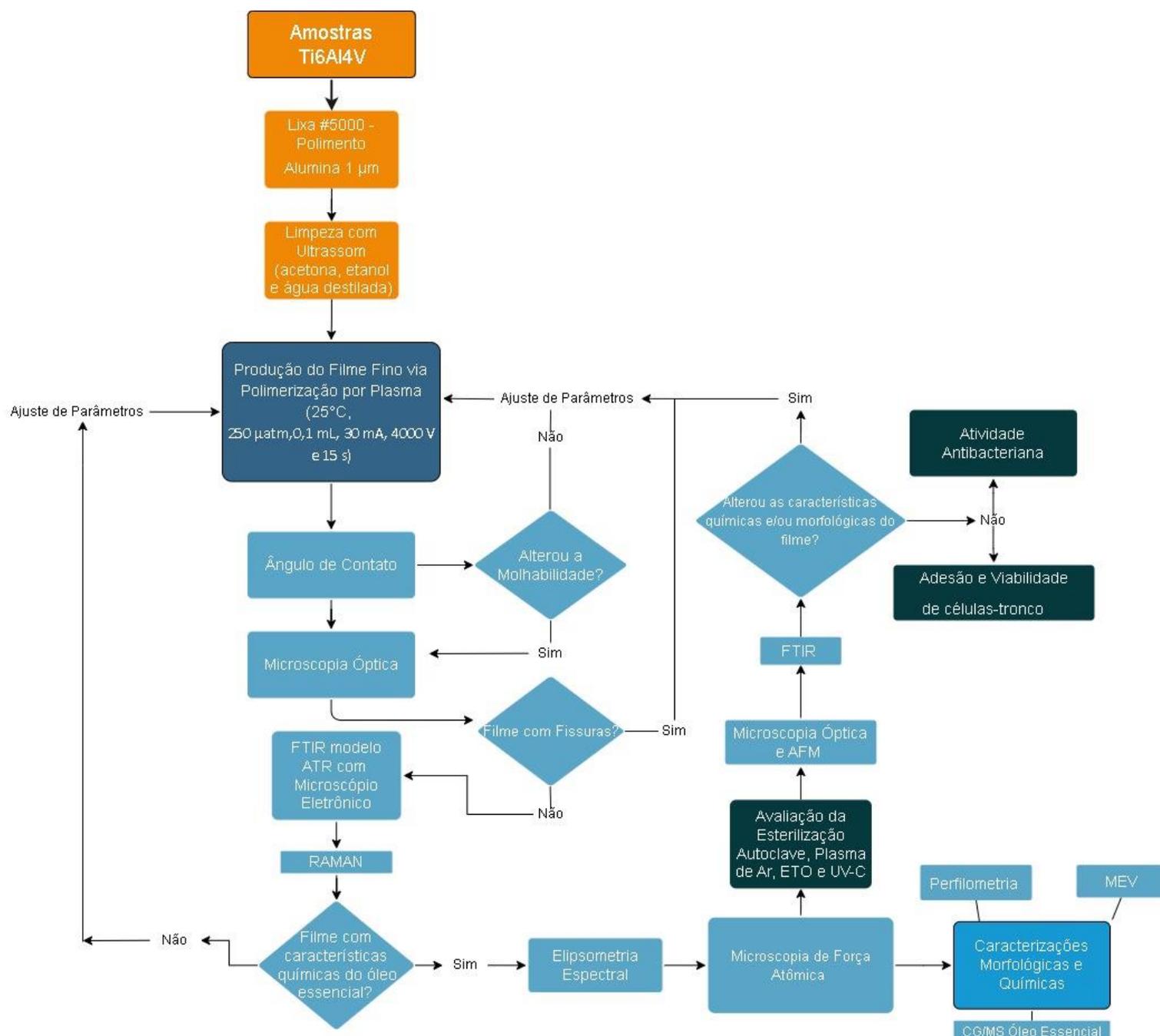


Figura 11: Fluxograma das etapas de obtenção do filme por plasma frio, caracterizações e análises biológicas.

4.2. Preparação do Substrato Metálico

As amostras circulares com diâmetro de 15 mm foram obtidas a partir do corte de uma chapa da liga de Ti6Al4V (Ti 90,56%, Al 4,72%, V 4,063%), com aproximadamente 1 mm de espessura. Lixaram-se a superfície das amostras da liga metálica com lixas de granulometria #220, #400, #600, #800, #1200, #5000. A seguir, ocorreu o polimento com alumina particulada de 1 µm. Por fim, todas as amostras foram limpas com três ciclos de 10 minutos, sendo o primeiro ciclo em acetona, o segundo em etanol e o último em água deionizada.

4.3. Polimerização por Plasma Frio

A polimerização por plasma foi realizada em um reator confeccionado no Laboratório de Pesquisa em Corrosão - LAPEC/UFRGS, Figura 12. O aparato é composto por uma câmara de vidro sobre uma superfície de aço inox com *o-ring* para máxima vedação do sistema. Na base metálica existem conexões ligadas a uma bomba de vácuo com vacuômetro acoplado, as outras conexões estão ligadas ao cilindro de argônio, e a uma mangueira para saída de gás de purga/entrada de ar. A distância entre os eletrodos de titânio superiores e inferiores é mantida fixa em 3 centímetros. No interior da câmara também são colocados quatro recipientes de vidro onde o precursor é adicionado.



Figura 12: Reator utilizado na Polimerização por Plasma Frio do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*.

A síntese dos filmes finos ocorreu via polimerização por plasma frio do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* 80-85% extraído das folhas, adquirido da empresa brasileira Extranatural (Lote: 030120).

Para o processo de deposição se adicionou, nos quatro recipientes de vidro, 100 μL do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*; após a purga do sistema com argônio (5 minutos), realizou-se vácuo até uma pressão de aproximadamente 250 μatm . Quando essa pressão foi atingida, o plasma foi acionado durante 15 segundos, em temperatura ambiente, com corrente e tensão de saída de 30 mA e 4000 V respectivamente. Por fim, a válvula de entrada de ar foi aberta e a amostra foi retirada.

4.4. Caracterizações

A espessura de camada do filme produzido via polimerização a plasma foi medida através da técnica de elipsometria espectral, no instituto de física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pelo Laboratório de Espectroscopia Laser e Óptica de Filmes. O equipamento utilizado foi o SOPRA GES-5E da marca Semilab, aplicando uma faixa espectral de 350 nm a 750 nm e ângulo de

incidência de 75°. Aplicou-se o modelo de Cauchy para o cálculo das curvas de dispersão. Para o estudo da espessura do filme polimerizado seis tempos diferentes de ativação do plasma foram utilizados (5 s, 15 s, 20 s, 30 s, 40 s, 60 s).

Obtiveram-se as medidas dos ângulos de contato com água destilada da superfície funcionalizada e do substrato metálico polido por um sistema de medição de ângulo de contato com goniômetro Kruss. As medições foram registradas em triplicata, de no mínimo 3 gotas em regiões distintas das amostras. Para cada gota, os ângulos foram medidos utilizando o programa SurfTens.

Realizaram-se imagens de Microscopia de Força Atômica (AFM) no equipamento SPM-9500J3 SHIMADZU, operando em modo dinâmico (não-contato), com sondas de nitreto de silício (NANOSENSORS). Os parâmetros de rugosidade média (R_a), e a rugosidade máxima (R_z), na escala manométrica foram coletados para a análise de rugosidade dos filmes e substratos.

As medidas dos parâmetros de perfil e rugosidade na escala micrométrica, R_{sk} e R_{kur} ocorreram pela técnica de Perfilometria Óptica 3D (Interferometria), através de um Perfilômetro Óptico 3D Bruker (GTK M, CONTOURGTK).

Imagens da superfície, obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foram realizadas utilizando o modelo ZEISS EVO LS-10.

Para avaliar estrutura química do revestimento formado, as amostras foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) em reflexão total atenuada (ATR). Os espectros de absorção na região de infravermelho foram obtidos na região compreendida entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando um espectrômetro Nicolet IS10 Thermo Scientific com microscópio óptico integrado.

Para análise de Espectroscopia de Raman utilizou-se o equipamento Renishaw inVia Spectrometer System for Raman spectral analysis, com laser de 514 nm. A aquisição e tratamento dos dados foi realizada com o software Wire.

Visando compreender melhor os mecanismos de quebra de ligações químicas geradas durante o plasma, a análise química do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foi realizada pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS), utilizando o cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas com impacto eletrônico como modo de ionização e analisador quadrupolo, modelo Shimadzu GCMS-QP2010 SE, equipado com coluna Restek RTX-5MS (30 cm x 0,25 mm, 0,25 µm).

4.5. Efeito da Esterilização

Foi realizado o estudo do efeito da esterilização na estrutura morfológica e química do filme, além da capacidade antibacteriana. Diferentes métodos de desinfecção foram escolhidos, tais como: radiação ultravioleta (UV-C), autoclave, óxido de etileno (ETO) e métodos alternativos como plasma de ar (ANTONINI *et al.*, 2019, 2021). Na esterilização por autoclave a vapor, as amostras foram submetidas a temperatura de 121 °C por 30 minutos. Utilizando radiação ultravioleta (UV-C) durante 15 minutos de cada lado, as amostras foram esterilizadas com uma lâmpada padrão germicida de 15 W. A esterilização pelo método de óxido de etileno (ETO) ocorreu à 60 °C e após o processo foi submetido a aeração para remover o gás tóxico. A esterilização a plasma de ar foi realizada com potência máxima de 65 W e tempo de limpeza de 5 minutos em atmosfera de N₂ e O₂ na mesma proporção do ar atmosférico.

4.6. Ensaio de Adesão Bacteriana

Os inóculos das espécies de bactéria *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram feitos de acordo com o descrito pela literatura (MARTINELLI *et al.*, 2017). Antes de cada experimento, os micro-organismos foram cultivados *overnight* em Luria Bertani (LB) a 37 °C e 180 rpm. Após a incubação, os materiais foram colocados em contato com as cepas de referência e incubados por 24 horas a 37 °C, após isso, as amostras foram lavadas duas vezes para liberar os micro-organismos sésseis. Os materiais foram então submetidos ao destacamento mecânico das bactérias aderidas e as populações sésseis foram quantificadas pelo método das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Para a avaliação estatística, foi empregado o teste de análise de variância ANOVA, com nível de confiança $\alpha = 95\%$.

4.7. Ensaio de Adesão e Viabilidade de Células-tronco Mesenquimais

Utilizaram-se células-tronco mesenquimais (CTM) em passagem 8, isoladas de dentes decíduos humanos (Plataforma Brasil - CAAE número 36.403.514.6.0000.5347). A caracterização por CTM foi aplicada segundo os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006). Dessa forma, as células foram previamente caracterizadas quanto ao formato fibroblastoide, aderência ao polímero, capacidade de diferenciação *in vitro*, marcadores de superfície de CTM e ausência de marcadores de células-tronco hematopoiéticas, da mesma forma que descrito anteriormente (DOS SANTOS *et al.*, 2019; MAURMANN *et al.*, 2017; NICOLA *et al.*, 2019)

As células foram cultivadas em atmosfera contendo 5% de gás carbônico a 37 °C, com meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco, Sigma-Aldrich) de baixa glicose, suplementado com 10% de soro bovino fetal (Laborclin), 2,5

g/L de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES, Sigma-Aldrich), 3,7 g/L bicarbonato de sódio (Neon), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (1% P/S, Sigma-Aldrich). O pH ajustado para 7,2. Após isso, as amostras foram submetidas à 1 hora de luz ultravioleta (UV) na superfície da base e do topo, dentro de capela de fluxo laminar e acondicionados em placas de cultura de 24 poços (TCP-24 Kasvi).

Para o teste de adesão, 40.000 células-tronco por poço em 50 µL de meio de cultura foram pipetadas no centro de cada amostra. Após 3 horas, foi realizado o teste de adesão com dicloridrato de 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI).

Inicialmente, o meio de cultura dos poços foi desprezado e as amostras foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS). As células aderidas foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS e os núcleos das células aderidas nas amostras foram corados com 50 µg/mL de DAPI dissolvidos em tampão fosfato e nova lavagem com PBS (MAURMANN *et al.*, 2017). Foram realizadas nove fotografias em cada uma das quatro amostras por grupo em microscópio de fluorescência (Leica Dmi8, Leica Microsystems) na magnificação de 200x. Os núcleos celulares marcados foram quantificados e os resultados expressos como o número de células por campo.

Para as análises de MEV, as amostras já fixadas para microscopia de fluorescência foram limpas com PBS, após isso, foram desidratadas com 500 µL de gradiente de etanol 25, 40, 55, 70, 85 e 2 x 100% e secas em estufa.

A viabilidade das células foi avaliada por meio do ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium]) indireto e direto.

Para o MTT indireto, foi adicionado 1 mL de meio de cultura suplementado nas amostras e mantido em contato por 24 horas a 37 °C em placa de 24 poços, segundo

a ISO 10993-5:2009(E), item 4.2.3.2a (14:00-17:00, 2009). Para esse teste, 10.000 CT foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e após 24 horas, adicionaram-se 0,2 mL do extrato dos materiais às células. No caso dos controles (positivo e negativo) somente o meio de cultura foi mantido na incubadora. Esse teste avaliou o nível de citotoxicidade do substrato (Ti6Al4V) sem filme e com filme. A viabilidade celular de células-tronco foi realizada entre o período de 1 e 4 dias.

Para o teste de contato direto, as células-tronco (40.000 por poço em 50 µL de meio) foram pipetadas no centro da amostra. Após 1 hora, o volume por poço foi completado para 1 mL de meio de cultivo na placa de 24 poços e transportado para a incubadora. Após 24 horas, foi avaliada a viabilidade celular.

Para os testes de MTT indireto e direto, foram utilizados controle de morte celular com 1% de Triton X-100 em água por 10 minutos (imediatamente antes do MTT) sobre as células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura. O MTT foi utilizado concentração de 0,25 mg/mL em meio de cultura por um tempo de incubação de 3 horas a 37 °C. Foi empregado o volume de 0,2 mL no teste de MTT indireto e 1 mL por poço no teste de MTT direto.

Após as 3 horas, os sobrenadantes dos poços foram descartados e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) nos volumes de 200 µL (MTT indireto) ou 400 µL (MTT direto) e 300 µL lidos em espectrofotômetro Multiskan™ FC (Thermo Scientific – Thermo Fisher Scientific®) em placa de 96 poços e o resultado calculado pela diferença de absorbâncias nos comprimentos de onda de 630 e 570 nm. As células cultivadas em contato com os extratos dos materiais foram fotografadas em microscópio ótico (Leica Dmi8, Leica Microsystems) após 1 e 4 dias. Para a avaliação estatística, foi empregado o teste de análise de variância ANOVA,

com nível de confiança $\alpha = 95\%$, seguida pelo teste post-hoc de Tukey utilizando o programa estatístico e Bioestat 5.0.

5. Resultados e Discussões

5.1. Polimerização e Caracterizações de Superfície

A determinação da espessura do filme na região central da amostra foi realizada através da técnica de elipsometria espectral, onde se avaliou a taxa de deposição em função do tempo, e pode ser observada na Figura 13.

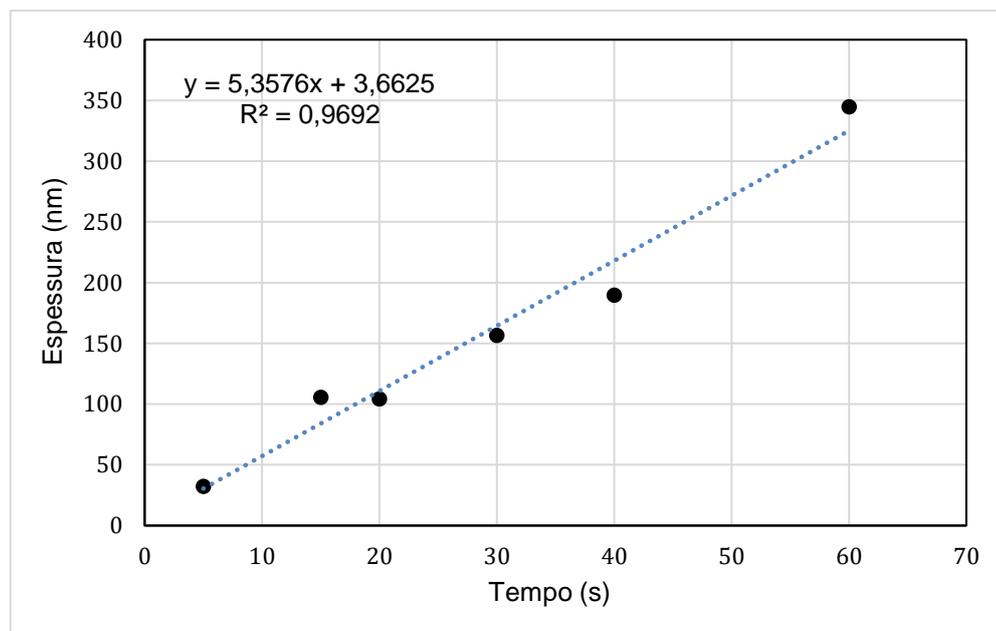


Figura 13: Variação de espessura do filme obtido por polimerização a plasma com variação do tempo de deposição.

