



INSTITUTO SUPERIOR TÉCNICO
Universidade Técnica de Lisboa

Adsorção de Albumina Bovina e Ácido Hialurónico em Cerâmicos de Titânio

Análise por QCM-D e AFM

Carlos Duarte da Silva Completo

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química

Júri

Presidente:	Professor João Carlos Moura Bordado (DEQB-IST)
Orientador:	Professora Benilde de Jesus Vieira Saramago (DEQB-IST)
Co-orientador:	Professora Ana Paula Valagão Amadeu do Serro (ISCSEM/CQE-IST)
Vogal:	Professor Rogério Anacleto Cordeiro Colaço (DEMAT-IST)

Outubro de 2008

Agradecimentos

A realização da presente tese foi apenas possível com a ajuda e atenção de várias pessoas às quais não poderia deixar de prestar o meu agradecimento, nomeadamente: à Professora Benilde Saramago que me acolheu no seu grupo de trabalho e me orientou nesta tese de fim de curso; à Professora Ana Paula Serro que disponibilizou muito do seu tempo a ajudar-me em diversos assuntos; ao Professor Rogério Colaço que possibilitou a utilização dos Laboratórios de AFM e Tribologia; ao Professor José Luís Mata que esteve sempre pronto a nos auxiliar nas reparações da QCM; e ao Engenheiro Kevyn Degiampietro que teve a paciência de me ensinar a usar alguns dos equipamentos laboratoriais.

Presto ainda o meu agradecimento ao Doutor Eduardo Pires e ao Engenheiro Hugo Araújo, da Ceramed, pela disponibilidade na preparação dos revestimentos de cerâmicos de titânio, e à FCT pelo financiamento do trabalho através do projecto PPCDT/SAL_BMA/55493/2004.

Resumo

A utilização de superfícies metálicas revestidas tem sido uma estratégia usada para melhorar o desempenho de dispositivos médicos, em particular de próteses ortopédicas. Os cerâmicos de titânio são considerados revestimentos biocompatíveis com boas propriedades mecânicas e tribológicas. Durante o contacto com os fluídos biológicos as macromoléculas presentes, nesses fluídos, podem adsorver-se nos revestimentos modificando-lhes o comportamento das superfícies.

Neste trabalho foram estudadas as adsorções, a 25° C, de albumina de soro bovino (BSA) e de hialuronato de sódio (NaHA), duas das macromoléculas presentes no líquido sinovial, a três revestimentos cerâmicos de titânio obtidos por deposição física de vapor (PVD): o nitreto de titânio (TiN), o nitreto de titânio e nióbio (TiNbN) e o carbonitreto de titânio (TiCN).

As técnicas utilizadas no estudo foram a microbalança de cristal de quartzo com análise de dissipação (QCM-D) e a microscopia de força atômica (AFM).

Os resultados obtidos para a adsorção de BSA permitem concluir que não existem diferenças significativas entre a adsorção nos três materiais cerâmicos, e que, a proteína se adsorve em monocamada uma vez que as espessuras de filme são compatíveis com as suas dimensões moleculares.

Do estudo da adsorção de NaHA aos revestimentos cerâmicos e a monocamadas de BSA concluiu-se que interação entre as moléculas de BSA e NaHA é fraca a pH neutro.

Determinaram-se as forças de adesão, por AFM em água, entre os pares superfície-*tip*: TiN-BSA, TiNbN-BSA, BSA(TiN)-BSA e BSA(TiNbN)-BSA, e verificou-se que eram superiores às forças de van der Waals estimadas pelo tratamento de Hamaker.

Palavras-chave: Albumina, Ácido Hialurónico, Adsorção, Microbalança de Cristal de Quartzo, Microscopia de Força Atômica, Nitretos de Titânio

Abstract

The use of coatings on surfaces has been a strategy used to improve the performance of medical devices. Titanium ceramic coatings are considered biocompatible with good mechanical and tribological properties. When the coating surface is in contact with body fluids adsorption of macromolecules takes place and can modify the behavior of the surface.

In this work the adsorption, at 25 °C, of bovine serum albumin (BSA) and sodium hyaluronate (NaHA) were studied in three titanium ceramic coatings deposited by physical vapor deposition (PVD): titanium nitride (TiN), titanium niobium nitride (TiNbN) and titanium carbonitride (TiCN).

The techniques used in the adsorption study were the quartz crystal microbalance with dissipation analysis (QCM-D) and the atomic force microscopy (AFM).

The results for the adsorption of BSA suggest that there is no significant difference between the adsorption in the three ceramic materials. We also found that the BSA adsorbs onto titanium nitrides surface in a monolayer because the thickness of the film, determined by QCM-D and AFM, is compatible with the molecular dimension of the protein.

With the study of the adsorption of NaHA onto the titanium nitrides and onto the monolayer of BSA we conclude that, at neutral pH, the interaction between the NaHA and BSA is weak.

The adhesion forces between the pairs: TiN-BSA, TiNbN-BSA, BSA(TiN)-BSA e BSA(TiNbN)-BSA, were determined in water medium by AFM. Experimental results were higher than the van der Waals forces estimated by Hamaker method.

Keywords: Albumin, Hyaluronic Acid, Adsorption, Quartz Crystal Microbalance, Atomic Force Microscopy, Titanium Nitrides

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Índice	vii
Lista de Símbolos e Abreviaturas	ix
Símbolos.....	ix
Abreviaturas e fórmulas químicas.....	xi
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xv
1. Introdução	1
2. Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Biomateriais	3
2.1.1. Biocompatibilidade e Requisitos dos Biomateriais	3
2.1.2. Tipos de Biomateriais.....	4
2.1.2.1. Biomateriais Metálicos	4
2.1.2.2. Biomateriais Poliméricos.....	6
2.1.2.3. Biomateriais Cerâmicos	7
2.1.2.4. Biomateriais Compósitos.....	8
2.1.3. Degradação de Biomateriais Implantados	9
2.2. Caracterização de Superfícies	9
2.2.1. Composição Química	10
2.2.2. Topografia	11
2.3. Modificação de Superfícies.....	14
2.4. Interação entre Macromoléculas e Superfícies Sólidas	16
2.4.1. Mecanismo de adsorção	16
2.4.1.1. Isotérmicas de adsorção	17
2.4.2. Métodos Analíticos de Medida de Adsorção.....	19
2.4.2.1. QCM-D	19
2.4.2.2. Métodos Ópticos	25
2.4.2.3. Comparação dos métodos	27
2.4.3. Forças de Adesão.....	28
2.5. Materiais em Estudo.....	31
2.5.1. Cerâmicos de Titânio.....	31
2.5.2. Albumina	32
2.5.2.1. Estudos prévios sobre adsorção de Albumina.....	34

2.5.3.	Ácido Hialurónico	37
2.5.3.1.	Estudos prévios sobre propriedades e adsorção de Ácido Hialurónico.....	37
3.	Parte Experimental	39
3.1.	Materiais e Reagentes	39
3.2.	Métodos.....	39
3.2.1.	Preparação de discos e cristais	39
3.2.2.	QCM.....	40
3.2.3.	AFM	41
3.2.4.	XPS	42
4.	Resultados e discussão.....	43
4.1.	Análise dos Substratos por XPS e AFM	43
4.1.1.	XPS	43
4.1.2.	AFM	46
4.2.	Análise das Adsorções	48
4.2.1.	Análise da Adsorção de Albumina por QCM e AFM	48
4.2.2.	Análise da Adsorção de Ácido Hialurónico por QCM.....	55
4.2.3.	Análise da Adsorção de Conjunta de Albumina e Hialuronato de Sódio por QCM.....	56
4.3.	Forças de Adesão	57
5.	Conclusão	61
6.	Referências bibliográficas e de internet	63
7.	Anexos.....	69
7.1.	Ensaio na QCM	71
7.2.	Parâmetros utilizados no software da QCM.....	73
7.3.	Índices de refração e constantes dielétricas	73
7.4.	Cálculo de intervalos de confiança.....	73