A relação entre a espessura e o tempo de deposição se comporta de maneira linear, assim como o apresentado em sistemas com fluxo de precursores (EASTON; JACOB; SHANKS, 2009; GETNET *et al.*, 2021; JACOB *et al.*, 2008). Porém, devido ao uso de um reator, que utiliza um sistema com o precursor dentro da câmara, ocorre

uma rápida deposição nos primeiros segundos de ativação do plasma, atingindo uma espessura de 105 nm, em apenas 15 segundos.

Esta rápida deposição ocorre no início do processo, pois o sistema encontra-se saturado com uma maior quantidade de precursor disponível para a polimerização por plasma. Assim, nos primeiros segundos de ativação do plasma, há uma tendência crescente na espessura do filme formado sob o substrato. Com o passar do tempo, há a fragmentação e rearranjo das moléculas do precursor, seguida da formação do filme, além da ação da bomba de vácuo, que também reduz o volume de óleo essencial no sistema.

Qualitativamente, o aumento na espessura do revestimento pode ser acompanhado através da mudança de coloração do filme na superfície das amostras, conforme mostrado na Figura 14.

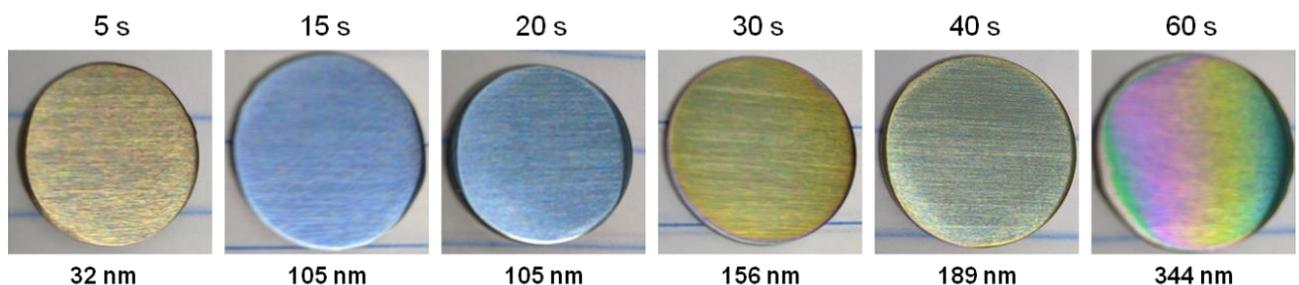


Figura 14: Mudança de coloração na superfície das amostras em relação à espessura do filme.

Devido a fenômenos de interferência óptica, durante toda as faixas de tempo de deposição de plasma analisadas, observar-se uma alteração de cores na superfície. Nesse caso, a espessura de camada interfere na reflexão da onda de luz visível e seu caminho óptico, alterando a cor do filme depositado sobre o substrato metálico (DIAMANTI; DEL CURTO; PEDEFERRI, 2008).

Em todas as caracterizações seguintes foi considerado o filme com 15 segundos de deposição. Isso foi feito para se obter uma maior reprodutibilidade das amostras e ensaios.

A imagem apresentada na Figura 15 obtida por MEV-FEG, em conjunto às análises AFM e Perfilometria Óptica 3D (Figura 16), apresentaram a topografia superficial do substrato e do revestimento. Nota-se que após a aplicação do filme, a superfície apresentou uma topografia suavizada e homogênea em relação ao substrato polido.

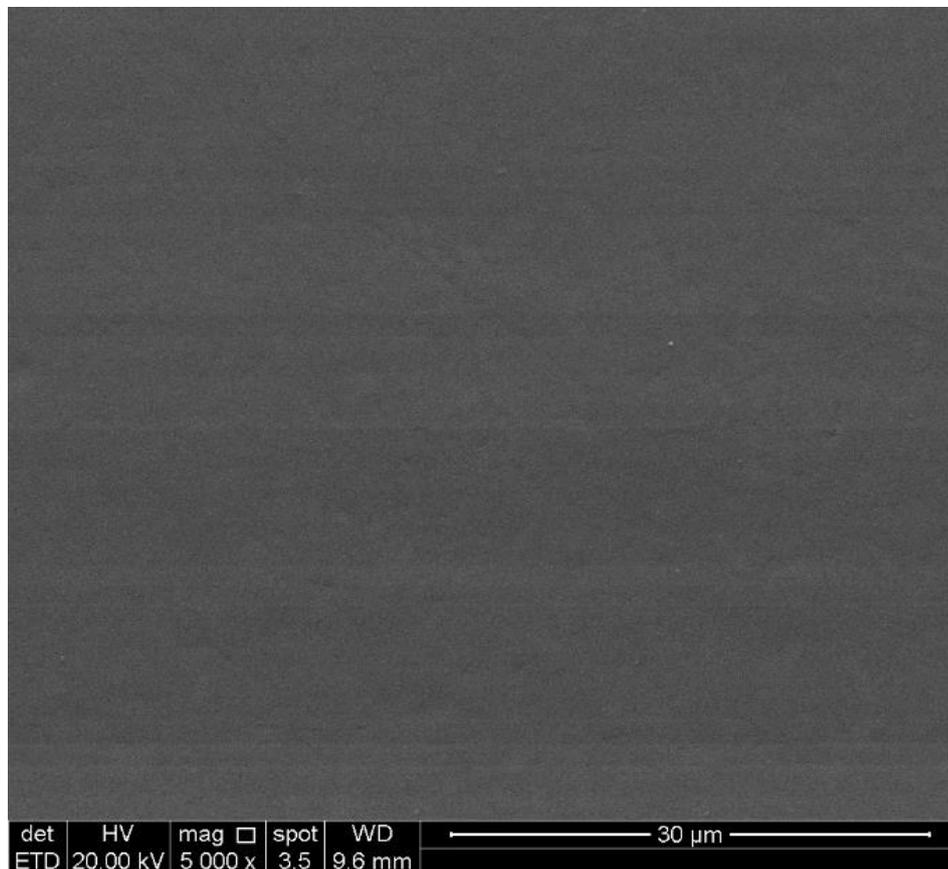


Figura 15: Imagem obtida por MEV-FEG do filme polimerizado por plasma durante 15 segundos.

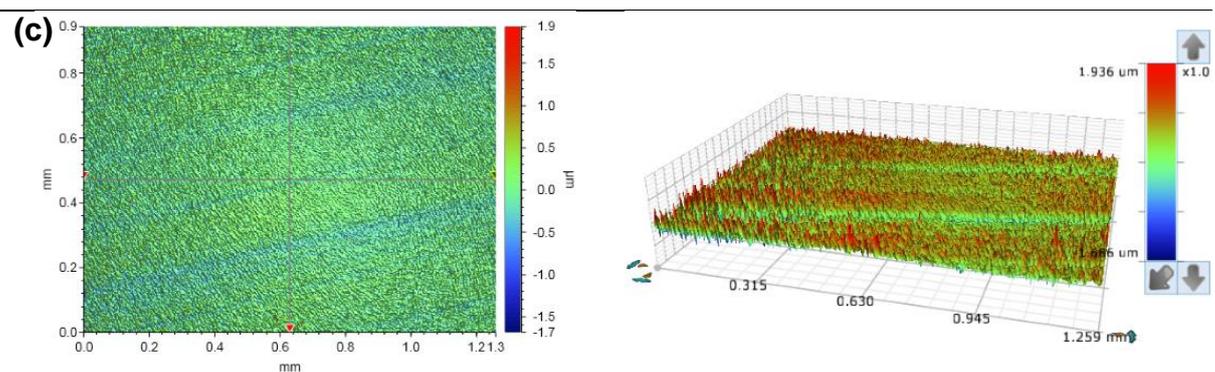
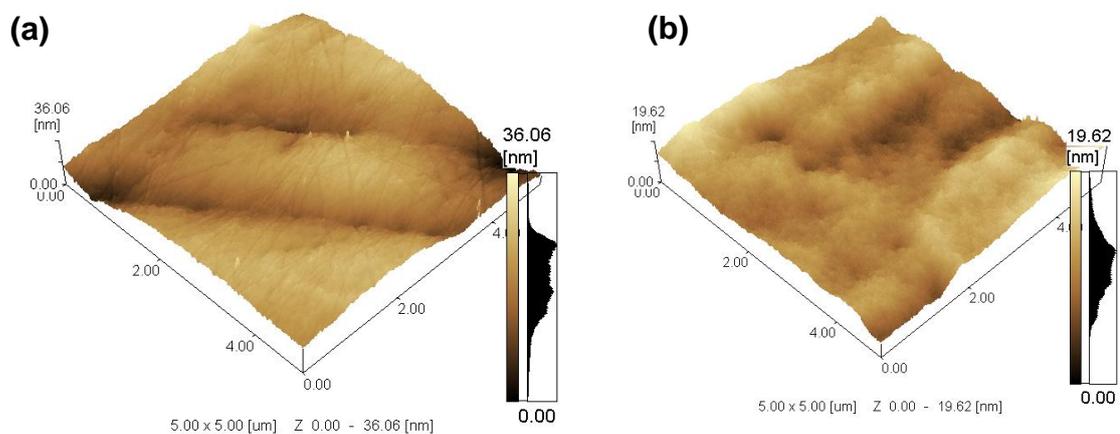


Figura 16: Perfis tridimensionais obtidos por AFM e por Perfilometria Óptica 3D do (a) e (c) substrato Ti6Al4V polido, e (b) e (d) filme derivado do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*.

O ensaio de AFM revelou os parâmetros de rugosidade nanométrica. A Perfilometria Óptica complementa os dados sobre rugosidade na escala micrométrica. Os valores são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de rugosidade obtidos por Microscopia de Força Atômica (AFM) e Perfilometria Óptica 3D.

	AFM		Perfilometria Óptica 3D			
Rugosidade	R _a (nm)	R _z (nm)	R _a (μm)	R _z (μm)	R _{sk}	R _{kur}
Ti6Al4V	5,00 ± 1,00	17,00 ± 2,00	0,17 ± 0,03	2,00 ± 0,03	-0,3	5
Filme Polimérico	2,00 ± 0,80	20,00 ± 0,70	0,20 ± 0,02	4,00 ± 0,70	-0,5	4

Como a topografia de uma superfície influencia diretamente a adesão de organismos (AMMAR *et al.*, 2015b), é consolidado que estruturas de pico e vale, com escalas micrométricas e nanométricas, afetem a fixação, proliferação e diferenciação dos vários tipos de células (AMMAR *et al.*, 2015b; KUMAR; ROY; DEY, 2021). Superfícies mais rugosas oferecem maior área de contato disponível para fixação, proteção contra forças de cisalhamento e alterações químicas que causam interações físico-químicas fortes com a superfície (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Estudos demonstraram que células de alguns patógenos humanos possuem preferência em se desenvolver nas trincheiras de superfícies rugosas de titânio, como em defeitos e marcas de lixa, onde as áreas típicas das ranhuras são equivalentes ao dos micro-organismos (AMMAR *et al.*, 2015b; BAZAKA; CRAWFORD; IVANOVA, 2011; DÍAZ *et al.*, 2007), enquanto em superfícies menos rugosas não há tantos pontos de fixação, dificultando a adesão celular das bactérias (AL-JUMAILI; BAZAKA; JACOB, 2017; BAZAKA *et al.*, 2020; DÍAZ *et al.*, 2007). Por outro lado, é conhecido que superfícies mais rugosas favorecem a integração com o osso, através do processo de osseointegração, interação que é de grande interesse para a aplicação de biomateriais metálicos (ALLA *et al.*, 2011; ANSELME; PONCHE; BIGERELLE, 2010).

É importante investigar os parâmetros de rugosidade para compreender a natureza da adesão entre células e a superfície. Entre eles temos a rugosidade média

(R_a), e a rugosidade média dos cinco valores de rugosidade parcial (R_z), além disso, outros dois parâmetros também foram avaliados, a assimetria R_{skw} e curtose R_{kur} , que auxiliam no entendimento das estruturas superficiais estudadas (Tabela 1). O R_{skw} fornece uma medida de simetria da distribuição de altura, perfis com valores positivos de R_{skw} tendem a ter picos altos e "afiados", com vales mais rasos e amplos, enquanto valores negativos indicam pequenos picos com vales profundos e estreitos (CRAWFORD *et al.*, 2012). A distribuição de curtose R_{kur} é uma medida da função de densidade e probabilidade do perfil de altura dos picos. Uma superfície com distribuição mais central tem um valor de R_{kur} maior que 3, enquanto uma superfície com distribuição mais espalhada possui um valor de R_{kur} inferior a 3 (CRAWFORD *et al.*, 2012; IVANOVA *et al.*, 2010).

Analisando a Tabela 1, o valor negativo de R_{skw} , do substrato e da amostra funcionalizada, indicam a existência de uma assimetria negativa, com os vales maiores que os picos. Por apresentar um valor próximo à zero, há o indicativo de que a distribuição de altura é mais uniforme, com um número próximo de picos e vales (BAZAKA *et al.*, 2011b). Valores maiores que 3 de R_{kur} demonstram uma maior distribuição dos picos de forma ordenada (IVANOVA *et al.*, 2010), assim como observado por Perfilometria Óptica na Figura 16.

Além disso, o substrato da liga de titânio polida apresentou valores de R_a micrométrico e nanométrico de 0,15 μm e 4 nm respectivamente. Esses valores são menores que os evidenciados anteriormente para amostras de titânio, preparadas por polimento mecânico em ambas as escalas (BEZUIDENHOUT *et al.*, 2020; TRUONG *et al.*, 2009; YAN; CHIBOWSKI; SZCZEŚ, 2017). Medilanski *et al.* (2002), relataram uma adesão bacteriana mínima em superfícies de aço inoxidável com rugosidades na escala

submicrométrica ($R_a = 0,16 \mu\text{m}$), enquanto em superfícies mais ásperas ($R_a = 0,90 \mu\text{m}$) a adesão bacteriana ocorreu preferencialmente ao longo dos sulcos submicrométricos.

Após a deposição do filme, mais de um comportamento pode ser observado em relação a rugosidade da superfície. Revestimentos finos aplicados em superfícies lisas de vidro apresentam comportamento semelhantes (CHAN *et al.*, 2016; KUMAR *et al.*, 2020; ROMO-RICO *et al.*, 2022), como o observado nesse trabalho, diminuindo os valores de rugosidade nanométrica média ($R_a = 2 \text{ nm}$) da superfície em relação ao substrato ($R_a = 4 \text{ nm}$). Na escala de rugosidade micrométrica não houve diferença significativa nos valores de R_a .

Porém, a funcionalização por plasma do óleo essencial de eucalipto demonstrou um aumento da rugosidade nos parâmetros R_z em ambas as escalas. Esse comportamento foi relatado por Bazaka *et al.* (BAZAKA *et al.*, 2020). Esses autores observaram um aumento da rugosidade média R_a e R_z após a deposição do filme fino em superfícies de titânio polido mecanicamente. Para esses casos, foi sugerido que pode ocorrer uma diferença em como os blocos de construção do polímero se difundem e se depositam nas superfícies de substratos de titânio, em alguns casos favorecendo o acúmulo de material nos picos. Além disso, substratos de titânio são mais eletricamente condutores que os substratos de vidro. Essa diferença pode afetar a distribuição dos blocos de deposição do polímero na superfície.

Pode-se relacionar a adesão bacteriana em superfícies com escalas de rugosidade distintas. A rugosidade em nanoescala apresenta uma melhor resposta antiaderente (ALAM; BALANI, 2017; BAZAKA *et al.*, 2020; ÇAKMAK *et al.*, 2019; LU *et al.*, 2020; SEDDIKI *et al.*, 2014; TRUONG *et al.*, 2010), enquanto valores maiores da rugosidade em microescala promovem a adesão bacteriana (ALMAGUER-FLORES; RODIL, 2010; SANTHOSH KUMAR *et al.*, 2019; WASSMANN *et al.*, 2017). Porém,

principalmente em superfícies lisas, a adesão dos micro-organismos também depende de outras propriedades do material, como o ângulo de contato e propriedades físico-químicas (YANG *et al.*, 2022).

Os ângulos de contato das gotas de água nas superfícies de titânio e do filme fino são apresentados na Figura 17.