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Símbolos

A_q	Área do cristal de quartzo exposta à adsorção
$C_{\text{solv.}}$	Concentração do solvente
D	Factor de dissipação
E	Módulo de elasticidade, ou módulo de Young
f	Frequência de vibração do cristal de quartzo
f_0	Frequência de vibração fundamental, ou de ressonância, do cristal de quartzo
G_f	Módulo de corte do filme adsorvido
G_f'	Parte real do modulo de corte do filme adsorvido (<i>shear storage modulus</i>)
G_f''	Parte imaginária do modulo de corte do filme adsorvido (<i>shear loss modulus</i>)
G_l	Módulo de corte do líquido
h	Constante de Planck
J_f	<i>Shear compliance</i> do filme adsorvido
J_f'	Parte real de <i>Shear compliance</i> do filme adsorvido (<i>shear storage compliance</i>)
J_f''	Parte imaginária de <i>Shear compliance</i> do filme adsorvido (<i>shear loss compliance</i>)
k	Constante de Boltzmann
k_c	Constante elástica do cantilever
K	Temperatura absoluta (Kelvin)
K_F	Constante K da isotérmica de Freunlich
K_L	Constante K da isotérmica de Langmuir
K_R	Constante de frequência do cristal de quartzo <i>AT-cut</i> (1664 m/s)
L	Comprimento
n	Índice de refração
n_F	Constante n da isotérmica de Freunlich
p	Número de ensaios da amostra
s	Desvio padrão da amostra
t	Espessura
t	Valor da distribuição t-Student para os parâmetros m, s e β
T	Temperatura
t_f	Espessura do filme
t_q	Espessura do cristal de quartzo
ν_e	Frequência de absorção electrónica
ν_q	Velocidade de corte do cristal de quartzo (<i>shear wave velocity</i>)
w	Largura
α	Ângulo característico dos cantilever em V

β	Confiança da estimativa de intervalos de confiança
ΔD	Variação da dissipação do cristal de quartzo
Δf	Variação da frequência de vibração do cristal de quartzo
ϵ	Constante dieléctrica
Γ	Massa adsorvida ou concentração superficial
Γ_{∞}	Massa adsorvida, ou concentração superficial, limite da isotérmica de Langmuir
η_f	Viscosidade do filme
η_l	Viscosidade do líquido
μ_f	Elasticidade do filme (módulo de corte)
μ_q	Elasticidade do quartzo (módulo de corte)
ρ_f	Densidade do filme
ρ_l	Densidade do líquido
ρ_q	Densidade do quartzo
ω	Frequência angular
ζ	Impedância acústica local
ζ'	Parte real da impedância acústica local
ζ''	Parte imaginária da impedância acústica local
$^{\circ}C$	Temperatura (graus centígrados)

Abreviaturas e fórmulas químicas

AET	2-aminoethanotiol
ABS	Acrilonitrilo-butadieno-estireno
AFM	Microscopia de força atómica (<i>atomic force microscopy</i>)
Al ₂ O ₃	Óxido de Alumínio ou Alumina
BAW	<i>Bulk acoustic wave</i>
BSA	Albumina bovina do soro de plasma (<i>Bovine serum albumin</i>)
BVD	Modelo de Butterworth-van-Dyke
CVD	Deposição química de vapor (<i>chemical vapor deposition</i>)
DCA	<i>Dynamic contact angle</i>
DLC	<i>Diamond-like carbon</i>
EM	Ethylmercaptan
EQCM	Microbalança electroquímica de cristal de quartzo (<i>electrochemical quartz crystal microbalance</i>)
FPW	<i>Flexural plate wave</i>
HA	Ácido hialurónico (<i>Hyaluronic acid</i>)
HA	Hidroxiapatite
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HDPE	Polietileno de alta densidade (<i>high density polyethylene</i>)
HSA	Albumina humana do soro de plasma (<i>Human serum albumin</i>)
LDPE	Polietileno de baixa densidade (<i>low density polyethylene</i>)
LLDPE	Polietileno linear de baixa densidade (<i>linear low density polyethylene</i>)
ME	2-mercaptoetanol
NaHA	Hialuronato de sódio (<i>Sodium hyaluronate</i>)
OWLS	<i>Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy</i>
PAN	Polianilina
PBS	<i>Phosphate buffer solution</i>
PET	Polietilenoteraftalato
PIII	<i>Plasma immersion ion implantation</i>
PLA	<i>Poly lactide</i>
PLG	<i>Polyglycolide</i>
PLGA	<i>Poly(glycolide-co-lactide)</i>
PLLA	<i>poly-L-lactide</i>
PMLG	<i>Poly(g-methyl-L-glutamate)</i>
PMMA	Polimetilmetacrilato
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PTFE	Politetrafluoretileno
PU	Poliuretano
PVC	Poli(cloreto de vinilo) (<i>polyvinylchloride</i>)
PVD	Deposição física de vapor (<i>physical vapor deposition</i>)
QCM	Microbalança de cristal de quartzo (<i>quartz crystal microbalance</i>)
QCM-D	Microbalança de cristal de quartzo com dissipação (<i>quartz crystal microbalance with dissipation</i>)
RiFS	<i>Reflectometric Interference Spectroscopy</i>

RSA	Adsorção sequencial aleatória (<i>Random Sequential Adsorption</i>)
SAM	<i>Self-assembled monolayers</i>
SAR	<i>Scanning Angle Reflectometry</i>
SAW	<i>Surface acoustic wave</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	<i>Scanning tunneling microscopy</i>
SH-APM	<i>Shear horizontal acoustic plate mode</i>
SPM	<i>Scanning probe microscopy</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
STM	<i>Scanning tunneling microscopy</i>
TGA	Ácido tioglicólico (thioglycolic acid)
Ti	Titânio (<i>titanium</i>)
TiCN	Carbonitreto de titânio (<i>titanium carbonitride</i>)
TiCN	Carboneto de titânio (<i>titanium carbide</i>)
TiN	Nitreto de titânio (<i>titanium nitride</i>)
TiNbN	Nitreto de titânio-nióbio (<i>titanium-niobium nitride</i>)
TiO ₂	Dióxido de titânio
TSM	<i>Thickness shear mode</i>
UHMWPE	Polietileno de ultra alto peso molecular (<i>ultra high molecular weight polyethylene</i>)
VLDPE	Polietileno de muito baixa densidade (<i>very low density polyethylene</i>)
XPS	Espectroscopia fotoelectrónica de raios-X (<i>x-ray photoelectron spectroscopy</i>)

Lista de Figuras

Figura 1 – Processo de ejeção de um fotoelectrão.....	10
Figura 2 – Esquema de funcionamento do AFM.....	12
Figura 3 – Modelos geométricos dos cantilevers.	13
Figura 4 – Processo de adsorção de uma proteína.....	16
Figura 5 – Representação gráfica de ΔG_{ads}	16
Figura 6 – Quatro tipos de ressonadores de quartzo: a) TSM, b) FPW, c) SAW e d) SH-APM.	21
Figura 7 – Modelo eléctrico de Butterworth-van-Dyke.	23
Figura 8 – Esquema de funcionamento da elipsometria.	25
Figura 9 – Esquema de funcionamento do SPR.	26
Figura 10 – Esquema de funcionamento da OWLS.	27
Figura 11 – Definição da distância entre a superfície e a tip.....	28
Figura 12 – Gráficos característicos de I_{PSD} vs. distância e força vs. distância na aproximação da <i>tip</i> à superfície admitindo que é superfície indeformável. Os casos a) e b) correspondem à inexistência de forças; os casos c) e d) correspondem a uma força atractiva e os casos e) e f) a uma força repulsiva.	29
Figura 13 – Diferenças entre as curvas de aproximação, linha a), e afastamento, linha b).	29
Figura 14 – Estrutura terciária da HSA complexada com ácido palmítico (cadeias cinzentas claras).	33
Figura 15 – Modelos de adsorção da albumina side-on e end-on.....	34
Figura 16 – Estrutura do hialuronato.....	37
Figura 17 – Espectros XPS de: a) TiN, b) TiNbN e c) TiCN.	44
Figura 18 – Exemplos de desconvoluções de bandas das orbitais a) Ti2p, b) Nb2p, c) N1s, d) O1s e e) C1s.....	45
Figura 19 – Imagens topográficas 3D de: a) aço não polido, b) TiNbN não polido. Em baixo apresentam-se os perfis (a cheio e tracejado) das linhas seleccionadas nas imagens topográficas: c) aço não polido, d) TiNbN não polido.	46
Figura 20 – Imagens topográficas 3D de: a) TiCN polido 30x30 μm , b) TiCN polido 10x10 μm . Em baixo apresentam-se os perfis (a cheio e tracejado) das linhas seleccionadas nas imagens topográficas a) e b).....	47
Figura 21 – Ensaios, curta e longa duração, de adsorção de BSA (10 mg/mL) a superfície de TiNbN: a) ensaio NbTiN 10 5.21; b) ensaio NbTiN 10 8.9.	48
Figura 22 – Variação absoluta (quadrado) e relativa (triângulo) de massa adsorvida após o rinsing: a) em TiN, b) em TiNbN e c) em TiCN.	48
Figura 23 – Dissipação média do filme de BSA em TiN em várias harmónicas: a) dissipação total, antes e após do <i>rinsing</i> , nas concentrações de 0.6 mg/mL (ponteadado), 4 mg/mL (branco) e 10 mg/mL (linhas diagonais), em que para cada concentração a barra da esquerda corresponde ao “antes” e a da direita ao “após”; b) $\Delta D/(\Delta f/5)$, após o <i>rinsing</i> , nas concentrações 0.05 mg/mL (traço), 0.6 mg/mL (losango), 4 mg/mL (quadrado), 10 mg/mL (círculo) e 15 mg/mL (triângulo).....	49
Figura 24 – Médias de Γ na adsorção em TiN a várias concentrações em várias harmónicas: 0.05 mg/mL (traço), 0.6 mg/mL (losango), 4 mg/mL (quadrado), 10 mg/mL (círculo) e 15 mg/mL (triângulo).	50
Figura 25 – Ajuste de isotérmicas de adsorção de BSA, médias experimentais e erros associados: a) TiN, b) TiNbN e c) TiCN. Isotérmica de Langmuir: linha a cheio, e isotérmica de Freundlich: linha ponteadada.....	50

Figura 26 – Ajuste de isotérmicas de adsorção de BSA a vários materiais: TiN (linha a cheio), TiNbN (pontado) e TiCN (tracejado). Médias experimentais: TiN (losango), TiNbN (quadrado) e TiCN (triângulo). a) isotérmica de Langmuir e b) isotérmica de Freundlich.....	51
Figura 27 – a) Módulo de corte e b) viscosidade dos filmes de BSA em TiN (pontado), TiNbN (branco) e TiCN (linhas diagonais).....	52
Figura 28 – Espessura dos filmes de BSA por QCM-D, após o <i>rinsing</i> , em TiN (pontado), TiNbN (branco) e TiCN (linhas diagonais).....	53
Figura 29 – Riscagem de filmes de BSA em AFM, após o <i>rinsing</i> : a) imagem topográfica 3D da riscagem em TiNbN, b) perfil da linha seleccionada na imagem topográfica, c) perfil da riscagem em TiN, d) perfil da riscagem em TiCN.	53
Figura 30– Comparação entre imagens topográficas de substratos sem e com BSA: a) TiN sem BSA, b) TiN com BSA, c) TiNbN sem BSA, d) TiNbN com BSA, e) TiCN sem BSA e f)) TiCN com BSA.	54
Figura 31 – Ensaios de adsorção de hialuronato de sódio (1 mg/mL) a superfície de TiNbN: a) ensaio NbTiN HA1 5.23;	55
Figura 32 – a) dissipação total, em várias harmónicas, do filme de hialuronato de sódio, antes e após o <i>rinsing</i> , barras esquerda e direita, respectivamente; b) $\Delta D/(\Delta F/5)$ após o <i>rinsing</i>	56
Figura 33 – Força de adesão, a seco, entre superfície de TiN polida e <i>tip</i> de Si ₃ N ₄ : a) exemplo da curva força <i>versus</i> distância, b) histograma das forças obtidas.	57
Figura 34 – Exemplos de curvas de força vs. distância, em água, tip de Si ₃ N ₄ e: a) TiN, b) TiNbN.	58
Figura 35 – Forças de adesão, em água, com o substrato TiN. a) exemplo de curva força vs. distância entre TiN e Si ₃ N ₄ funcionalizado com BSA, b) exemplo de curva f vs. d entre TiN (com camada de BSA) e Si ₃ N ₄ funcionalizado com BSA, c) histograma das forças entre TiN e Si ₃ N ₄ funcionalizado com BSA, d) histograma das forças entre TiN (com camada de BSA) e Si ₃ N ₄ funcionalizado com BSA.	59
Figura 36 – Forças de adesão, em água, com o substrato TiNbN. a) exemplo de curva força vs. distância entre TiNbN e Si ₃ N ₄ funcionalizado com BSA, b) exemplo de curva f vs. d entre TiNbN (com camada de BSA) e Si ₃ N ₄ funcionalizado com BSA, c) histograma das forças entre TiNbN e Si ₃ N ₄ funcionalizado com BSA, d) histograma das forças entre TiNbN (com camada de BSA) e Si ₃ N ₄ funcionalizado com BSA.	59