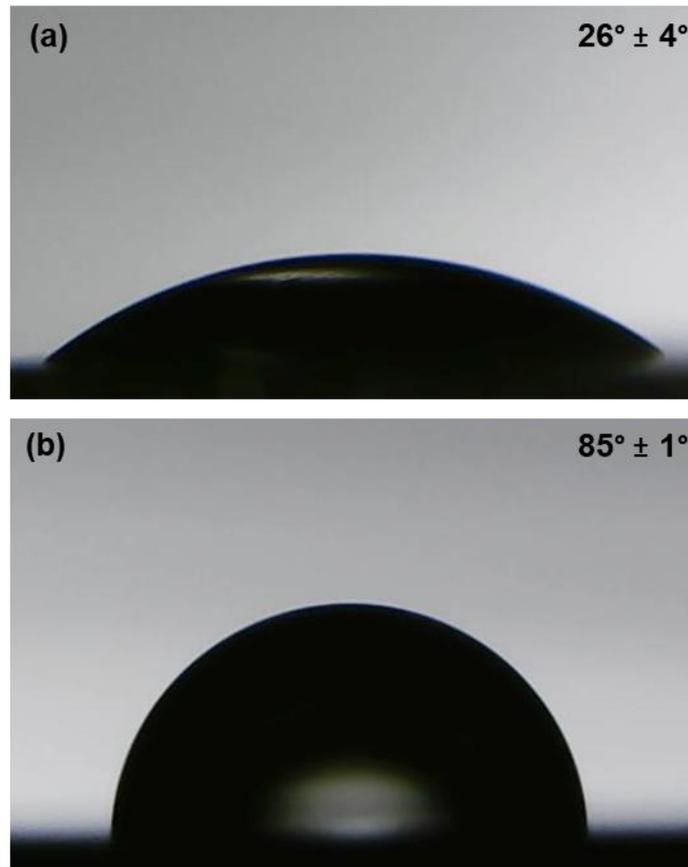


Figura 17: Molhabilidade obtida através da medição do ângulo de contato da gota de água.

(a): Substrato Ti6Al4V; (b): Amostra funcionalizada com filme polimérico (15 s).

A aplicação do revestimento polimérico resultou em um aumento significativo na hidrofobicidade da superfície do substrato metálico, com o ângulo de contato com a água aumentando de $26^\circ \pm 4^\circ$, para $85^\circ \pm 1^\circ$. Esses valores indicam que a natureza apolar das moléculas do polímero formado a partir do óleo essencial favorece a formação de uma superfície mais hidrofóbica em comparação ao substrato polido.

Porém, o revestimento ainda apresenta um comportamento moderadamente molhável e não um caráter hidrofóbico (molhabilidade $> 90^\circ$) (JIANG *et al.*, 2017).

A polimerização a plasma frio do 1,8-cineol isolado foi realizada por Pegalajar-jurado *et al.* (2014), em um reator do tipo de eletrodos paralelos externos. Com 20 W de potência os filmes apresentaram valores moderadamente hidrofóbicos, com ângulo de contato de aproximadamente 80° , que proporcionaram uma atividade antibacteriana com a capacidade de reduzir a adesão de células de *E. coli* e *S. aureus* em 98% e 64% respectivamente, em comparação com o branco. No mesmo caminho, Mann e Fisher (2017), apresentaram o efeito de diminuição da cobertura superficial do biofilme em 35% para *E. coli* e 45% para *S. aureus*, demonstrando que a cobertura do biofilme pode estar relacionada com a hidrofobicidade dos revestimentos, uma vez que, os filmes com ângulo de contato de $85,6^\circ$ obtiveram resultados promissores de atividade antibacteriana.

5.2. Caracterizações Químicas

A Figura 18 mostra a sobreposição dos espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e para o filme precursor formado via polimerização a plasma. É possível notar, em ambos os espectros, estiramentos simétricos e assimétricos característicos das ligações C-H dos alcanos entre valores de $3000 - 2850 \text{ cm}^{-1}$. Também se detectaram os picos em 1465 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} , característicos da deformação angular das ligações $\delta\text{C-H}_2$ e $\delta\text{C-H}_3$, respectivamente. Todos esses picos estão presentes no óleo essencial e foram conservados após a formação do filme polimérico, conforme demonstrado em ambos os espectros (Figura 18). A larga banda entre $3600-3200 \text{ cm}^{-1}$, presente no espectro do filme polimérico, é característica de grupos alcoólicos e está relacionada com os

estiramentos (ν) das ligações O-H (hidroxila) com pontes de hidrogênio. Em aproximadamente 1709 cm^{-1} , o pico típico dos estiramentos (ν) das ligações C=O das carbonilas é observado com uma intensidade média. Ambos os picos desses compostos oxigenados são inexistentes no espectro do óleo essencial (BARANSKA *et al.*, 2006).

O desenvolvimento dos grupos funcionais hidroxila e carbonila podem estar relacionados à oxidação das espécies químicas formadas no filme. Esses grupos podem ter se formado ao entrarem em contato com o ar atmosférico após a deposição (GERCHMAN *et al.*, 2019). Conforme observado na Figura 18, foi detectado no espectro do óleo essencial de eucalipto o pico típico atribuído ao estiramento do grupo funcional dos éteres em 1082 cm^{-1} , não sendo detectado na amostra funcionalizada. Assim, a formação desses grupos funcionais oxigenados no filme polimérico também pode estar associada à quebra da ligação C-O-C (éter), ligados em ponte, característicos da molécula do 1,8-cineol, seguida pela recombinação dos radicais livres, formados no plasma, em outros grupos oxigenados como álcoois ($3600 - 3200\text{ cm}^{-1}$) e carbonilas (1709 cm^{-1}) (EASTON; JACOB; SHANKS, 2009).

Easton *et al.* (2009), relataram o mesmo comportamento em seus estudos, e ainda destacaram que como os grupos carbonila estão presentes no polímero, o caminho de reação é favorável, devido a tendência das ligações carbono-carbono se tornarem insaturadas pelo tratamento com plasma. Quando comparado ao precursor, o espectro de FTIR do filme produzido via polimerização à plasma apresenta bandas em menor quantidade e menos definidas, indicando uma diminuição na homogeneidade das ligações orgânicas, que pode estar associada à natureza típica das ligações cruzadas aleatórias dos polímeros de plasma (SAKTHI KUMAR *et al.*, 2003).

A presença de grupos funcionais afeta a hidrofiliicidade e lipofiliicidade do filme. Essas características interferem na solubilidade em soluções aquosas e no número de interações que esses grupos funcionais terão com as células bacterianas. A lipofiliicidade permite que as moléculas se transportem através da membrana bacteriana e, em seguida, causem interações intracelulares com as biomoléculas (MANN; FISHER, 2017). Os picos de maior relevância, encontrados nos espectros, estão descritos na Tabela 2.

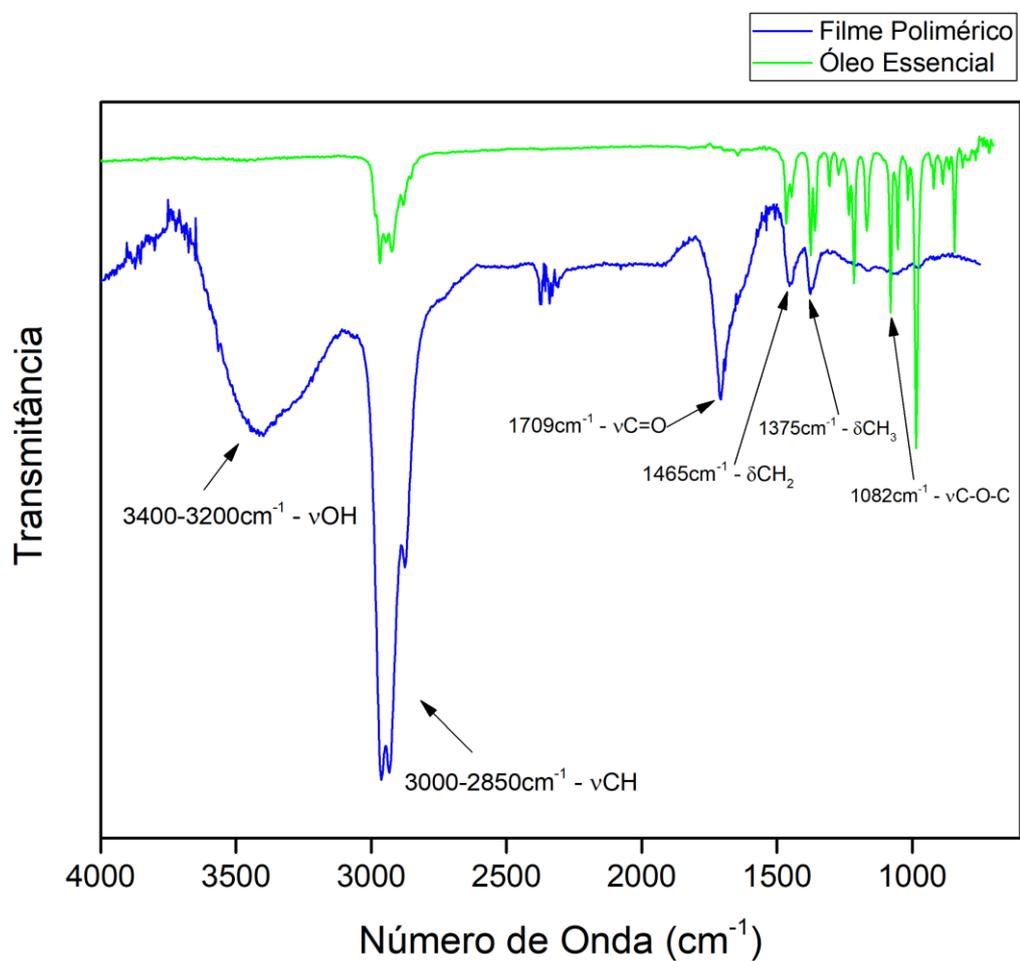


Figura 18: Sobreposição dos espectros de FTIR do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (verde) e filme polimérico (azul) formado via polimerização à plasma.

Tabela 2: Atribuições dos picos para espectros de FTIR óleo essencial de eucalipto e polímero formado por plasma. Modos vibracionais: v_a = alongamento assimétrico, v_s = alongamento simétrico, v = alongamento, δ_a = deformação assimétrica, δ_s = deformação simétrica.

<i>Número de Onda</i> (cm^{-1})	<i>Intensidade</i> <i>Relativa</i>	<i>Atribuição</i>
Óleo Essencial		
~3435 (larga)	Fraca	$v(O-H)$
~2966, ~2945, ~2923	Média	$v_a(C-H)$
~ 2877	Fraca	$v_s(C-H)$
~2859	Fraca	$v_s(C-H)$
1464 e 1446	Média	$\delta(C-H)$
1370	Média	$\delta_s(C-H)$
1359	Média	$\delta(C-H)$
1306	Fraca	$v(C-C)$
1270	Fraca	$v(C-C)$
1232	Média	$v(C-C)$
1214	Forte	$v(C-C)$
1167	Média	$v(C-O)$
1081	Forte	$\delta(C-H)$
1052	Média	$\delta(C-H)$
1015, 984, 918, 887, 869, 846, 812	Fraca até Forte	Deformações C-H
Filme Polimérico		
~3432 (larga)	Média	$v(O-H)$
2956 e 2922	Forte	$v_a(C-H)$
2871	Média	$v_s(C-H)$
1705	Fraca	$v(C=O)$
1455	Fraca	$\delta_a(C-H)$
1372	Fraca	$\delta_s(C-H)$
974	Fraca	Deformações C-H

Devido à conhecida capacidade da espectroscopia Raman em caracterizar materiais a base de carbono e alguns óxidos metálicos (BARANSKA *et al.*, 2005), realizou-se essa análise nas amostras nos filmes produzidos via polimerização a plasma do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (Figura 19).

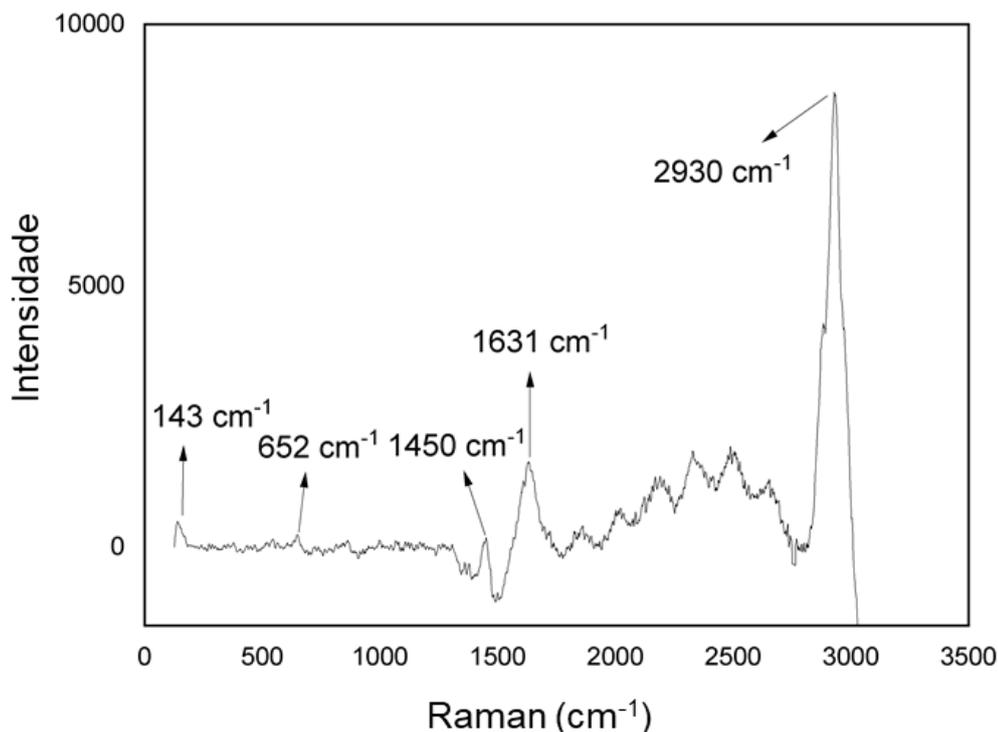


Figura 19: Espectro RAMAN do filme formado via polimerização a plasma do óleo essencial de eucalipto.

Os processos químicos e físicos que envolvem substratos metálicos estão suscetíveis à formação de óxidos devido à natureza oxidativa desses materiais. O TiO_2 se forma em três principais estruturas cristalinas, rutilo, anatase e brookita, e conforme o pico observado com baixa intensidade em 143 cm^{-1} , pode estar relacionado à formação de um óxido de titânio no substrato (ANTONINI, 2012; VOJTĚCH *et al.*, 2010).

Em 652 cm^{-1} e em 1450 cm^{-1} encontram-se os picos atribuídos as fortes vibrações do anel formado por carbonos sp^3 , característico do 1,8-cineol e outros compostos da classe dos terpenos. Sua baixa intensidade pode estar relacionada à quebra das ligações sp^3 devido à tensão aplicada no plasma no momento da formação do filme (DAFERERA; TARANTILIS; POLISSIOU, 2002; VARGAS JENTZSCH; CIOBOTĂ, 2014).

Em aproximadamente 1631 cm^{-1} está localizado o pico que pode ser atribuído aos estiramentos do tipo $\text{C}=\text{C}$ (SCHULZ *et al.*, 2002). Tais ligações podem ser

provenientes dos compostos secundários, presentes no óleo essencial, como o α -pineno, ou de novas ligações formadas pela fragmentação aleatória das espécies químicas e suas respectivas recombinações, causadas pela polimerização por plasma.

Bandas intensas comuns em compostos orgânicos estão presentes entre 2800 a 3000 cm^{-1} , e estão relacionadas aos estiramentos simétricos e assimétricos das ligações C-H (BAZAKA *et al.*, 2010).

Visando compreender a origem dos grupos funcionais formados nos filmes de polimerização por plasma, foram obtidos os espectros de massa da fragmentação das espécies gasosas, que estão presentes no óleo essencial de eucalipto. Os espectros resultantes podem ser utilizados para quantificar a fragmentação das espécies de monômeros originais que ocorrem através do processo de plasma. Calcula-se a diferença entre espécies com uma massa maior e íons com menor massa (m/z). Para este estudo, foi considerado o componente majoritário 1,8-cineol (com 154 m/z) (Figura 20), correspondendo ao pico do íon molecular do precursor ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}^+$). Segundo Bazaka *et al.*, 2020, em potências superiores a 25 W, frações de íons não fragmentados dos terpenos, dentro da fase gasosa do plasma, permanecem significativas. É provável que ocorra o subsequente aprisionamento deste monômero não fragmentado dentro da rede polimérica na superfície metálica (BAZAKA *et al.*, 2020).