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades físicas e mecânicas de alguns biomateriais metálicos.	6
Tabela 2 – Principais tipos de polímeros utilizados como biomateriais.	6
Tabela 3 – Propriedades físicas e mecânicas de alguns biomateriais cerâmicos.	8
Tabela 4 – Comparação da dureza e módulo de Young de cerâmicos de titânio com ligas de titânio e aço.	32
Tabela 5 – Concentrações superficiais máximas da albumina adsorvida em <i>side-on</i> ou <i>end-on</i>	34
Tabela 6 – Concentrações superficiais obtidas por QCM para a adsorção de BSA a vários materiais.	35
Tabela 7 – Comparação da adsorção de BSA a TiO ₂ estudada por QCM e OWLS.	36
Tabela 8 – Comparação da adsorção de BSA a TiO ₂ estudada por QCM, OWLS e elipsometria.	36
Tabela 9 – Espessura de HSA adsorvida em mica e titânio comercial, em seco e líquido.	36
Tabela 10 – Desconvolução das bandas de XPS e atribuição dos picos a ligações químicas.	44
Tabela 11 – Composição química percentual elementar superficial dos revestimentos.	44
Tabela 12 – Gammas de rugosidade média R _a , obtida por AFM, de aço utilizado como substrato e dos revestimentos.	47
Tabela 13 – Diferenças percentuais entre as médias de concentração superficial entre os modelos de Sauerbrey Modificado e Sauerbrey.	49
Tabela 14 – Médias da massa do filme adsorvido em vários materiais e em várias concentrações da solução de BSA (modelo de Sauerbrey modificado).	50
Tabela 15 – Parâmetros obtidos por ajuste dos valores experimentais às isotérmicas de Langmuir e Freunlich.	51
Tabela 16 – Espessuras das riscagens em AFM.	54
Tabela 17 – Comparação entre a rugosidade, R _a , e a distância <i>peak-to-valley</i> , pV, das superfícies sem e com proteína da Figura 30.	55
Tabela 18 – Forças de adesão em líquido.	58
Tabela 19 – Constante de Hamaker e força de van der Waals.	60
Tabela 20 – Constantes de elasticidade dos <i>cantilevers</i>	60
Tabela 21 – Ensaios de adsorção de BSA em TiN na QCM.	71
Tabela 22 – Ensaios de adsorção de BSA em TiNbN na QCM.	71
Tabela 23 – Ensaios de adsorção de BSA em TiCN na QCM.	72
Tabela 24 – Ensaios de adsorção de NaHA em TiNbN na QCM.	72
Tabela 25 – Ensaios de adsorção de simultânea de BSA e NaHA em TiN na QCM.	72
Tabela 26 – Parâmetros necessários no software da QCM.	73
Tabela 27 – Constantes dielétricas e índices de refração de vários materiais.	73

1. Introdução

O objectivo deste trabalho centrou-se no estudo da adsorção de albumina e ácido hialurónico a três cerâmicos de titânio (nitreto de titânio, TiN, nitreto de titânio e nióbio, TiNbN e carbonitreto de titânio, TiCN) tendo em vista a utilização destes como biomateriais, mais especificamente como revestimentos de próteses ortopédicas de articulações.

As próteses ortopédicas de articulações, em especial da anca e do joelho, são constituídas por partes móveis que deslizam entre si, pelo que o seu comportamento tribológico (atrito e desgaste) dos materiais de que são feitas.

As próteses da anca e do joelho são, geralmente, constituídas por uma parte metálica, fixa no fémur, e uma parte de material polimérico, fixa na tibia (na prótese do joelho) ou no acetábulo (na prótese da anca). Tradicionalmente utiliza como material polimérico o polietileno de muito alto peso molecular, *ultra high molecular weight polyethylene*, (UHMWPE) e como materiais metálicos o aço, ligas de cobalto-crómio-molibdénio e ligas de titânio, [1].

As principais causas de falha, ou mau desempenho, das próteses são o desgaste dos materiais, por fricção e por corrosão, que provocam a libertação de partículas causadoras de inflamações nos tecidos vivos e desconforto nos pacientes.

Uma das formas de diminuir o desgaste é a utilização de compostos mais resistentes, como os cerâmicos de titânio, para revestir as partes metálicas das próteses. Existem vários estudos sobre as propriedades mecânicas e tribológicas dos cerâmicos de titânio, mas muito poucos sobre a sua biocompatibilidade e a capacidade para adsorverem proteínas, pelo menos de forma quantitativa.

A adsorção de proteínas a superfícies é um processo importante no estudo de biomateriais uma vez que estas desempenham um papel relevante na biocompatibilidade e adesão celular. De facto a adsorção de proteínas é um processo quase instantâneo, pelo que, quando uma célula se aproxima da superfície do biomaterial interage com a camada de proteína e não com a superfície em si.

A escolha da albumina como proteína de estudo deve-se à sua importância no organismo humano uma vez que é a mais abundante no plasma sanguíneo. Utilizou-se a albumina de soro bovino (BSA) porque é semelhante à humana e mais barata. O estudo da adsorção de ácido hialurónico, na forma de hialuronato de sódio (NaHA), é fundamentado por este ser um dos principais constituintes do líquido sinovial, que é o líquido presente entre as partes móveis das articulações.

Neste trabalho a adsorção foi quantificada através das tecnologias da microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D) e microscopia de força atómica (AFM). Embora sejam tecnologias relativamente recentes, com cerca de duas décadas de utilização, nos últimos dez anos o seu uso generalizou-se de tal forma que na base de dados *Web of Science* existem mais de 2900 e 39000 entradas para QCM e AFM respectivamente.

A tecnologia QCM-D permite, através de modelação matemática, determinar parâmetros físicos como a massa, a espessura, a elasticidade e a viscosidade dos filmes de proteína adsorvidos a uma superfície, enquanto que por AFM se obtêm imagens topográficas das superfícies, em meio seco ou líquido, e forças de adesão.

O presente trabalho insere-se num projecto de investigação em curso sobre o comportamento tribológico de vários materiais utilizados em próteses e o efeito da composição do fluído lubrificante nesse comportamento, [2-8].

Neste texto é feita uma pequena introdução, no capítulo 2, aos biomateriais, às técnicas de caracterização de superfícies (em particular a QCM-D e AFM) e à interacção entre macromoléculas e superfícies sólidas. Descrevem-se os cerâmicos de titânio e as macromoléculas estudadas (BSA e NaHA) e faz-se uma resenha bibliográfica sobre os estudos de adsorção envolvendo estas macromoléculas.

No capítulo 3 descrevem a parte experimental. No capítulo 4 apresentam-se os resultados, que são discutidos e comparados com a informação obtida na resenha bibliográfica. Finalmente no capítulo 5 apresentam-se as conclusões.

2. Fundamentos Teóricos e Revisão Bibliográfica

2.1. Biomateriais

A principal característica que distingue um biomaterial de qualquer outro material é a sua capacidade de coexistência, em contacto, com tecidos vivos sem lhes causar danos inaceitáveis, [9].

A longo prazo, um biomaterial deve ser não-tóxico, mas a curto prazo esta propriedade não é imperativa. Por exemplo no combate a doenças oncológicas utilizam-se medicamentos que destroem células pré-definidas, [10]. Verifica-se assim que a definição de biomaterial não pode ser demasiado restritiva.

Desde a antiguidade que são utilizados materiais como substituintes de tecidos vivos, como por exemplo dentes de ouro e globos oculares de vidro, mas foi apenas no século XX que a utilização de implantes se generalizou.

Após algumas décadas de indefinição nas definições de biomaterial e biocompatibilidade estas estabilizaram nas enunciadas por David Williams em 1987, [10]:

“Biomaterial é um material não-viável usado em dispositivos (médicos), projectado para interagir com sistemas biológicos.”

“Biocompatibilidade é a capacidade de um material, numa situação específica, desencadear uma resposta adequada no hospedeiro.”

2.1.1. Biocompatibilidade e Requisitos dos Biomateriais

Os biomateriais são utilizados em várias aplicações médicas como por exemplo em implantes, equipamento cirúrgico, membranas de diálise, e biosensores. Torna-se assim evidente que os requisitos mecânicos e de biocompatibilidade variem de aplicação para aplicação. Por exemplo a resistência à corrosão e ao desgaste é mais importante nos dispositivos implantados por um longo período de tempo (ou para toda a vida) do que nas placas de fixação ortopédica provisória. Outro exemplo é o da biodegradabilidade. Os materiais utilizados actualmente nas suturas podem ser biodegradáveis, o que é completamente indesejável em implantes de longa duração.