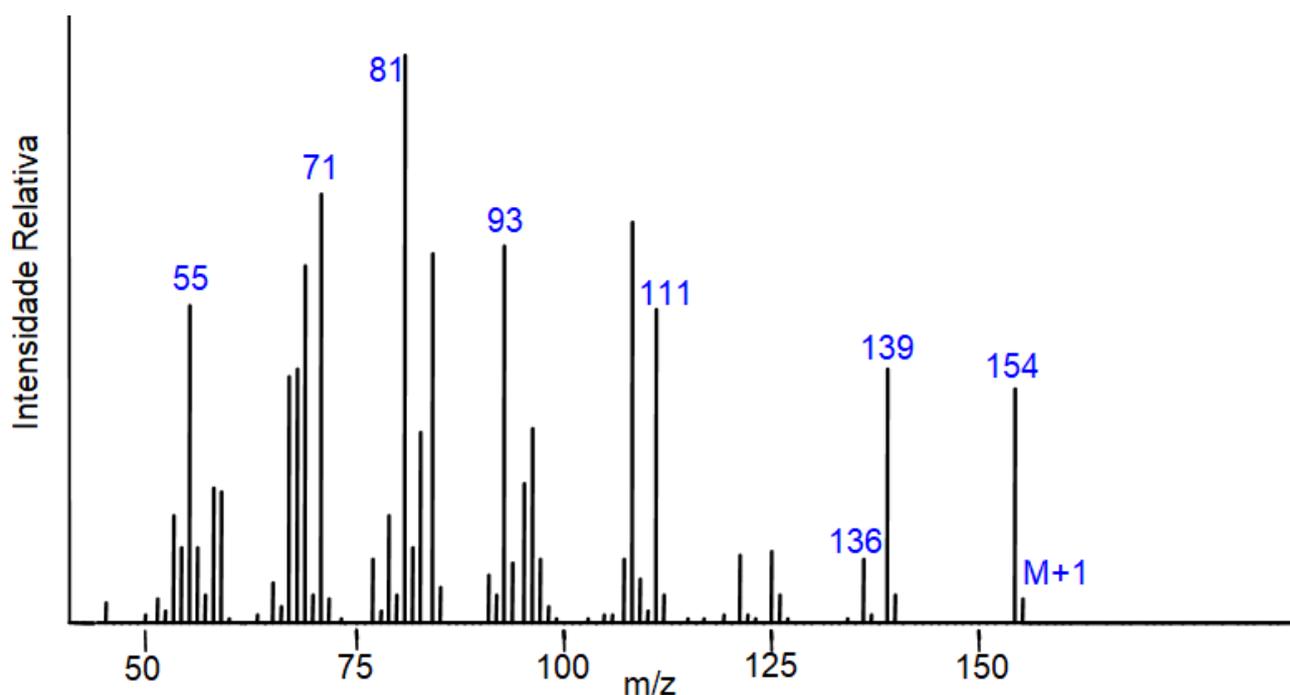


Figura 20: Espectro de massas do 1,8-cineol (eucaliptol) obtido por CG/MS do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*.

Observando a Figura 20, as fragmentações resultam na evolução da água ($18 \text{ m/z H}_2\text{O}^+$) e radicais hidroxila (17 m/z OH^+). A oxidação química por radicais -OH é a principal via de remoção em alcanos e compostos aromáticos alquilados da atmosfera (AHMAD *et al.*, 2015). Sendo assim, os seguintes fragmentos se formam através das fragmentações e rearranjos sem H_2O^+ (18 m/z): $\text{C}_{10}\text{H}_{16}^+$ (136 m/z), $\text{C}_9\text{H}_{13}^+$ (121 m/z), C_7H_9^+ (93 m/z), C_6H_9^+ (81 m/z), C_4H_7^+ (55 m/z). Além disso, espécies de radicais oxigenados são gerados a partir da fragmentação no regime de plasma, sendo as principais: $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}^+$ (139 m/z), $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{O}^+$ (111 m/z), $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}^+$ (96 m/z) e $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}^+$ (71 m/z). Como consequência da complexidade e natureza dinâmica dos processos de plasma, torna-se um desafio esclarecer todos os mecanismos de fragmentação e compostos gerados, visto que, é provável que ocorram diversas reações secundárias, como ciclização, transferência de grupos funcionais e rearranjos (MANOLACHE *et al.*, 1997).

A partir da espectrometria de massas, é possível assegurar que o 1,8-cineol, componente majoritário do óleo essencial, possui um baixo grau de ionização nessas

condições de plasma. Assim, é provável que o grau de reticulação do polímero também seja relativamente baixo (THIRY *et al.*, 2016). Isso permitirá a penetração de líquidos no polímero formado e facilitará a lixiviação dessas espécies aprisionadas no filme (KUMAR, A. *et al.*, 2018). Alguns autores (AL-JUMAILI *et al.*, 2019; AL-JUMAILI; BAZAKA; JACOB, 2017; SOUSA *et al.*, 2016) sugerem que esse mecanismo de lixiviação do precursor aprisionado induz a atividade antibacteriana de filmes produzidos via polimerização a plasma de metabólitos secundários de plantas.

Além do 1,8-cineol, outros compostos foram detectados por espectrometria de massas do óleo essencial, dentre eles estão presentes em sua composição química o α -pineno, β -pineno e α -terpineol. Todos esses compostos em menor concentração também sofrem os efeitos da polimerização por plasma, portanto, podem realizar diferentes interações celulares com os micro-organismos, contribuindo assim para a eficácia do revestimento na ação antibacteriana (ELAISSI *et al.*, 2011; LORCA *et al.*, 2012; SONBOLI; BABAKHANI; MEHRABIAN, 2006; VALENTE *et al.*, 2018).

5.3. Influências da Esterilização no Polímero por Plasma

Na Figura 21 é apresentado o aspecto morfológico e visual das amostras após os processos de esterilização por autoclave, plasma de ar, óxido de etileno e radiação UV-C.

Nota-se que os processos de autoclave e plasma de ar alteraram morfológicamente a estrutura do filme, causando defeitos em sua estrutura. No método de autoclave (Figura 21 (a)) observou-se a maior deterioração do revestimento formado. Nele é possível visualizar a fragmentação do polímero, além de diversos danos em sua topografia, detectado pelas imagens de AFM, indicados em vermelho na Figura 21 (a). No método por plasma de ar (Figura 21 (b)), alguns defeitos topográficos

também são identificados, além de uma mudança gradual da coloração do revestimento. Isso indica a perda de espessura de camada, conforme discutido no item 5.1. Apesar da microscopia óptica, após a esterilização por óxido de etileno (Figura 21 (c)), não ter demonstrado alterações na coloração do filme, detectaram-se profundas craterações no filme, conforme evidenciado pela análise de AFM. Outros estudos também demonstraram que esses processos de esterilização podem degradar morfologicamente diferentes revestimentos (BALDIN *et al.*, 2018, 2019), como também interferir nas propriedades físico-químicas e morfológicas da liga Ti6Al4V (PEREIRA *et al.*, 2021).

A microscopia óptica, para o processo de esterilização por radiação ultravioleta (UV-C), apresentado na Figura 21 (d), também detectou defeitos superficiais no filme formado. Porém, conforme demonstrado pela análise de AFM, o filme manteve-se íntegro após o procedimento.

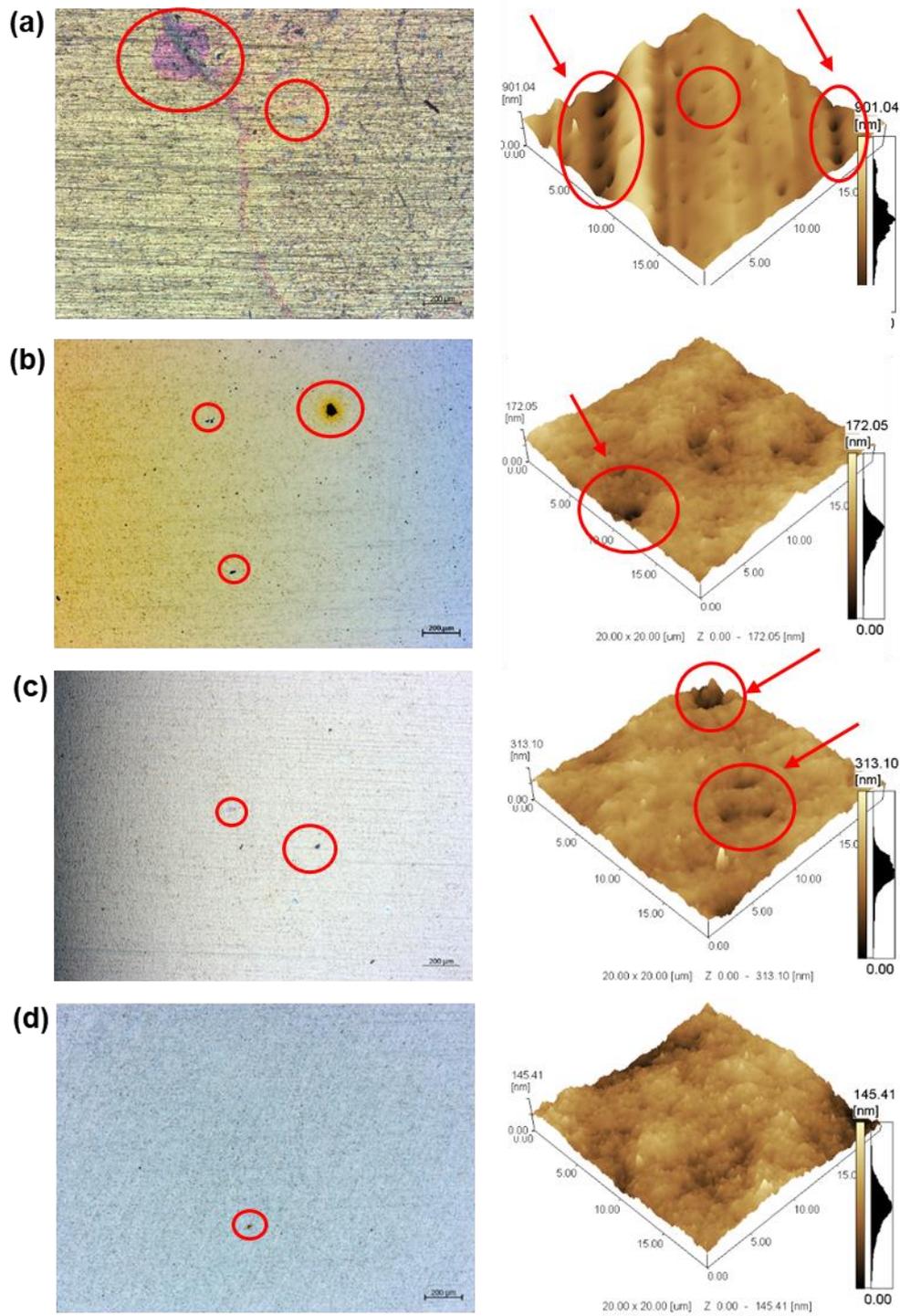


Figura 21: Aspecto visual topográfico do filme polimérico obtidos por Microscopia Óptica e AFM após esterilização por: (a) autoclave, (b) plasma de ar, (c) óxido de etileno (ETO) e (d) radiação ultravioleta (UV-C).

Visando complementar o entendimento do efeito das esterilizações, na Figura 22 é apresentado o espectro FTIR do revestimento após o processo de esterilização propostos.

Devido à grande deterioração do filme causada pelo processo de autoclave, não foi possível detectar qualquer pico ou banda de FTIR para as amostras que passaram por essa esterilização.

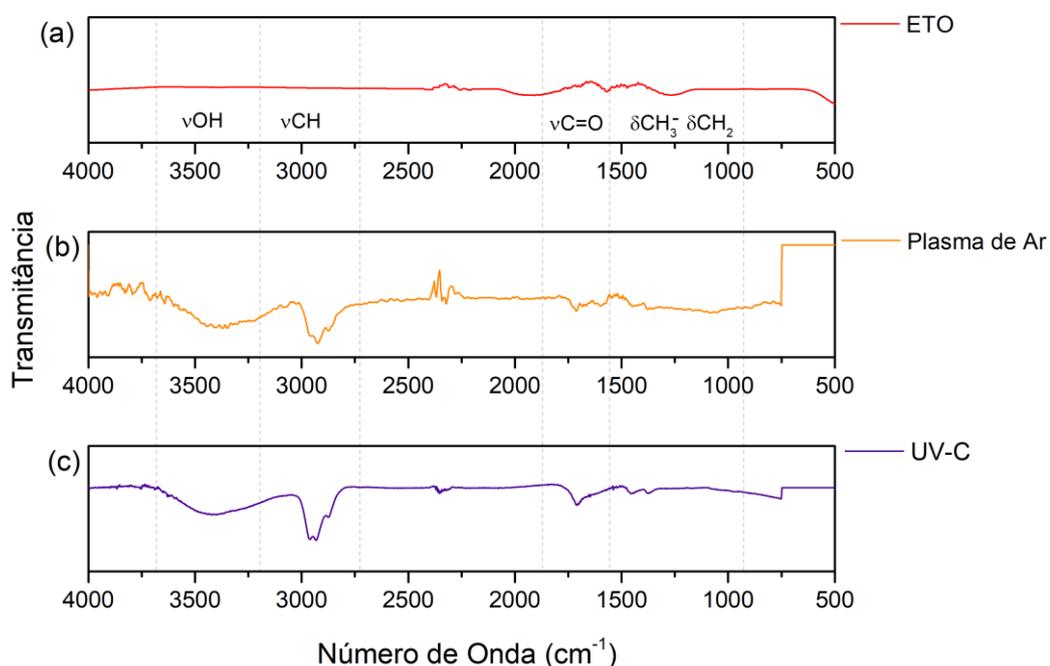


Figura 22: Espectros de FTIR do filme polimérico após esterilização por (a) óxido de etileno (ETO), (b) plasma de ar e (c) radiação ultravioleta (UV-C).

Analisando o espectro presente na Figura 22, é possível observar que o método de esterilização por radiação ultravioleta e plasma de ar não alteraram quimicamente o filme produzido via plasma (Figura 18), pois não há formação de novos grupos funcionais, nem mesmo alteração das bandas já presentes no filme, conforme discutido anteriormente no item 5.2. Artemenko *et. al* (2012), reportaram que filmes de politetrafluoretileno, produzidos via plasma, mantiveram suas características químicas após a esterilização por UV-C. Observando a Figura 22 (a), no espectro referente a

esterilização com ETO, fica claro que esse processo de esterilização causou alterações químicas no revestimento, visto que as bandas referentes aos grupos funcionais oxigenados (O-H e C=O) e as ligações características C-H não foram detectadas. Esse comportamento pode ter ocorrido devido à alta reatividade do óxido de etileno (MENDES; BRANDÃO; SILVA, 2007), que aliada ao aumento da temperatura causada pelo processo de esterilização, degradou quimicamente a estrutura polimérica formada na polimerização.

Apesar de ter conservado as características químicas do filme polimérico, a grande deterioração morfológica detectada pela análise AFM (Figura 21 (b)), no revestimento esterilizado por plasma de ar, foi um fator de exclusão desse método de esterilização nas análises posteriores.

5.4. Análise da Atividade Antibacteriana do Revestimento

Após a esterilização das amostras por ETO e UV-C, a atividade antibacteriana por Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL⁻¹) foi avaliada contra a espécie do tipo Gram-positiva *S. aureus*, durante 24 horas, e pode ser visualizada na Figura 23.

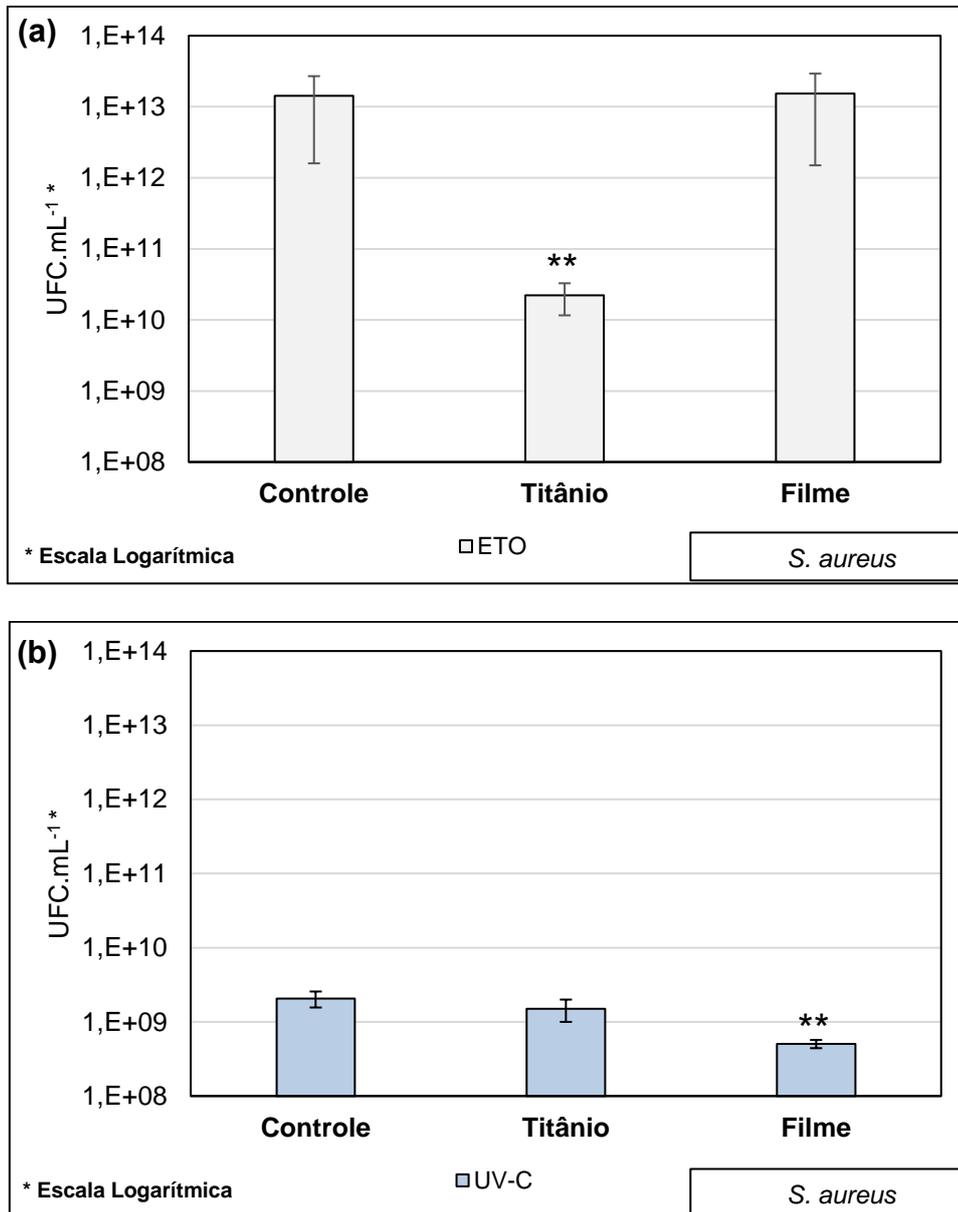


Figura 23: Unidades Formadoras de Colônias/mL em superfícies do substrato Ti6Al4V polido e com a deposição do filme polimérico, para *S. aureus*. (a) Esterilização por ETO; (b) Esterilização por UV-C. ** indica resultados com $p < 0,01$ em relação aos demais grupos experimentais por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Nas amostras que passaram pela esterilização com óxido de etileno (Figura 23 (a)), ocorreu o aumento da proliferação das bactérias na superfície revestida. Assim, não foi apresentado efeito de inibição do crescimento da *S. aureus* em comparação ao substrato, que passou pelo mesmo processo de esterilização. A análise ANOVA também confirmou a diferença estatística entre o filme e a liga de titânio ($P_{\text{value}} = 0,025 < \alpha = 0,05$). No entanto, conforme demonstrado pelo teste de Tukey, as amostras revestidas com o filme polimérico, esterilizadas por óxido de etileno, apresentaram aproximadamente 10^3 vezes mais unidades formadoras de colônia (UFC.mL⁻¹) que o substrato metálico. Esse comportamento pode estar associado à degradação química do filme, ocorrida na esterilização por ETO, evidenciada por FTIR na Figura 22 (a). Isso levou a contagem de UFC.mL⁻¹ no filme a patamares similares ao do controle.

O inverso ocorreu nas amostras esterilizadas por UV-C (Figura 23 (b)), onde o revestimento de óleo essencial de eucalipto diminuiu o número de células viáveis de *S. aureus* em comparação com o substrato metálico, inibindo a adesão de células bacterianas, e limitando a formação do biofilme. A significância estatística desses resultados foi confirmada pela análise ANOVA ($P_{\text{value}} = 0,010 < \alpha = 0,05$). O teste Tukey demonstrou diferença significativa entre o filme e os demais grupos estudados.

As amostras esterilizadas por UV-C apresentaram aproximadamente 10 vezes menos unidades formadoras de colônia que o substrato metálico e o controle. Conforme apresentado na Figura 22 (c), ocorreu à conservação dos grupos funcionais oxigenados após esse processo de esterilização. Assim, a diminuição das UFC.mL⁻¹, registradas nas amostras funcionalizadas e esterilizadas por UV-C, indicam que esses grupos funcionais oxigenados contribuíram no efeito antibacteriano para a espécie Gram-positiva *S. aureus* através da ação química, visto que, as morfologias das superfícies

funcionalizadas se mantiveram após ambos os processos de esterilização, conforme a Figura 21 (c) e (d).

Como somente a esterilização por radiação ultravioleta (UV-C) não apresentou alterações significativas na estrutura do revestimento (Figura 21 (d)), na sua composição química (Figura 22 (c)), e manteve a capacidade antibacteriana para a espécie *S. aureus*, os ensaios a seguir foram realizados seguindo somente o protocolo de esterilização por radiação UV-C.

Buscando um maior entendimento das propriedades antibacterianas do filme formado via plasma, ensaios da atividade antibacteriana por Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL⁻¹), para a espécie gram-negativa *E. coli*, também foi avaliada (Figura 24). A análise ANOVA detectou diferença estatisticamente significativa na capacidade de inibição do biofilme para *E. coli* entre os grupos analisados ($P_{\text{value}} = 0,01 < \alpha = 0,05$). No entanto, essa diferença foi detectada devido à grande variação na contagem bacteriana entre o controle, titânio e amostras metálicas com filme. Ou seja, essa espécie de bactéria, o filme não demonstrou atividade antibacteriana em relação ao substrato metálico.

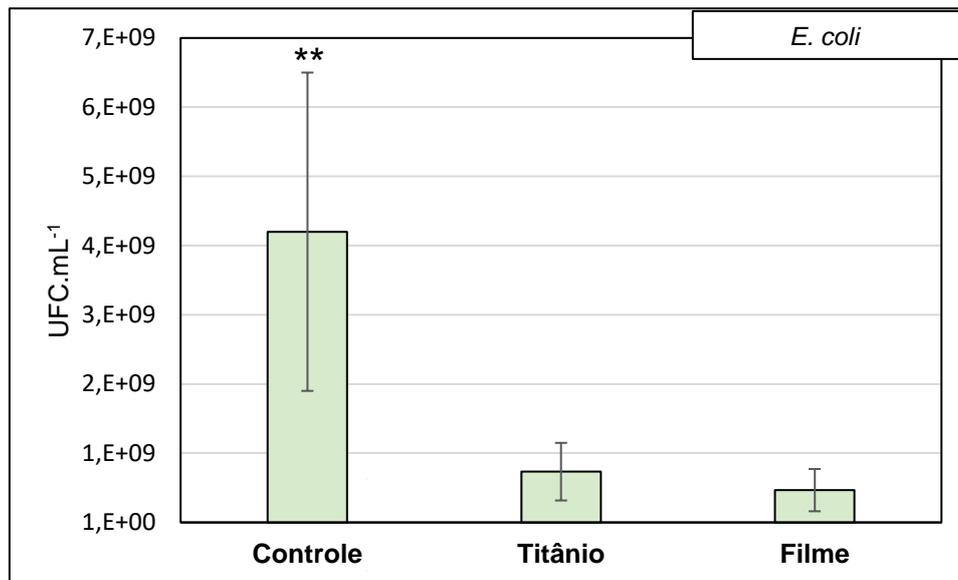


Figura 24: Unidades Formadoras de Colônias/mL em superfícies do substrato Ti6Al4V polido e com a deposição do filme polimérico, para *E. coli*. ** indica resultados com $p < 0,01$ em relação aos demais grupos experimentais por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Esses resultados sugerem que para avaliar a atividade antibacteriana de um revestimento aplicado sobre a superfície de um biomaterial, é importante analisar uma combinação de fatores, considerando a soma de propriedades do revestimento e substrato. Em superfícies metálicas, a complexidade da topografia da superfície do substrato, em escalas micro e nanométrica, podem interferir na maneira que ocorre a deposição das espécies reativas do precursor, influenciando na composição química e na atividade biológica do revestimento (BAZAKA *et al.*, 2020). As características topográficas do filme formado podem aumentar ou diminuir a atividade antibacteriana, devido à lixiviação de compostos bioativos, que são influenciados pela espessura do revestimento (MANN; FISHER, 2017).

As atividades antimicrobianas dos componentes do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, em sua forma líquida, foram comprovadas em espécies de bactérias Gram-positivo (AL-JUMAILI *et al.*, 2019; CIMANGA *et al.*, 2002; DAMJANOVIĆ-

VRATNICA *et al.*, 2011; LORCA *et al.*, 2012). Além disso, seu terpeno majoritário (1,8-cineol) apresenta um éter cíclico em sua estrutura (JIANG *et al.*, 2017). Estudos anteriores relataram que a presença desse grupo funcional, em uma superfície, tem a capacidade de inibir a formação de biofilmes (AL-JUMAILI *et al.*, 2019).

Conforme discutido anteriormente, durante a polimerização por plasma, algumas moléculas de terpenos do óleo essencial são fragmentadas e modificadas, formando novos grupos funcionais reativos, enquanto outras moléculas têm sua estrutura parcialmente preservada. Essas espécies se depositam no substrato de Ti6Al4V, onde formam redes poliméricas, que funcionalizam a superfície. Alguns desses compostos se aprisionam fisicamente ao revestimento de acordo com grau de reticulação do filme formado (AMMAR *et al.*, 2015b; BAZAKA *et al.*, 2020).

As membranas plasmáticas que envolvem células procariontes, como das bactérias, são formadas por fosfolípidios. Essas estruturas consistem em uma cabeça de fosfato hidrofílica, com duas caudas de ácidos graxos hidrofóbicas (GANEO *et al.*, 2019). Por apresentar um ângulo de contato moderadamente hidrofóbico (Figura 17), o revestimento permite uma interação parcial com a região hidrofílica da membrana celular. Essa interação induz a lixiviação de terpenos aprisionados no filme, pelo processo de deposição por plasma. Esses compostos atuam como agentes lipofílicos, alojando-se na bicamada fosfolipídica, perturbando a estrutura e as funções normais da célula (BAZAKA *et al.*, 2021), alterando a permeabilidade da membrana celular desses micro-organismos (DAGLI *et al.*, 2015; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012), assim, formando complexos com proteínas intracelulares, através de ligações de hidrogênio, que causam danos ao DNA e a perda do conteúdo intracelular, levando à morte das bactérias (BAZAKA *et al.*, 2011a; CARSON; MEE; RILEY, 2002), conforme evidenciado por Chan *et al.* (2016).

Conforme demonstrado por outros autores (ASSAGGAF *et al.*, 2022; TAKAHASHI; KOKUBO; SAKAINO, 2004), o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* não demonstrou uma inibição satisfatória para o crescimento bacteriano da espécie *E. coli* (Gram-negativa). Assim, as espécies químicas do óleo, possuem um efeito antibacteriano menor para esse micro-organismo. O mesmo comportamento foi evidenciado para a funcionalização por plasma desse óleo essencial, e está apresentado na Figura 24.

A diversidade de fragmentos gerados no plasma varia em funcionalidade química, podendo assim apresentar diferentes interações celulares, de acordo com o organismo. Assim, ensaios de adesão e viabilidade celular mamíferas foram realizados.

5.5. Adesão e Viabilidade de Células-tronco

Os resultados da avaliação da adesão de células-tronco, fixadas após 3 horas, estão demonstrados na Figura 25. A quantificação dos núcleos revelou similaridade estatística ($P_{\text{value}} = 0,1891 > \alpha = 0,05$) entre o número de células-tronco contado na placa de cultura, no substrato metálico, e substrato contendo filme (Figura 25 (a)), ou seja, não houve diferença significativa no número de células aderidas à superfície da amostra com revestimento e nas superfícies do substrato e do controle negativo (placa). Na Figura 25 (b) é possível observar em azul os núcleos das células aderidas nos diferentes grupos estudados, confirmando a similaridade do comportamento das células nas diferentes superfícies analisadas.

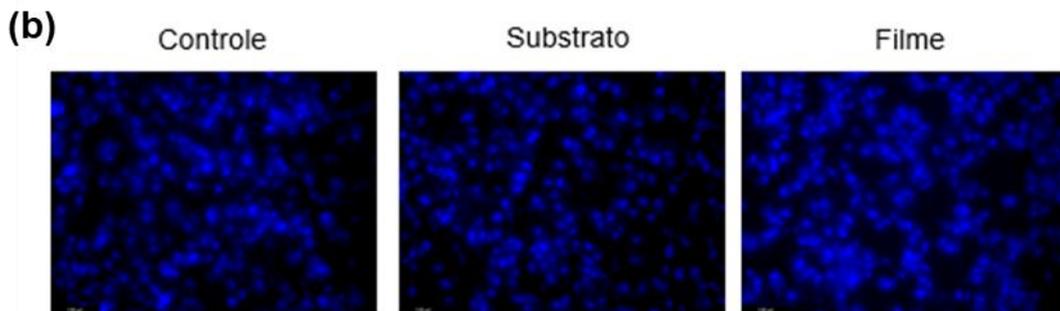
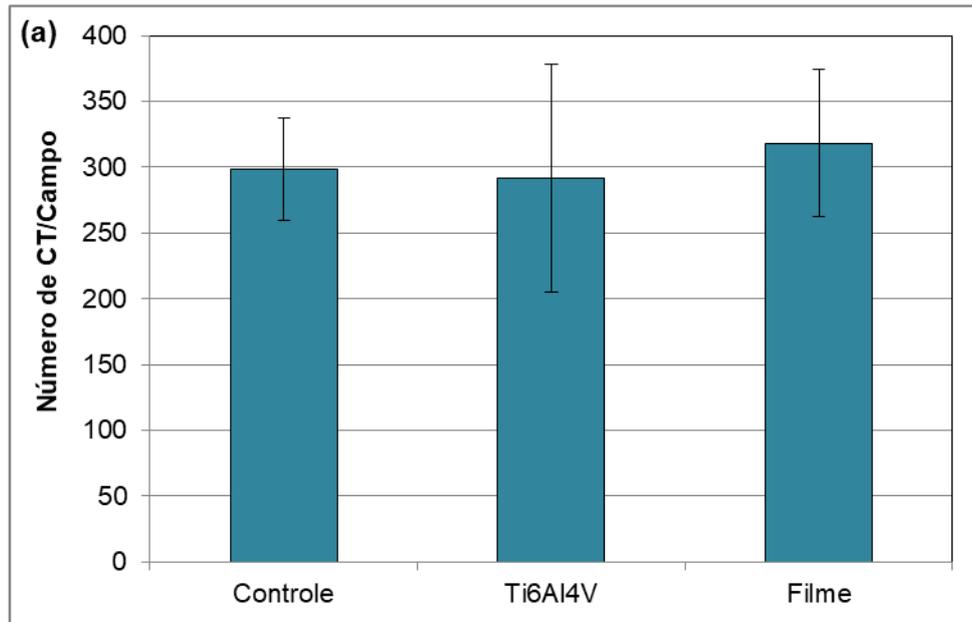


Figura 25: Ensaio de adesão de células-tronco fixadas e coradas com DAPI 3 horas após a semeadura. (a) Dados expressos em média e DP da quantificação de núcleos corados por campo do microscópio. (b) Imagens de microscopia de fluorescência. Fotos representativas dos núcleos das células coradas com DAPI em azul. Aumento de 200x.

Nas Figuras 26 e 27 são apresentadas as imagens de MEV-FEG das células-tronco, após adesão celular durante 3 horas, nas superfícies revestidas com o filme polimérico e o substrato metálico. Os resultados apresentados estão de acordo com as análises de adesão celular (Figura 25), sendo possível visualizar as células aderidas em ambas as superfícies.

As proteínas presentes nas células-tronco se aderem a uma superfície através um processo complexo, envolvendo forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (ROACH; FARRAR; PERRY, 2005).

Segundo Hao *et al.* (2016), superfícies com caráter hidrofílico e moderadamente molháveis, respondem melhor à adesão e proliferação celular em comparação com superfícies hidrofóbicas. Esse comportamento ocorre devido à desnaturação de proteínas superficiais que se ligam irreversivelmente às superfícies mais hidrofóbicas (SONG; MANO, 2013).