A biocompatibilidade, o desempenho dos biomateriais e a resposta dos tecidos vivos à presença de materiais estranhos é influenciada pelas características intrínsecas dos materiais, pelas condições do doente (idade, sexo, estado geral de saúde, estilo de vida, etc.) e pela qualidade das intervenções médicas.

O desempenho dos biomateriais depende das suas propriedades que podem ser agrupadas entre as que são em massa e as que são superficiais. Todas elas dependem da composição química, da morfologia e da macro e microporosidade. Entre as propriedades em massa importantes encontram-se a cristalinidade, as propriedades

elásticas. As propriedades superficiais mais importantes são a topografia, a hidrofobicidade, a resistência à corrosão e ao desgaste, a cor, a resistência térmica e as propriedades reológicas.

A biocompatibilidade e a compatibilidade sanguínea podem ser testadas utilizando métodos *in vitro* ou *in vivo*. Os métodos *in vitro* são menos dispendiosos e mais fáceis de realizar, no entanto, a aceitação dos seus resultados deve ser feita com precaução uma vez que os modelos e condições adoptadas podem não ser válidas para aplicação *in vivo*. Por outro lado, a maior complexidade dos sistemas *in vivo* tornam a sua realização difícil porque podem ser afectados por factores de difícil controlo ou por factores que nem sequer foram tomados em conta no modelo. Além disso, em certos casos testes *in vivo* são eticamente duvidosos.

A definição de compatibilidade sanguínea é semelhante à da biocompatibilidade mas aplicada aos dispositivos que entram em contacto com o sangue. Assim um material será compatível com o sangue se tiver a capacidade de interagir com ele sem produzir reacções adversas. Para além das propriedades descritas atrás, a condição essencial para a compatibilidade sanguínea é que não se formem trombos.

2.1.2. Tipos de Biomateriais

O bom desempenho dos biomateriais depende do uso que se faz deles. Nas secções seguintes descrevem-se em maior pormenor os principais tipos de biomateriais, as suas propriedades, aplicações e os problemas associados às utilizações mais frequentes.

Tal como os materiais, os biomateriais podem ser classificados em quatro tipos: os metálicos, os poliméricos, os cerâmicos e os compósitos.

2.1.2.1. Biomateriais Metálicos

Materiais metálicos são materiais inorgânicos constituídos por elementos metálicos, ou misturas destes, que se designam por ligas metálicas. As ligas metálicas podem conter elementos não metálicos, no entanto estes não se ligam covalentemente à fase metálica do material.

Os materiais metálicos dividem-se em duas classes consoante o seu teor em ferro: os materiais metálicos ferrosos e os materiais metálicos não ferrosos. O aço é um exemplo da primeira classe.

As propriedades de condução eléctrica, térmica e de deformação sem fractura dos materiais metálicos sólidos deve-se em grande parte à ligação metálica na qual os electrões de valência dos átomos são partilhados pela vizinhança. Os electrões de valência encontram-se fracamente ligados aos núcleos metálicos positivos e por isso podem movimentar-se mais ou menos livremente, [11,12].

Existem três tipos principais de materiais metálicos utilizados em implantes: o aço inoxidável; as ligas de cobalto-crómio; e o titânio e ligas de titânio. Além destes são ainda utilizadas as amálgamas de mercúrio e ligas de ouro em medicina dentária e outros metais em situações muito específicas como a platina ou o paládio. Estes últimos embora tenham elevada resistência à corrosão não podem ser utilizados em funções estruturais devido às suas baixas resistências mecânicas, [12]. Muitos dos materiais metálicos apresentam o inconveniente, muitas vezes grave, da libertação de iões metálicos tóxicos.

Descrevem-se a seguir os três principais tipos de biomateriais metálicos.

Aço inoxidável

O aço austenítico 316L é o tipo de aço recomendado para utilização em implantes devido à sua elevada resistência mecânica e à corrosão quando comparados com outros aços.

Constituído principalmente por ferro (60-65%), o aço 316L tem teor elevado de cromo para melhorar a resistência à corrosão através da formação da camada protectora superficial de Cr_2O_3 . No entanto, o cromo tem o efeito indesejável de reduzir a resistência mecânica ao estabilizar a fase ferrítica mais frágil que a austenítica. Para contrapor este efeito, o teor em níquel é aumentado de modo a estabilizar a fase austenítica. O teor em carbono não deve ser superior a 0.03% para conter o risco de precipitação de carbeto nas superfícies dos grãos o que poderia levar à destruição da camada natural de óxido e ao aumento da corrosão, [10].

Ligas de cobalto-cromo

Das várias ligas da mistura de cobalto, cromo e outros metais, apenas duas são usadas extensivamente em implantes: a liga de cobalto-cromo-molibdénio, CoCrMo, e a liga de cobalto-níquel-cromo-molibdénio, CoNiCrMo.

A liga CoCrMo é usada em implantes dentários há várias décadas e mais recentemente em próteses de articulações. A adição de molibdénio tem como objectivo a obtenção de grãos mais finos e com isso aumentar a resistência mecânica, [12].

A utilização da liga CoNiCrMo é mais recente e aplica-se principalmente nas hastes de fixação de próteses que sofram cargas elevadas.

Titânio e ligas de titânio

O titânio utilizado em implantes designa-se por CP Titanium, de *commercially pure titanium*, e existe em quatro graus de pureza, sendo que o teor em titânio varia entre 98.9 e 99.6%. A estrutura do titânio até 882 °C é hexagonal compacta e a temperatura superior é cúbica de corpo centrado.

O titânio tem boa resistência à corrosão devido à camada de óxido de titânio com cerca de 10 nm que se forma à superfície. A resistência mecânica aumenta com o teor de impurezas.

A principal liga de titânio utilizada em implantes é a designada por Ti6Al4V que contém entre 5.5 e 6.5% de alumínio e entre 3.5 e 4.5% de vanádio.

As ligas de titânio e níquel (nitinol) apresentam a propriedade de memória de forma que é usada em algumas aplicações específicas.

Na Tabela 1 são apresentadas algumas propriedades físicas e mecânicas dos principais biomateriais metálicos, [12]. Algumas propriedades apresentam um intervalo de variação grande porque dependem dos tratamentos de envelhecimento a que os materiais são sujeitos.

Tabela 1 – Propriedades físicas e mecânicas de alguns biomateriais metálicos.

Material	Densidade (g/cm ³)	Módulo de Young (GPa)	Resistência à tração (MPa)
Aço 316L	7.9	190	590 – 1350
CoCrMo	8.3	210	655
CoNiCrMo	9.2	232	793 – 1795
Ti (CP)	4.5	110	240 – 760
Ti6Al4V	4.5	116	860 – 1100

2.1.2.2. Biomateriais Poliméricos

Os materiais poliméricos são geralmente constituídos por cadeias ou redes de átomos de carbono, ligados covalentemente entre si, às quais podem ligar-se outros elementos. Um polímero resulta na repetição de várias pequenas unidades: os monómeros.

Nos seres vivos existem polímeros naturais, como a celulose ou o DNA, mas neste texto apenas serão referidos polímeros sintéticos utilizados em implantes.

Apesar da miríade de polímeros possíveis de serem sintetizados, apenas cerca de duas dezenas têm utilização como biomateriais e menos ainda em implantes.

Na Tabela 2 referem-se os principais tipos de polímeros utilizados como biomateriais e suas aplicações, [12].

Tabela 2 – Principais tipos de polímeros utilizados como biomateriais.