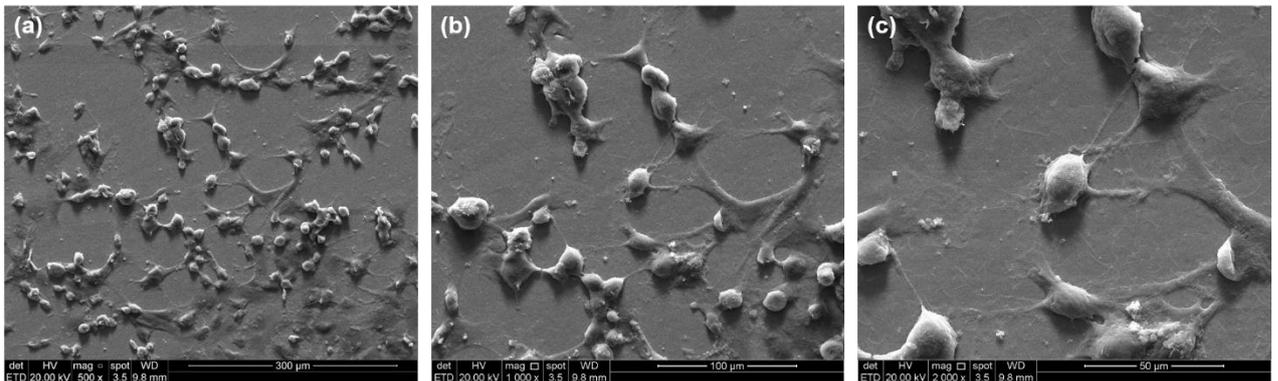


Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura das células-tronco mesenquimais aderidas no polímero formado por plasma. Magnificação: (a) 500x, (b) 1000x e (c) 2000x.

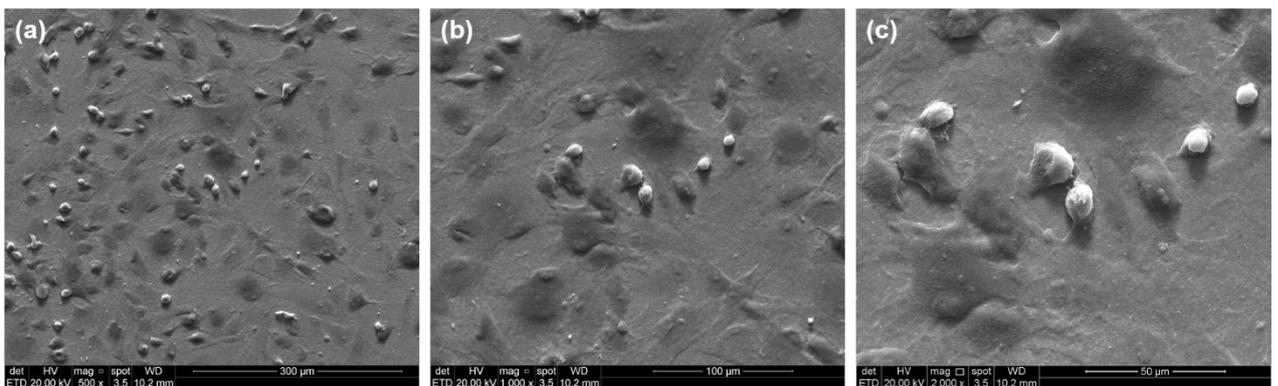


Figura 27: Microscopia eletrônica de varredura das células-tronco mesenquimais aderidas no substrato de Ti6Al4V polido. Magnificação: (a) 500x, (b) 1000x e (c) 2000x.

As amostras de substrato e filme, esterilizadas por UV-C, em contato com as células-tronco, geraram valores de absorvância no teste MTT semelhantes ao controle negativo, em ambos os tempos experimentais estudados (1 e 4 dias), apresentados na Figura 28. Esses resultados indicaram a ausência de citotoxicidade, de acordo com a norma ISO 10993-5:2009 (14:00-17:00, 2009), uma vez que a porcentagem de

absorbância encontrada foi acima de 70%. O controle positivo (controle de morte) – Triton- apresentou porcentagem de viabilidade de 6% no dia 1 e 4% no dia 4. Também pode ser observado o aumento da absorbância no dia 4 em comparação ao dia 1, indicando o aumento do crescimento celular no decorrer do tempo, em todas as amostras estudadas. Isso indica que o filme formado pode ser considerado um ambiente favorável às células.

As células mantidas em cultura com os extratos dos materiais apresentaram a morfologia característica de células-tronco (Figura 28 (b)). A análise ANOVA demonstrou diferença estatística entre os ensaios de MTT indireto ($P_{\text{value}} = 0,01 < \alpha = 0,05$). Porém, o teste Tukey demonstrou que existe diferença significativa apenas entre o controle positivo (controle de morte) – Triton – com os demais sistemas estudados, ou seja, o filme polimérico à base de óleo essencial de eucalipto apresentou um comportamento similar ao substrato e ao controle negativo, demonstrando a baixa toxicidade desse revestimento às células-tronco mesenquimais.

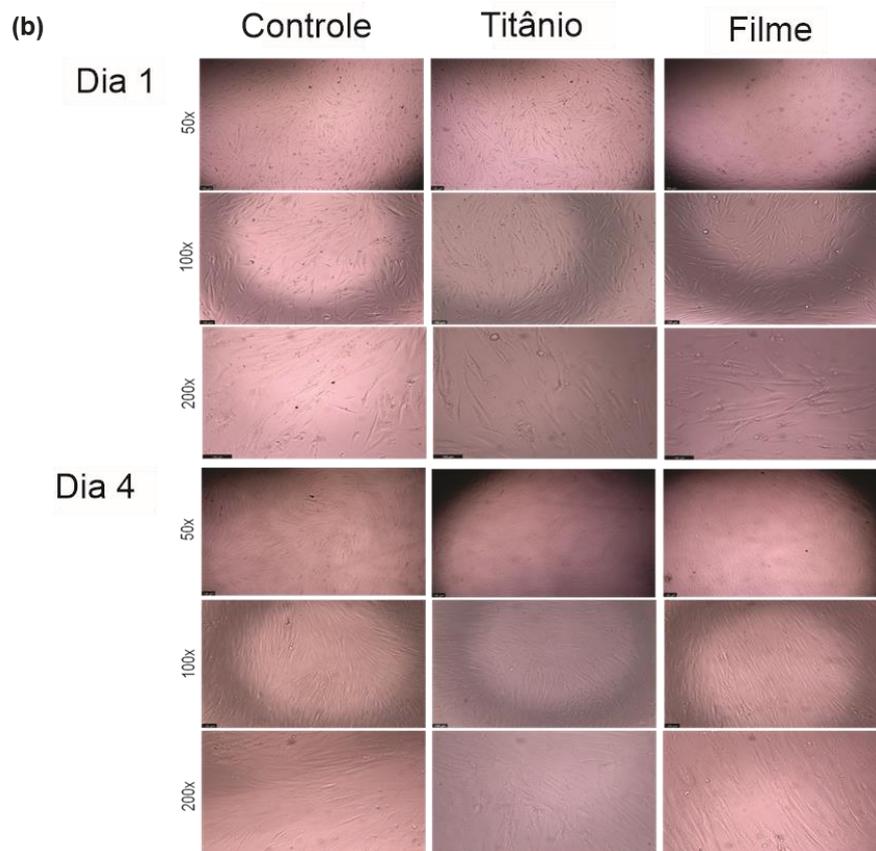
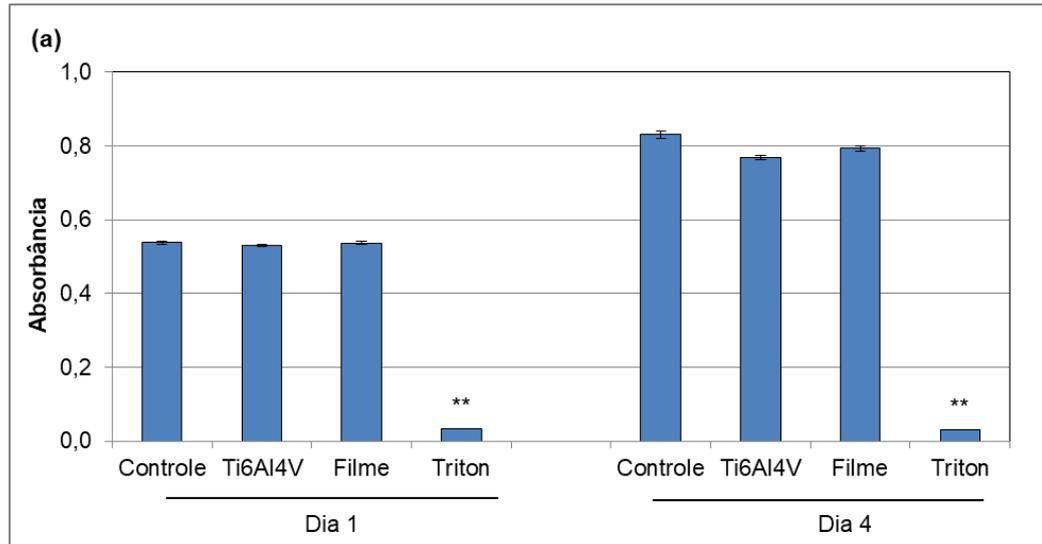


Figura 28: Avaliações após 1 e 4 dias de células-tronco tratadas com o extrato dos materiais. (a) Ensaio de viabilidade (MTT) indireto. (b) Imagens representativas de microscopia ótica das CTM cultivadas com o extrato dos materiais, com aumento de 50, 100 e 200x. Controle corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura e “Triton” representa o controle de morte (células cultivadas nas placas e tratadas com 1% de Triton X-100). Dados expressos em média e DP. ** indica resultados com $p < 0,01$ em relação aos demais grupos experimentais por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Os resultados da avaliação da viabilidade das células cultivadas por 1 dia diretamente nos materiais (MTT direto) também não indicaram citotoxicidade (Figura 29). A absorbância média e desvio padrão das células-tronco cultivadas na placa (controle negativo) foi $1,370 \pm 0,020$; no substrato $1,096 \pm 0,196$; nos filmes $1,108 \pm 0,068$ e após morte com Triton $0,102 \pm 0,018$.

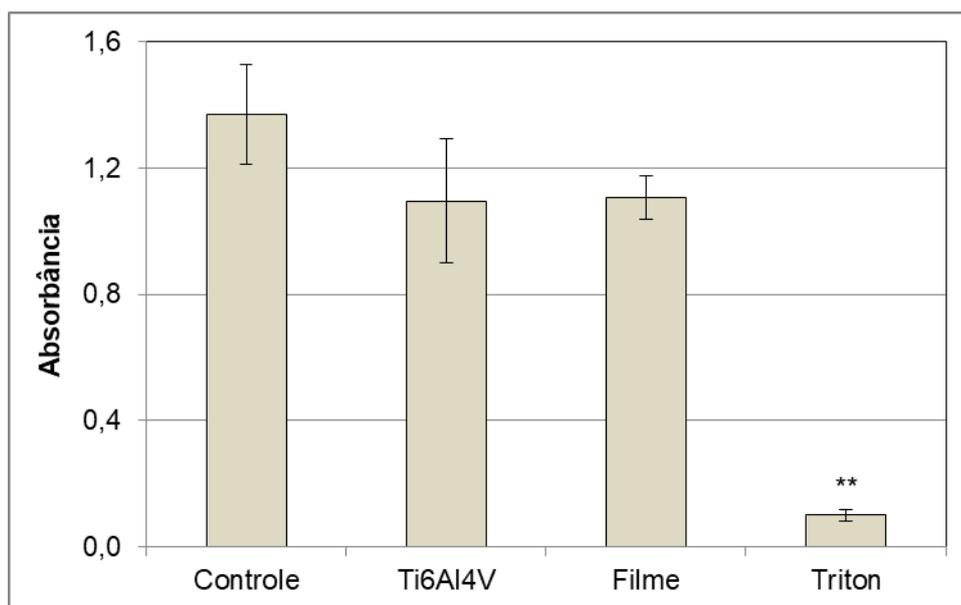


Figura 29: Ensaio de citotoxicidade (MTT) de contato direto após 1 dia. Controle corresponde às células cultivadas diretamente nos poços da placa de cultura e “Triton” representa o controle de morte (células cultivadas nas placas e tratadas com 1% de Triton X-100). Dados expressos em média e DP. ** indica resultados com $p < 0,01$ em relação aos demais grupos experimentais por ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Em outros estudos, se demonstrou que o efeito da topografia na escala micrométrica e submicrométrica interferem na resposta celular (ALVES *et al.*, 2010), onde fibroblastos foram sensíveis ao tamanho, à rugosidade e à química da superfície (WANG *et al.*, 2018). Khazraei *et al.*, 2022, avaliaram a toxicidade do óleo essencial de eucalipto em linhagens de células de câncer de cólon, e em células fibroblásticas humanas saudáveis. Os autores concluíram que o óleo causa a morte de células cancerígenas e sua concentração mais segura é de 0,05%. Além disso, não apresentou toxicidade em células fibroblásticas normais.

As células eucarióticas, como as células-tronco mesenquimais, apresentam uma estrutura mais complexa que às procarióticas, pois possuem um sistema de membranas altamente desenvolvido, que protegem seu núcleo através de um sistema de endomembranas e citoesqueleto, que dividem a célula em compartimentos funcionais e estruturais (BAZAKA *et al.*, 2011a; CARSON; MEE; RILEY, 2002).

A presença de compostos com grupos funcionais oxigenados, como alcoóis e carbonilas, presentes no filme polimérico (Figura 18), influenciam a permeação das membranas de células eucariontes e procariontes, e conseqüentemente, nos mecanismos do efeito tóxico dos constituintes do óleo essencial nesses organismos (ELSHAFIE; CAMELE, 2017). Devido as membranas mais desenvolvidas das células eucariontes, a toxicidade para as células-tronco diminui significativamente com o aumento da lipofilicidade, o oposto ocorre para bactérias (procariontes), que apresentam uma maior taxa de mortalidade quando ocorre o aumento da lipofilicidade no meio em que estão inseridas (ELSHAFIE; CAMELE, 2017; SHARMA *et al.*, 2022). Esse fenômeno pode explicar o efeito de inibição de crescimento das bactérias Gram-positivas (Figura 23), gerada pelo revestimento formado via plasma. Além disso, não foi citotóxico para células-tronco mesenquimais (Figuras 28 e 29), visto que, o processo de deposição do revestimento pode preservar a atividade bioquímica do óleo essencial, além de aumentar a hidrofobicidade da superfície em relação ao substrato metálico polido, como observado pelas análises de ângulo de contato (Figura 17).

Os resultados apresentados demonstraram o potencial que a polimerização a plasma do óleo essencial de eucalipto tem como revestimento aplicado como agente antibacteriano, e simultaneamente, com ausência de citotoxicidade. Portanto, esse revestimento pode ser aplicado em diferentes dispositivos médicos, no entanto,

avaliações *in vivo* seriam necessárias para determinar o desempenho ideal do material desenvolvido.

6. Conclusões

O filme obtido por plasma consiste principalmente de hidrocarbonetos e compostos oxigenados como álcoois e carbonilas. A topografia da superfície mostrou uma superfície com baixa rugosidade. Além disso, observou-se aumento da hidrofobicidade do revestimento comparativamente à liga metálica polida.

Quanto ao efeito dos processos de esterilização sobre esse filme obtido por polimerização por plasma, observou-se que: O processo de esterilização por autoclave foi o mais prejudicial, tendo promovido a degradação química e morfológica do filme. O processo de plasma de ar conservou as características químicas, porém, degradou morfológicamente, enquanto o processo de óxido de etileno não modificou morfológicamente o filme formado por plasma, mas alterou quimicamente a estrutura do mesmo, acarretando uma baixa ação antibacteriana para a espécie de bactéria *S. aureus*. No entanto, o processo de esterilização por UV-C não causou danos aparentes às estruturas morfológicas e químicas do filme, sendo, portanto, esse o processo de esterilização mais adequado para a esterilização desse material.

Após a esterilização por UV-C, o filme formado foi capaz de diminuir significativamente o número de células viáveis de *S. aureus*. Porém, não foram constatadas diferenças significativas para a inibição da *E.coli*, em comparação ao substrato de Ti6Al4V polido. Além disso, foi observada a adesão de células-tronco mesenquimais sobre o revestimento, o qual apresentou ausência de citotoxicidade para essas células. Esse efeito pode ser atribuído a alteração das propriedades morfológicas

e físico-químicas provenientes da polimerização a plasma do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, que através da diminuição da rugosidade, aumento do ângulo de contato e adição de grupos funcionais reativos interferiram no comportamento do filme com os diferentes tipos de organismos.

O procedimento descrito possui um menor custo que seus componentes isolados, e aliado ao fato de que os resultados apresentados demonstraram que a funcionalização por plasma atribuiu propriedades morfológicas promissoras à superfície metálica no combate a formação de biofilmes, o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* se torna um ótimo candidato para a utilização como precursor natural na polimerização por plasma.