Material	Aplicações
Poliétileno (PE)	
UHMWPE	➤ Implantes ortopédicos em especial próteses da anca (acetábulo), da tíbia e do joelho.
LDPE	➤ Recipientes flexíveis
VLDPE	➤ Tubagens
Polipropileno (PP)	➤ Seringas, membranas, enxertos vasculares e suturas
Polimetilmetacrilato (PMMA)	➤ Lentes de contacto externas e implantadas, próteses dentárias, cimento de fixação óssea de próteses, sistema de bombagem de sangue
Poliuretanos (PU)	➤ Revestimento de implantes (por exemplo de <i>pacemakers</i>)
Poliétilenotereftalato (PET)	➤ Excertos vasculares, suturas e redes de suporte
Poliâmidas (Nylons)	➤ Sutures
Borrachas e Silicones	➤ Implantes de reconstrução
Acrlonitrilo-butadieno-estireno (ABS)	➤ Grampos e material de laboratório
Poliestireno (PS)	➤ Material de laboratório
Policloreto de vinilo (PVC)	➤ Cateteres, tubagens, recipientes
Polímeros biodegradáveis (PLA, PGA, PLGA, etc.)	➤ Transporte de fármacos <i>in vivo</i>

2.1.2.3. Biomateriais Cerâmicos

A definição de material cerâmico é bastante abrangente, uma vez que são considerados cerâmicos os materiais inorgânicos constituídos por elementos metálicos e não metálicos ligados quimicamente entre si, [11]. A maior parte dos cerâmicos de interesse, do ponto de vista dos biomateriais, pode ser englobado numa das três seguintes classes: bioinertes, semi-inertes, e não-inertes, [12].

Os materiais bioinertes têm elevada resistência à corrosão e ao desgaste pelo que mantêm as suas propriedades quando implantados em tecido vivo, daí que sejam utilizados com fins estruturais e de suporte. Dos cerâmicos bioinertes com maior interesse destacam-se a alumina, a zircónia, os aluminatos de cálcio e a hidroxiapatite densa.

Os materiais não-inertes, também designados por cerâmicos biodegradáveis, sofrem degradação após implantação e vão sendo substituídos por tecidos vivos. A maior parte dos cerâmicos biodegradáveis são variações e derivados do fosfato de cálcio. Outro material biodegradável é o sulfato de cálcio. A principal utilização destes materiais é na substituição e reparação dos tecidos ósseos.

A bioactividade dos biomateriais semi-inertes é intermédia em relação às duas classes anteriores uma vez que não se degradam como os biodegradáveis mas formam ligações fortes com os tecidos adjacentes. Os principais materiais semi-inertes são os vidros bioactivos, como o *Bioglass*, o *Ceravital* e o vidro *A-W*, e alguns tipos de hidroxiapatite.

No entanto os materiais cerâmicos apresentam o inconveniente de sofrerem fractura mais facilmente, comparativamente, que os materiais metálicos.

Descrevem-se a seguir alguns dos biomateriais cerâmicos mais usados em implantes.

Alumina

A alumina é óxido de alumínio, Al_2O_3 , de elevada pureza que se obtém por calcinação a partir de minérios como a bauxite. A alumina utilizada em implantes deve ter um teor de Al_2O_3 superior a 99.5%, enquanto que o teor combinado de SiO_2 e de óxidos alcalinos deve ser inferior a 0.1%, [12].

A elevada dureza da alumina, em conjugação com a elevada resistência ao desgaste, torna a alumina num material com bastante aceitação para uso em implantes de suporte, como por exemplo as cabeças femorais dos implantes de anca. Outras utilizações da alumina são os implantes do joelho, substitutos de segmentos ósseos, reconstruções faciais e implantes dentários, [10].

Zircónia

A zircónia é o óxido de zircónio, ZrO_2 , que se obtém a partir do minério ZrSiO_4 , e é também utilizada em cabeças femorais, [12-13].

A zircónia apresenta maior resistência e menor módulo de Young comparativamente com a alumina.

Fosfato de Cálcio (Hidroxiapatite)

O fosfato de cálcio pode cristalizar-se sob duas formas: a hidroxiapatite e a β -whitlockite, [12,14]. Ambas são compatíveis com o tecido ósseo e podem ser utilizadas como seu substituto. Muitas vezes co-existem as duas formas simultaneamente. No entanto por ter maior semelhança com a estrutura mineral óssea a hidroxiapatite é a preferida.

A fórmula química da hidroxiapatite é $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ e a sua densidade é de cerca de 3.22 g/cm^3 .

Vidros bioativos

Os vidros bioativos diferenciam-se dos vidros comuns por terem uma superfície altamente reactiva em meio aquoso. Esta característica é resultante dos três seguintes factores: 1) a percentagem molar de SiO_2 é inferior a 60%; 2) as percentagens de Na_2O e CaO são superiores nos vidros bioativos; 3) a razão $\text{CaO/P}_2\text{O}_5$ é superior nos vidros bioativos.

Na Tabela 3 são apresentados algumas propriedades físicas e mecânicas dos principais biomateriais cerâmicos, [10, 15].

Tabela 3 – Propriedades físicas e mecânicas de alguns biomateriais cerâmicos.

	Alumina	Zircónia	Fosfato de cálcio	Hidroxiapatite	Vidros bioativos	Vidros A-W
Densidade (g/cm^3)	3.98	5.72-6.05	3.16	3.22	n.d.	3.07
Módulo de Young (Gpa)	400	150-208	4-117	40-117	30-35	118
Dureza (HV)	2400	1120-1200	3.43 ^{a)}	n.d.	n.d.	680

a) em GPa

2.1.2.4. Biomateriais Compósitos

Materiais compósitos são, no âmbito da engenharia de materiais, materiais constituídos por misturas de dois ou mais materiais insolúveis cujas fases e interfaces sejam visíveis a uma macroescala. Este tipo de material consiste numa mistura de materiais de reforço, normalmente descontínuos, com um material ligante, também designada por matriz, [10,11].

Na reconstituição e regeneração óssea são utilizados compósitos de cerâmicos e polímeros como, por exemplo, hidroxiapatite com HDPE, [16,17], ou PP, [18], ou com PLLA (*poly-L-lactide acid*), [19], ou vidros bioativos com polímeros, [20]. Compósitos de hidroxiapatite com aço, [21], e colagénio, [22], têm também sido alvo de estudo.

Na aplicação específica nos acetábulo de próteses de anca foi estudada a utilização de compósitos formados por HDPE, hidroxiapatite e alumina, [23] e em medicina dentária são utilizados compósitos de cerâmicos e resinas como substitutos da amálgama de mercúrio, [24,25].

2.1.3. Degradação de Biomateriais Implantados

A degradação dos biomateriais é particularmente importante nos implantes de longa duração e esta pode ocorrer devido a quatro causas principais: a degradação química, quer seja a corrosão nos metais ou a hidrólise dos polímeros; o desgaste; a ruptura por fadiga; e a calcificação.

A degradação química e o desgaste resultam na libertação de pequenas partículas, ou de iões, que se acumulam nos tecidos, causando inflamação, desconforto no paciente, e em casos extremos, a rejeição do implante.

A calcificação é um processo patológico no qual, depósitos de fosfato de cálcio, ou de outros compostos de cálcio, se acumulam nos biomateriais levando em última análise à falha do implante.

2.2. Caracterização de Superfícies

As propriedades e respostas que os materiais apresentam quando aplicados em diversas situações dependem de vários factores como: a sua composição química, a sua morfologia e o ambiente em que são utilizados.

A composição química das superfícies dos materiais é normalmente obtida através de análises por XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*), espectroscopia de infravermelhos ou por espectrometria de massa.