Trabalhos Futuros

- Ensaio eletroquímico nas amostras funcionalizadas;
- Análise da resistência do filme em fluido corpóreo humano simulado (DMEM, Hanks ou PBS);
 - Investigar o efeito antibacteriano de filmes produzidos combinando o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* com outros óleos essenciais como precursores;
 - Estudo de diferenciação osteogênica e condrogênica no filme polimérico.

Referências

14:00-17:00. **ISO 10993-5:2009**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/36406.html>. Acesso em: 5 dez. 2022.

ABERS, M. *et al.* Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 124, 2021.

ABRIGO, M.; KINGSHOTT, P.; MCARTHUR, S. L. Bacterial response to different surface chemistries fabricated by plasma polymerization on electrospun nanofibers. **Biointerphases**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 04A301, 2015.

AGGARWAL, K. K. *et al.* Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 59–63, 2002.

AHMAD, J. *et al.* Structural Characterization of γ -Terpinene Thin Films Using Mass Spectroscopy and X-Ray Photoelectron Spectroscopy. **Plasma Processes and Polymers**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1085–1094, 2015.

AHMED, W.; ZHAI, Z.; GAO, C. Adaptive antibacterial biomaterial surfaces and their applications. **Materials Today Bio**, [s. l.], v. 2, p. 100017, 2019.

AIT-OUAZZOU, A. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 91, n. 14, p. 2643–2651, 2011.

ALAM, F.; BALANI, K. Adhesion force of staphylococcus aureus on various biomaterial surfaces. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 65, p. 872–880, 2017.

ALBA-PEREZ, A. *et al.* Plasma polymerised nanoscale coatings of controlled thickness for efficient solid-phase presentation of growth factors. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 113, p. 110966, 2020.

ALEKSIC SABO, V.; KNEZEVIC, P. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis Dehn. plant extracts and essential oils: A review. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 132, p. 413–429, 2019.

AL-JUMAILI, A. *et al.* Eco-friendly nanocomposites derived from geranium oil and zinc oxide in one step approach. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 5973, 2019.

AL-JUMAILI, A.; BAZAKA, K.; JACOB, M. Retention of Antibacterial Activity in Geranium Plasma Polymer Thin Films. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 270, 2017.

ALLA, R. K. *et al.* Surface Roughness of Implants: A Review. [s. l.], p. 7,

ALMAGUER-FLORES, A.; XIMÉNEZ-FYVIE, L. A.; RODIL, S. E. Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: Effect of surface roughness and culture media. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, [s. l.], v. 92B, n. 1, p. 196–204, 2010.

ALVAREZ, K. V. *et al.* Synthesis and Surface Characterization of a Novel Plasma-polymerized (α -Pinene)-based Thin Film. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 894, n. 1, p. 012009, 2020.

ALVES, N. M. *et al.* Controlling Cell Behavior Through the Design of Polymer Surfaces. **Small**, [s. l.], v. 6, n. 20, p. 2208–2220, 2010.

AMMAR, Y. *et al.* Influence of surface roughness on the initial formation of biofilm. **Surface and Coatings Technology**, [s. l.], v. 284, p. 410–416, 2015a.

AMMAR, Y. *et al.* Influence of surface roughness on the initial formation of biofilm. **Surface and Coatings Technology**, [s. l.], v. 284, The 42nd International Conference on Metallurgical Coatings and Thin Films, p. 410–416, 2015b.

ANSELME, K.; PONCHE, A.; BIGERELLE, M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, [s. l.], v. 224, n. 12, p. 1487–1507, 2010.

ANTONINI, L. M. Avaliação do efeito de superfícies nanoestruturadas de Ti6Al4V na indução da osteogênese de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea murina. [s. l.], 2016. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/163740>. Acesso em: 24 jan. 2023.

ANTONINI, L. M. *et al.* Cold-Plasma-Sterilized Nanostructured Ti6Al4V: Effect on Nanostructured Surface Morphology and Osteogenic Differentiation of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Materials Engineering and Performance**, [s. l.], v. 30, n. 10, p. 7236–7246, 2021.

ANTONINI, L. M. *et al.* Effect of sterilization processes on nanostructured Ti6Al4V surfaces obtained by electropolishing. **Journal of Materials Research**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 1439–1446, 2019.

ANTONINI, L. M. Superfícies nanoestruturas de titânio e tratamento superficial com filmes Diamond Like Carbon (DLC). [s. l.], p. 125, 2012.

APEL, M. A. *et al.* QUANTIFICATION OF THE COMPONENTS IN COMMERCIAL ESSENTIAL OIL OF EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL. BY GAS CHROMATOGRAPHY – GC-FID AND GC-MS. **Drug Analytical Research**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 9–14, 2017.

ARAÚJO, E. A. *et al.* Control of Microbial Adhesion as a Strategy for Food and Bioprocess Technology. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 321–332, 2010.

ARTEMENKO, A. *et al.* Effect of sterilization procedures on properties of plasma polymers relevant to biomedical applications. **Thin Solid Films**, [s. l.], v. 520, n. 24, p. 7115–7124, 2012.

ASSAGGAF, H. M. *et al.* Singular and Combined Effects of Essential Oil and Honey of Eucalyptus Globulus on Anti-Inflammatory, Antioxidant, Dermatoprotective, and Antimicrobial Properties: In Vitro and In Vivo Findings. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 16, p. 5121, 2022.

AWAD, N. K.; EDWARDS, S. L.; MORSI, Y. S. A review of TiO₂ NTs on Ti metal: Electrochemical synthesis, functionalization and potential use as bone implants. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 76, p. 1401–1412, 2017.

BAKRY, A. M. *et al.* Microencapsulation of Oils: A Comprehensive Review of Benefits, Techniques, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 143–182, 2016.

BALDIN, E. K. K. *et al.* Effect of sterilization on the properties of a bioactive hybrid coating containing hydroxyapatite. **Advances in Materials Science and Engineering**, [s. l.], v. 2019, 2019.

BALDIN, E. K. K. *et al.* Effect of sterilization processes on the properties of a silane hybrid coating applied to Ti6Al4V alloy. **Journal of Materials Research**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 161–177, 2018.

BARANSKA, M. *et al.* Investigation of eucalyptus essential oil by using vibrational spectroscopy methods. **Vibrational Spectroscopy**, [s. l.], v. 42, n. 2, p. 341–345, 2006.

BARANSKA, M. *et al.* Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of Eucalyptus essential oils. **Biopolymers**, [s. l.], v. 78, n. 5, p. 237–248, 2005.

BATONI, G.; MAISETTA, G.; ESIN, S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. **Biochimica Et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1858, n. 5, p. 1044–1060, 2016.

BAZAKA, K. *et al.* Anti-bacterial surfaces: natural agents, mechanisms of action, and plasma surface modification. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 60, p. 48739–48759, 2015.

BAZAKA, O. *et al.* Decontamination-Induced Modification of Bioactivity in Essential Oil-Based Plasma Polymer Coatings. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 23, p. 7133, 2021.

BAZAKA, O. *et al.* Effect of titanium surface topography on plasma deposition of antibacterial polymer coatings. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 521, p. 146375, 2020.

BAZAKA, K. *et al.* Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment. **Acta Biomaterialia**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 2015–2028, 2011a.

BAZAKA, K. *et al.* Plasma-Enhanced Synthesis of Bioactive Polymeric Coatings from Monoterpene Alcohols: A Combined Experimental and Theoretical Study. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 2016–2026, 2010.

BAZAKA, K. *et al.* The Effect of Polyterpenol Thin Film Surfaces on Bacterial Viability and Adhesion. **Polymers**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 388–404, 2011b.

BAZAKA, K.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Do bacteria differentiate between degrees of nanoscale surface roughness?. **Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 1103–1114, 2011.

BEZUIDENHOUT, M. *et al.* The effect of HF-HNO₃ chemical polishing on the surface roughness and fatigue life of laser powder bed fusion produced Ti6Al4V. **Materials Today Communications**, [s. l.], v. 25, p. 101396, 2020.

BHATT, S. *et al.* Plasma Co-polymerized Nano Coatings - As a Biodegradable Solid Carrier for Tunable Drug Delivery Applications. **Polymer**, [s. l.], v. 54, p. 4820–4829, 2013.

BHATT, S.; PULPYTEL, J.; AREFI-KHONSARI, F. Low and atmospheric plasma polymerisation of nanocoatings for bio-applications. **Surface Innovations**, [s. l.], v. 3, 2015.

BOGAERTS, A. *et al.* Gas discharge plasmas and their applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 609–658, 2002.

BONES, B. L. Filmes finos derivados de hexametildissiloxano e isopropanol depositados por polimerização à plasma: avaliação do processo de deposição e caracterização dos filmes obtidos. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/206055>. Acesso em: 9 out. 2022.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-
-a review. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

ÇAKMAK, K. *et al.* Plasma polymerized linalool (ppLin): an antimicrobial and biocompatible coating. **TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 323–334, 2019.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 1914–1920, 2002.

CARVALHO, R. L. R. de *et al.* Incidência e fatores de risco para infecção de sítio cirúrgico em cirurgias gerais 1. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, [s. l.], v. 25, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/rlae/a/N9R5ZvPR7wzwwgbjBwbqFvJ/?lang=pt>. Acesso em: 30 nov. 2022.

CHABERT, P.; BRAITHWAITE, N. **Physics of Radio-Frequency Plasmas**. Cambridge: Cambridge University Press, 2011. *E-book*. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/physics-of-radiofrequency-plasmas/07AF7D2152B32335BFD5F96ADDC7CE83>. Acesso em: 28 set. 2022.

CHAN, Y. W. *et al.* Plasma polymerized carvone as an antibacterial and biocompatible coating. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 68, p. 861–871, 2016.

CHEN, J.; WANG, J.; YUAN, H. Morphology and performances of the anodic oxide films on Ti6Al4V alloy formed in alkaline-silicate electrolyte with aminopropyl silane addition under low potential. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 284, p. 900–906, 2013.

CIMANGA, K. *et al.* Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 213–220, 2002.

COAD, B. R. *et al.* Controlled covalent surface immobilisation of proteins and peptides using plasma methods. **Surface and Coatings Technology**, [s. l.], v. 233, Mechanical and Tribological Properties of Biomedical Coatings and Surface-modified Biomaterials, p. 169–177, 2013.

CRAWFORD, R. J. *et al.* Surface topographical factors influencing bacterial attachment. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 179–182, p. 142–149, 2012.

DAFERERA, D. J.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G. Characterization of Essential Oils from Lamiaceae Species by Fourier Transform Raman Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 20, p. 5503–5507, 2002.

DAGLI, N. *et al.* Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. **Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 335–340, 2015.

DAMJANOVIĆ-VRATNICA, B. *et al.* Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. **Czech Journal of Food Sciences**, [s. l.], v. 29, n. No. 3, p. 277–284, 2011.

DIAMANTI, M. V.; DEL CURTO, B.; PEDEFERRI, M. Interference colors of thin oxide layers on titanium. **Color Research & Application**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 221–228, 2008.

DÍAZ, C. *et al.* Influence of the nano-micro structure of the surface on bacterial adhesion. **Materials Research**, [s. l.], v. 10, p. 11–14, 2007.

DIENER, A. *et al.* Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. **Biomaterials**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 383–392, 2005.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DORAN, J. C.; BROPHY, J. J. Tropical red gums? a source of 1,8-cineole-rich *Eucalyptus* oil. **New Forests**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 157–178, 1990.

DOS SANTOS, F. P. *et al.* Poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) Scaffold Induces Short-term Nerve Regeneration and Functional Recovery Following Sciatic Nerve Transection in Rats. **Neuroscience**, [s. l.], v. 396, p. 94–107, 2019.

EASTON, C. D.; JACOB, M. V. Ageing and thermal degradation of plasma polymerised thin films derived from *Lavandula angustifolia* essential oil. **Polymer Degradation and Stability**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 597–603, 2009a.

EASTON, C. D.; JACOB, M. V. Optical characterisation of radio frequency plasma polymerised *Lavandula angustifolia* essential oil thin films. **Thin Solid Films**, [s. l.], v. 517, n. 15, p. 4402–4407, 2009b.

EASTON, C. D.; JACOB, M. V.; SHANKS, R. A. Fabrication and characterisation of polymer thin-films derived from cineole using radio frequency plasma polymerisation. **Polymer**, [s. l.], v. 50, n. 15, p. 3465–3469, 2009.

ELAISSI, A. *et al.* Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 1427–1434, 2011.

ELSHAFIE, H. S.; CAMELE, I. An Overview of the Biological Effects of Some Mediterranean Essential Oils on Human Health. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2017, p. e9268468, 2017.

FRIEDRICH, J. Mechanisms of Plasma Polymerization – Reviewed from a Chemical Point of View. **Plasma Processes and Polymers**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 783–802, 2011.

FRIEDRICH, J. **The plasma chemistry of polymer surfaces: advanced techniques for surface design**. Weinheim, Chichester: Wiley-VCH ; John Wiley [distributor], 2012.

E-book. Disponível em:
<http://www.dawsonera.com/depp/reader/protected/external/AbstractView/S9783527648030>. Acesso em: 28 set. 2022.

GANEO, A. L. *et al.* Células: uma breve revisão sobre a diversidade, características, organização, estruturas e funções celulares. **Unisanta BioScience**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 458–463, 2019.

GEETHA, M. *et al.* Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review. **Progress in Materials Science**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 397–425, 2009.

GERCHMAN, D. Deposição e caracterização de filmes finos fabricados através da técnica de polimerização por plasma de D-limoneno. [s. l.], 2019. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/201573>. Acesso em: 29 set. 2022.

GERCHMAN, D. *et al.* Thin film deposition by plasma polymerization using d-limonene as a renewable precursor. **Progress in Organic Coatings**, [s. l.], v. 129, p. 133–139, 2019.

GETNET, T. G. *et al.* Atmospheric pressure plasma deposition of eugenol-derived film on metallic biomaterial for suppression of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterial biofilm. **Thin Solid Films**, [s. l.], v. 734, p. 138833, 2021.

GOMES, L. Biomateriais em Artoplastia de Quadril: Propriedades, Estrutura e Composição. *Em*: [S. l.: s. n.], 2010. p. 121–143.

GUIMOND, S. *et al.* Influence of gas phase and surface reactions on plasma polymerization. **Surface and Coatings Technology**, [s. l.], v. 205, PSE 2010 Special Issue, p. S447–S450, 2011.

HAO, L. *et al.* Surface chemistry from wettability and charge for the control of mesenchymal stem cell fate through self-assembled monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 148, p. 549–556, 2016.

HARRINGTON, R. E. *et al.* Sterilization and Disinfection of Biomaterials for Medical Devices. *Em*: BIOMATERIALS SCIENCE. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 1431–1446. *E-book*.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012816137100091X>.
Acesso em: 2 fev. 2023.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 68, n. 22, Highlights in the Evolution of Phytochemistry: 50 Years of the Phytochemical Society of Europe, p. 2831–2846, 2007.

HASAN, J.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 295–304, 2013.

HASIRCI, V.; HASIRCI, N. Sterilization of Biomaterials. *Em*: HASIRCI, V.; HASIRCI, N. (org.). **Fundamentals of Biomaterials**. New York, NY: Springer, 2018. p. 187–198. *E-book*. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8856-3_13. Acesso em: 4 fev. 2023.

HAYCOCK, J. W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 695, p. 1–15, 2011.

HEGEMANN, D. *et al.* Energy Conversion Efficiency in Plasma Polymerization – A Comparison of Low- and Atmospheric-Pressure Processes. **Plasma Processes and Polymers**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 834–842, 2016.

HELMUS, M. N.; GIBBONS, D. F.; CEBON, D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 70–80, 2008.

HENDRY, E. R. *et al.* Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 6, p. 1219–1225, 2009.

HENRY, F. *et al.* Synthesis of superhydrophobic PTFE-like thin films by self-nanostructuring in a hybrid plasma process. **Surface Science**, [s. l.], v. 606, p. 1825–1829, 2012.

HOCH, J. Modificação da adesão e proliferação bacteriana em superfícies de aço inoxidável AISI 430 texturizadas por shot peening. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/241885>. Acesso em: 3 abr. 2023.

HOLZAPFEL, B. M. *et al.* How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 3, p. 12, 2012.

IVANOVA, E. P. *et al.* Impact of Nanoscale Roughness of Titanium Thin Film Surfaces on Bacterial Retention. **Langmuir**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 1973–1982, 2010.

JACOB, M. V. *et al.* Fabrication of a novel organic polymer thin film. **Thin Solid Films**, [s. l.], v. 516, n. 12, p. 3884–3887, 2008.

JAN, R. *et al.* Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. **Agronomy**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 968, 2021.

JEMAT, A. *et al.* Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, p. e791725, 2015.

JIANG, Y. *et al.* Wettability regulated gram-negative bacterial adhesion on biomimetic hierarchical structures. **Chinese Chemical Letters**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 813–817, 2017.

JONKHEIJM, P. *et al.* Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 47, n. 50, p. 9618–9647, 2008.

JÚNIOR, D. L.; COLODETTE, J. L. Importância e versatilidade da madeira de eucalipto para a indústria de base florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, [s. l.], v. 33, n. 76, p. 429–438, 2013.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European cells & materials**, [s. l.], v. 8, p. 37–57, 2004.

KHAZRAEI, H.; SHAMSDIN, S. A.; ZAMANI, M. In Vitro Cytotoxicity and Apoptotic Assay of Eucalyptus globulus Essential Oil in Colon and Liver Cancer Cell Lines. **Journal of Gastrointestinal Cancer**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 363–369, 2022.

KRAMER, P. W.; YEH, Y. S.; YASUDA, H. Low temperature plasma for the preparation of separation membranes. **Journal of Membrane Science**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 1–28, 1989.

KULKARNI, M. *et al.* Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. **Nanomedicine**, [s. l.], v. 111, n. 615, p. 111, 2014.

KULKARNI, M. *et al.* Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 062002, 2015.

KUMAR, A. *et al.* Biodegradable optically transparent terpinen-4-ol thin films for marine antifouling applications. **Surface and Coatings Technology**, [s. l.], v. 349, p. 426–433, 2018.

KUMAR, A. *et al.* In-Situ Surface Modification of Terpinen-4-ol Plasma Polymers for Increased Antibacterial Activity. **Materials**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 586, 2020.

KUMAR, N. *et al.* TiO₂ and its composites as promising biomaterials: a review. **BioMetals**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 147–159, 2018.

KUMAR, S.; ROY, D. N.; DEY, V. A comprehensive review on techniques to create the anti-microbial surface of biomaterials to intervene in biofouling. **Colloid and Interface Science Communications**, [s. l.], v. 43, p. 100464, 2021.

KUORWEL, K. K. *et al.* Essential Oils and Their Principal Constituents as Antimicrobial Agents for Synthetic Packaging Films. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 76, n. 9, p. R164–R177, 2011.

LANDINI, P. *et al.* Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 813–823, 2010.

LED, L. I. P. a. **Fluenza UV (Dose) raccomandata per la disinfezione al 90% o al 99% da Virus, Batteri, Protozoi e Alghe.** [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.it.lumistrips.com/lumistrips-blog/uv-fluence-for-disinfection-for-up-to-99-disinfection-it/>. Acesso em: 4 fev. 2023.

LEROUGE, S. Sterilization and cleaning of metallic biomaterials. *Em: METALS FOR BIOMEDICAL DEVICES*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 405–428. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978008102666300016X>. Acesso em: 2 fev. 2023.

LIU, W.; LIU, S.; WANG, L. Surface Modification of Biomedical Titanium Alloy: Micromorphology, Microstructure Evolution and Biomedical Applications. **Coatings**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 249, 2019.

LÓPEZ, P. *et al.* Development of Flexible Antimicrobial Films Using Essential Oils as Active Agents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 21, p. 8814–8824, 2007.

LORCA, M. A. *et al.* Antimicrobial effects of extracts from Chilean plants of Lauraceae and Atherospermataceae families. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 73–83, 2012.

LU, A. *et al.* Effects of surface roughness and texture on the bacterial adhesion on the bearing surface of bio-ceramic joint implants: An in vitro study. **Ceramics International**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 6550–6559, 2020.

LÜDECKE, C. *et al.* Reproducible Biofilm Cultivation of Chemostat-Grown *Escherichia coli* and Investigation of Bacterial Adhesion on Biomaterials Using a Non-Constant-Depth Film Fermenter. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. e84837, 2014.

MA, L. *et al.* Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. e1000354, 2009.

MANN, M. N.; FISHER, E. R. Investigation of Antibacterial 1,8-Cineole-Derived Thin Films Formed via Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s. l.], v. 9, n. 42, p. 36548–36560, 2017.

MANOLACHE, S. *et al.* Some Terpenes and Related Derivatives Synthesized in Cold Plasma Systems. **Molecules**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 158–164, 1997.

MARTINELLI, A. H. S. *et al.* Soybean ubiquitous urease with purification facilitator: An addition to the moonlighting studies toolbox. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 53, p. 245–258, 2017.

MAURMANN, N. *et al.* Mesenchymal stem cells cultivated on scaffolds formed by 3D printed PCL matrices, coated with PLGA electrospun nanofibers for use in tissue engineering. **Biomedical Physics & Engineering Express**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 045005, 2017.

MCNEIL, J. C. *et al.* The Contemporary Epidemiology, Microbiology and Management of Chronic Osteomyelitis in US Children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 518–524, 2021.

MEDILANSKI, E. *et al.* Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion. **Biofouling**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 193–203, 2002.

MENDES, G. C. C.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Ethylene oxide sterilization of medical devices: A review. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 574–581, 2007.

MERCHE, D.; VANDENCASTEELE, N.; RENIERS, F. Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review. **Thin Solid Films**, [s. l.], v. 520, n. 13, p. 4219–4236, 2012a.

MERCHE, D.; VANDENCASTEELE, N.; RENIERS, F. Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review. **Thin Solid Films**, [s. l.], v. 520, p. 4219–4236, 2012b.

MEREDITH, D. O. *et al.* Human fibroblast reactions to standard and electropolished titanium and Ti–6Al–7Nb, and electropolished stainless steel. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [s. l.], v. 75A, n. 3, p. 541–555, 2005.

MICHELMORE, A. *et al.* Nanoscale deposition of chemically functionalised films via plasma polymerisation. **RSC Advances**, [s. l.], v. 3, n. 33, p. 13540–13557, 2013a.

MICHELMORE, A. *et al.* Nanoscale deposition of chemically functionalised films via plasma polymerisation. **RSC Advances**, [s. l.], v. 3, n. 33, p. 13540–13557, 2013b.

MURRAY, C. W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. **Journal of pharmacological methods**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 175–186, 1988.

NICOLA, F. *et al.* Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Modulate Early Astrocyte Response after Spinal Cord Contusion. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 748–760, 2019.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 49–79, 2000.

PEGALAJAR-JURADO, A. *et al.* Antibacterial activity studies of plasma polymerised cineole films. **J. Mater. Chem. B**, [s. l.], v. 2, n. 31, p. 4993–5002, 2014.

PEREIRA, M. P. Funcionalização por polimerização por plasma frio em Ti6Al4V para aplicação biomédica. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/229445>. Acesso em: 24 jan. 2023.

PEREIRA, M. *et al.* TEOS thin films obtained by plasma polymerization on Ti6Al4V alloys: Influence of the deposition pressure on surface properties and cellular response. **Applied Surface Science Advances**, [s. l.], v. 5, p. 100123, 2021.

PEREZ, L. S. V.; GRAZIANO, K. U. **Biofilmes e infecção hospitalar: revisão integrativa da literatura científica**. 2006. Disponível em: [http://www.ee.usp.br/graduacao/exibe_monografia.asp?vcodpesgr=3721942&vnompe sgr=Lina Solange Vargas Perez&vcodpesco1=90839&vcodpesco2=.](http://www.ee.usp.br/graduacao/exibe_monografia.asp?vcodpesgr=3721942&vnompe sgr=Lina Solange Vargas Perez&vcodpesco1=90839&vcodpesco2=)

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. BIOMATERIAIS: TIPOS, APLICAÇÕES E MERCADO. **Química Nova**, [s. l.], v. 38, p. 957–971, 2015.

PITCHI, C. S. *et al.* A review on alloy composition and synthesis of β -Titanium alloys for biomedical applications. **Materials Today: Proceedings**, [s. l.], v. 26, 10th International Conference of Materials Processing and Characterization, p. 3297–3304, 2020.

PLASMA, THE FOURTH STATE OF MATTER. *Em*: 7 jun. 2021. Disponível em: https://piescientific.com/resource_pages/resource_introduction_to_plasma/. Acesso em: 29 set. 2022.

PRADEEP KUMAR, S. S.; EASWER, H. V.; MAYA NANDKUMAR, A. Multiple drug resistant bacterial biofilms on implanted catheters - a reservoir of infection. **The Journal of the Association of Physicians of India**, [s. l.], v. 61, n. 10, p. 702–707, 2013.

RABIN, N. *et al.* Agents that inhibit bacterial biofilm formation. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 647–671, 2015.

RAMOS, C. C. R. *et al.* Use of ultraviolet-C in environmental sterilization in hospitals: A systematic review on efficacy and safety. **International Journal of Health Sciences**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 52–65, 2020.

RASAMIRAVAKA, T. *et al.* The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, p. 759348, 2015.

ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C. C. Interpretation of Protein Adsorption: Surface-Induced Conformational Changes. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 127, n. 22, p. 8168–8173, 2005.

RODRÍGUEZ-CANO, A. *et al.* Controlled silanization-amination reactions on the Ti6Al4V surface for biomedical applications. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, [s. l.], v. 106, p. 248–257, 2013.

ROGERS, W. J. Steam and dry heat sterilization of biomaterials and medical devices. *Em: STERILISATION OF BIOMATERIALS AND MEDICAL DEVICES*. [S. l.]: Elsevier, 2012. p. 20–55. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845699321500027>. Acesso em: 2 fev. 2023.

ROMO-RICO, J. *et al.* Plasma polymers from oregano secondary metabolites: Antibacterial and biocompatible plant-based polymers. **Plasma Processes and Polymers**, [s. l.], v. 19, n. 7, 2022.

ROSTEIUS, T. *et al.* Evaluating the microbial pattern of periprosthetic joint infections of the hip and knee. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 11, p. 1608–1613, 2018.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. [s. l.], 2008.

SAJNÓG, A. *et al.* Usefulness of laser ablation ICP-MS for analysis of metallic particles released to oral mucosa after insertion of dental implants. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [s. l.], v. 46, p. 46–54, 2018.

SAKTHI KUMAR, D. *et al.* Electrical and optical properties of plasma polymerized eucalyptus oil films. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 1102–1107, 2003.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. *et al.* Antimicrobial activity of polysaccharide films containing essential oils. **Food Control**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1302–1310, 2011.

SANTHOSH KUMAR, S. *et al.* Effect of Surface Finish on Wettability and Bacterial Adhesion of Micromachined Biomaterials. **Biotribology**, [s. l.], v. 18, p. 100095, 2019.

SANTOS, A. L. dos *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s. l.], v. 43, p. 413–423, 2007.

SARMIENTO-GONZÁLEZ, A. *et al.* Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 393, n. 1, p. 335–343, 2009.

SAUER, K. *et al.* The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 608–620, 2022.

SAVARIS, M.; SANTOS, V. dos; BRANDALISE, R. N. Influence of different sterilization processes on the properties of commercial poly(lactic acid). **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 69, p. 661–667, 2016.

SCHEUERMAN, T. R.; CAMPER, A. K.; HAMILTON, M. A. Effects of Substratum Topography on Bacterial Adhesion. **Journal of Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 208, n. 1, p. 23–33, 1998.

SCHULZ, H. *et al.* Quantitative Analysis of Various Citrus Oils by ATR/FT-IR and NIR-FT Raman Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 117–124, 2002.

SEDDIKI, O. *et al.* Evidence of antibacterial activity on titanium surfaces through nanotextures. **Applied Surface Science**, [s. l.], v. 308, p. 275–284, 2014.

SHARMA, M. *et al.* Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s. l.], v. 146, p. 112514, 2022.

SONBOLI, A.; BABAKHANI, B.; MEHRABIAN, A. R. Antimicrobial Activity of Six Constituents of Essential Oil from Salvia. [s. l.], p. 5,

SONG, W.; MANO, J. F. Interactions between cells or proteins and surfaces exhibiting extreme wettabilities. **Soft Matter**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 2985–2999, 2013.

SOUSA, S. *et al.* Cold plasma treatment of cotton and viscose fabrics impregnated with essential oils of *Lavandula angustifolia* and *Melaleuca alternifolia*. **Cellulose Chemistry and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 5–6, p. 711–719, 2016.

STOODLEY, P. *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, [s. l.], v. 56, p. 187–209, 2002.

STRUZZI, C. *et al.* Plasma fluorination of vertically aligned carbon nanotubes: functionalization and thermal stability. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 2263–2271, 2015.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, [s. l.], v. 2016, p. 3012462, 2016.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 60–64, 2004.

TAYLOR, R. L. *et al.* The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 17–22, 1998.

THIRY, D. *et al.* Plasma diagnostics for the low-pressure plasma polymerization process: A critical review. **Thin Solid Films**, [s. l.], v. 606, p. 19–44, 2016.

TOMAZ, M. A. *et al.* Composição química e atividade alelopática do óleo essencial de eucalipto. **Biosci. j. (Online)**, [s. l.], p. 475–483, 2014.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 12^a edição. [S. l.]: Artmed, 2016.

TRUONG, V. K. *et al.* Effect of ultrafine-grained titanium surfaces on adhesion of bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 83, n. 5, p. 925–937, 2009.

TRUONG, V. K. *et al.* The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. **Biomaterials**, [s. l.], v. 31, n. 13, p. 3674–3683, 2010.

UNALAN, I.; BOCCACCINI, A. R. Essential oils in biomedical applications: Recent progress and future opportunities. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 17, p. 100261, 2021.

VALENTE, P. M. *et al.* BIOPROSPECÇÃO PARA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Callistemon viminalis*. **Nucleus**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 265–277, 2018.

VARGAS JENTZSCH, P.; CIOBOTĂ, V. Raman spectroscopy as an analytical tool for analysis of vegetable and essential oils: Raman analysis of vegetable and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 287–295, 2014.

VASILEV, K. *et al.* Tailoring the surface functionalities of titania nanotube arrays. **Biomaterials**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 532–540, 2010.

VASILEV, K.; COOK, J.; GRIESSER, H. J. Antibacterial surfaces for biomedical devices. **Expert Review of Medical Devices**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 553–567, 2009.

VEERACHAMY, S. *et al.* Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine**, [s. l.], v. 228, n. 10, p. 1083–1099, 2014.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. ÓLEO ESSENCIAL DE EUCALIPTO. [s. l.], p. 30, 2003.

VITURRO, C. I.; MOLINA, A. C.; HEIT, C. I. Volatile Components of *Eucalyptus globulus* Labill ssp. *bicostata* from Jujuy, Argentina. **Journal of Essential Oil Research**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 206–208, 2003.

VIVAN, G. A. *et al.* Estudo técnico e econômico de um sistema móvel de extração de óleo essencial de eucalipto. **CERNE**, [s. l.], v. 17, p. 23–31, 2011.

VOJTĚCH, D. *et al.* Surface treatment of NiTi shape memory alloy and its influence on corrosion behavior. **Surface and Coatings Technology**, [s. l.], v. 204, n. 23, p. 3895–3901, 2010.

WANG, P.-Y. *et al.* Fibroblast Responses Toward Colloidal Assemblies and Plasma Polymer Coating. **IEEE Transactions on Nanotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 385–388, 2018.

WASSMANN, T. *et al.* The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. **International Journal of Implant Dentistry**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 32, 2017.

WEBER, D. J. *et al.* Effectiveness of ultraviolet devices and hydrogen peroxide systems for terminal room decontamination: Focus on clinical trials. **American Journal of Infection Control**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. e77–e84, 2016.

WILSON, A. J.; NAYAK, S. Disinfection, sterilization and disposables. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 10, Intensive Care, p. 423–427, 2013.

WONG, W. W. H. *et al.* Plasma deposition of organic polymer films for solar cell applications. **Organic Electronics**, [s. l.], v. 32, p. 78–82, 2016.

YAN, Y.; CHIBOWSKI, E.; SZCZEŚ, A. Surface properties of Ti-6Al-4V alloy part I: Surface roughness and apparent surface free energy. **Materials Science and Engineering: C**, [s. l.], v. 70, p. 207–215, 2017.

YANG, K. *et al.* Bacterial anti-adhesion surface design: Surface patterning, roughness and wettability: A review. **Journal of Materials Science & Technology**, [s. l.], v. 99, p. 82–100, 2022.

YASUDA, H. Glow discharge polymerization. **Journal of Polymer Science: Macromolecular Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 199–293, 1981.

YASUDA, H. **Luminous Chemical Vapor Deposition and Interface Engineering**. Boca Raton: CRC Press, 2004.

YASUDA, H. K. **Plasma polymerization**. Oxford: Elsevier Science, 1985. *E-book*. Disponível em: http://www.123library.org/book_details/?id=65431. Acesso em: 9 out. 2022.

YU, Y. *et al.* Microbiological pattern of prosthetic hip and knee infections: a high-volume, single-centre experience in China. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 3, 2021.

ZIMMER, C. G. Influência da oxidação térmica sobre as propriedades de fadiga da liga Ti-6Al-4V. [s. l.], 2011. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/35620>. Acesso em: 30 jan. 2023.

ZIVANOVIC, S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. M45–M51, 2005.