A morfologia e topografia superficiais dos materiais podem ser obtidas por dois tipos principais de métodos: SEM e SPM. Na técnica SEM (*Scanning Electron Microscopy*) as superfícies são bombardeadas com um feixe de electrões de elevada energia que provocam a emissão de electrões secundários. As intensidades dos electrões secundários detectados são função do material e da sua geometria pelo que permitem a construção de imagens tridimensionais da superfície observando-se pormenores até 1 nm, [10,26]. As técnicas SPM (*Scanning Probe Microscopy*) incluem as técnicas STM (*Scanning Tunneling Microscopy*) e AFM (*Atomic Force Microscopy*). As técnicas SPM consistem no varrimento da superfície do material por uma sonda que permite determinar a sua topografia e possivelmente outros parâmetros se o equipamento assim o permitir, [27].

Um parâmetro importante na caracterização da superfície é a dureza, embora esta normalmente se refira ao material em massa e não especificamente à superfície. A dureza é uma medida da resistência do material à deformação quando lhe é aplicada uma carga. Existem vários tipos modos de determinação da dureza sendo o que mais nos interessa a dureza à indentação, [11,28]. A dureza à indentação é obtida medindo a deformação na superfície, provocada por um indentador ao qual é aplicada carga. O valor da dureza depende da carga aplicada pelo que esta deve ser referida. Existem vários métodos de medição da dureza à indentação (Vickers, Knoop, Brinell e outras) mas não existe correlação directa entre ambas porque muitos materiais apresentam comportamentos distintos nos vários métodos, [29].

No caso de a superfície externa ser um revestimento, o valor da dureza é influenciado pelo material do substrato principalmente em revestimentos finos, [30]. É por isso importante conhecer a espessura do revestimento para melhor caracterizar a superfície. A espessura de revestimentos pode ser obtida pelo método *Calo test*, [31].

Finalmente, um parâmetro muito utilizado na caracterização de superfícies é o ângulo de contacto que corresponde ao ângulo formado entre a tangente à interface líquido-vapor no ponto triplo e a interface sólido-líquido numa gota líquida depositada sobre a superfície do sólido, [10]. O ângulo de contacto é um parâmetro indicativo da molhabilidade das superfícies pelos diversos fluidos, que é importante conhecer, por exemplo, nos sistemas biológicos ou na lubrificação de peças mecânicas. Existem vários métodos de determinação do ângulo de contacto sendo o mais simples o método da gota sésil.

Descrevem-se em seguida com mais pormenor os métodos de caracterização de superfícies utilizados no presente trabalho.

2.2.1. Composição Química

No presente trabalho a composição química elementar superficial e tipos de ligações existentes foram determinados por análise XPS pelo que se fará uma pequena descrição acerca desta técnica.

Na análise XPS a amostra é bombardeada com raios X e se os fotões tiverem energia suficiente ao acoplamento com um dos electrões das orbitais internas este será ejectado com uma determinada energia cinética E_c (Figura 1), [32]:

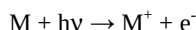


Figura 1 – Processo de ejeção de um fotoelectrão.

em que M identifica um átomo, h é a constante de Planck, ν a frequência da radiação incidente e e^- é um electrão ejectado.

Como as energias dos níveis atómicos são características de cada elemento torna-se possível a análise quantitativa se forem registados o número de electrões emitidos e a sua energia cinética.

A energia de ligação dos electrões (*binding energy*), E_B , é obtida por, [33]:

$$E_B = h\nu - E_c \quad (\text{Equação 1})$$

Um espectro XPS é a representação gráfica do número de electrões emitidos em função da energia de ligação.

Como foi referido, as energias das orbitais são características de cada elemento, mas são também influenciadas pelos átomos vizinhos, por isso os espectros apresentam bandas e não picos bem definidos. A vantagem deste comportamento é que permite a desconvolução da banda do elemento, através de ajuste aos resultados experimentais, em bandas que são atribuídas às ligações químicas formadas por esse elemento na amostra.

2.2.2. Topografia

A topografia das superfícies pode ser determinada por várias tecnologias, no entanto, neste trabalho apenas se utilizou a Microscopia de Força Atômica, AFM (Atomic Force Microscopy) na qual uma sonda percorre e analisa a amostra, linha a linha, obtendo perfis topográficos. Através da composição de perfis topográficos sequenciais obtêm-se imagens topográficas de três dimensões.

O tratamento matemático dos perfis permite determinar vários parâmetros de rugosidade. O termo rugosidade por si só é subjectivo uma vez que uma superfície pode parecer plana mas se analisada com maior pormenor pode revelar asperezas. Tudo depende da escala vertical do perfil topográfico e da resolução lateral com que este foi obtido. Por exemplo, uma superfície metálica polida a olho nú pode parecer suave no entanto se a observarmos por qualquer umas das técnicas descritas verificaremos que apresenta “montanhas” e “vales”. Assim, definem-se os parâmetros estatísticos, utilizados neste trabalho, rugosidade média, R_a , e distância pico-vale (*peak-to-valley roughness*), R_{pV} , pelas seguintes expressões, [34]:

$$R_a = \frac{1}{L} \int_0^L |y(x)| dx \quad (\text{Equação 2})$$

e

$$R_{pV} = \{(cota\ máxima\ da\ amostra) - (cota\ mínima\ da\ amostra)\} \quad (\text{Equação 3})$$

em que L é o comprimento do perfil, x é a distância à origem do perfil e y é a diferença entre a ordenada na posição x e a ordenada média do perfil.

AFM

O AFM (*Atomic Force Microscopy*) é uma técnica, desenvolvida por Binning, Quate e Gerber em 1986, [35], que permite obter a microtopografia em áreas até cerca de $120 \times 120 \mu m^2$ com elevada resolução lateral e vertical.

Existem dois modos de funcionamento do AFM: o modo de contacto e os modos dinâmicos.

No modo de contacto o funcionamento é semelhante ao de um perfilómetro em que a sonda (*tip*), montada sobre um *cantilever*, é arrastada pela superfície. Sobre o *cantilever* incide um laser que é direccionado para um fotodetector. As irregularidades da superfície provocam a deformação do *cantilever* que causa alterações na intensidade de luz incidente no fotodetector que são traduzidas para informações topográficas. No modo de contacto, dependendo do equipamento, obtêm-se resoluções laterais inferiores a 0.1 nm, [27]. A resolução vertical é 0.01 nm e a resolução da força é de 1 pN, [36].

Nos modos dinâmicos (modos de não-contacto e de *tapping*) o *cantilever* é colocado a vibrar próximo da sua frequência de ressonância a uma distância da superfície até 10 nm. As irregularidades da superfície causam

alterações nas forças atractivas de Van der Waals causando variações na amplitude e frequência de vibração do *cantilever* que se traduzem em informações topográficas. Uma vez que nos modos dinâmicos a *tip* não é arrastada pela superfície este deve ser o modo adoptado para analisar superfícies frágeis ou adesivas.

Geralmente em ambos os modos de funcionamento do AFM o suporte do *cantilever* encontra-se imóvel e é a amostra que se desloca na vertical e na horizontal através de um *scanner* piezoeléctrico, (Figura 2).

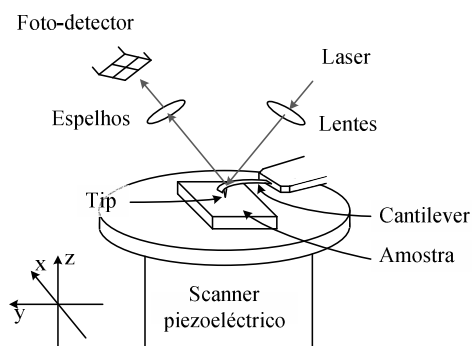


Figura 2 – Esquema de funcionamento do AFM

Além da topografia, a tecnologia AFM permite adquirir valores da força exercida sobre o sistema *tip/cantilever* ao aproximar-se e entrar em contacto com a superfície e sequente afastamento. As curvas força *versus* distância são de particular importância no estudo da adesão de proteínas e células a superfícies, uma vez que são as adesões de ambas que permitem o início da integração da prótese na matriz óssea.

A força é determinada através de uma expressão semelhante à lei de Hooke:

$$F = - k_c \cdot Z_c \quad (\text{Equação 4})$$

em que k_c e Z_c são respectivamente a constante de elasticidade normal e a deflecção do *cantilever* resultante da força. Torna-se por isso fundamental conhecer a constante de elasticidade do *cantilever* para que os valores da força sejam os correctos. Os fabricantes de *cantilevers* fornecem intervalos de valores nominais para k_c . No entanto, para uma determinação rigorosa das forças o valor de k_c deve ser determinado rigorosamente.

Existem três classes de métodos para determinar o valor de k_c , [37]: os métodos dimensionais, os métodos estáticos e os métodos dinâmicos. Os métodos dimensionais não são mais do que a utilização de modelos geométricos e matemáticos para o cálculo de k_c . No entanto, conforme o grau de aproximações e simplificações dos modelos assim se obterá maior ou menos rigor no resultado. Os métodos estáticos consistem na adição de massas calibradas ao *cantilever* para assim determinar a deflecção provocada, ou alternativamente na verificação da deflecção pressionando o *cantilever* contra um *cantilever* pré-calibrado, e assim calcular k_c a partir da curva de calibração. Nos métodos dinâmicos o *cantilever* é colocado a vibrar à frequência de ressonância e é verificada a alteração que uma massa adicional produz na frequência de vibração.

Os *cantilevers* e as *tips* são fabricados, geralmente, em silício ou em nitreto de silício, e a face superior dos *cantilevers* é revestida com ouro ou alumínio para aumentar a reflectividade ao laser. Conhecendo a geometria

dos *cantilevers* é então possível calcular aproximações à constante de elasticidade, k_c . As duas geometrias mais usais são a rectangular e a de forma em V (Figura 3), e os parâmetros geométricos mais importantes são o comprimento, L , a largura, w , a espessura, t_c , e no caso dos cantilevers em forma de V o ângulo de abertura, α , e a distância entre as duas extremidades, b , [38].

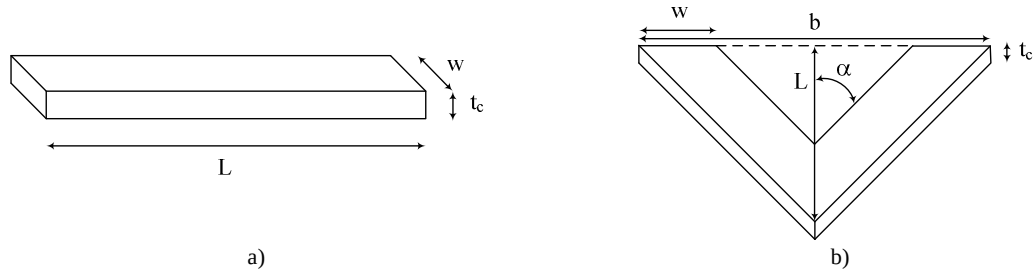


Figura 3 – Modelos geométricos dos cantilevers.

Para *cantilevers* rectangulares em que o comprimento seja muito superior à largura, o valor de k_c pode ser estimado por, [37,38]:

$$k_c = \frac{Ewt_c^3}{4L^3} \quad (\text{Equação 5})$$

em que E é o módulo de Young do material em que o *cantilever* é construído.

Para os *cantilevers* em forma de V existem vários modelos mais ou menos rigorosos consoante as aproximações realizadas. Além dos modelos apresentados de seguida existem muitos outros e pode-se recorrer a métodos numéricos de cálculo, [37,39].

Admitindo que um *cantilever* em forma de V com espessura w pode ser aproximado por dois *cantilevers* rectangulares com espessura $w/2$, a equação anterior transforma-se em, [37,38]:

$$k_c = \frac{Ewt_c^3}{2L^3} \quad (\text{Equação 6})$$

Expressões com maior rigor foram deduzidas por vários autores, [37,38], entre as quais a de Albrecht:

$$k_c = \frac{Ewt_c^3}{2L^3} \left(1 + \frac{b^2}{4L^2} \right)^{-2} \quad (\text{Equação 7})$$

e a de Sader:

$$k_c = \frac{Ewt_c^3}{2L^3} \cos \alpha \left(1 + \frac{4w^3}{b^3} (3\cos \alpha - 2) \right)^{-1} \quad (\text{Equação 8})$$

Todas as expressões anteriores consideram que a *tip* está colocada na extremidade do *cantilever* ou no vértice do V. Quando tal não acontece o valor obtido deve ser corrigido por:

$$k_c = k_{c0} \left(\frac{L}{L-d} \right)^3 \quad (\text{Equação 9})$$

em que k_{c0} é o valor não corrigido e d é a distância do centro da *tip* à extremidade do *cantilever*.

A constante de elasticidade k_c é referente apenas à deflecção do *cantilever* segundo o eixo do z e por isso é também referida na literatura por k_z . No entanto o *cantilever* pode sofrer deflecção segundo ao eixo do x quando é arrastado pela superfície, e define-se a constante de elasticidade lateral, k_x .

Clifford *et. al.*, [37], calcularam a constante de elasticidade normal, por vários métodos, para um conjunto de 20 *cantilevers* rectangulares e triangulares, e compararam com os resultados obtidos por modelações matemáticas complexas. Para o conjunto em análise, e para os métodos apresentados atrás, concluíram que estes se desviam entre 4 e 26%.

A discrepância entre o valor real e os valores obtidos pelos vários métodos devem-se a vários factores como, [37,38]: a dificuldade de obter *cantilevers* com dimensões precisas e reprodutíveis; a dificuldade de conhecer o valor do módulo de Young do *cantilever* uma vez que o *cantilever* é composto não só pelo silício, ou nitreto de silício, mas também por uma camada de material reflector que pode causar constrangimentos à flexão do *cantilever*; e o facto de o valor do módulo de Young de um material em massa, que geralmente é o adoptado, poder não ser aplicável a objectos de tão pequena dimensão.

Os métodos estáticos e dinâmicos também apresentam incertezas elevadas (5 a 10% nos métodos estáticos e 15% a 25% nos métodos dinâmicos) além de que têm como desvantagem o risco, nalguns casos elevado, de danificar a *tip*, [37].

2.3. Modificação de Superfícies

Os processos de modificação têm como objectivo melhorar as propriedades mecânicas e/ou de biocompatibilidade dos materiais, principalmente das superfícies, já que estas desempenham um papel importante na resposta dos organismos aos implantes. Estes processos podem ser classificados em três grupos: processos mecânicos; processos químicos e processos físicos, [40].

Os processos mecânicos, como a maquinação e o polimento, têm como objectivos a remoção de contaminações e a obtenção de superfícies com topografia e rugosidade específicas.

Os tratamentos físicos e químicos dependem do material a modificar e do resultado pretendido. Para a modificação de superfícies metálicas, que se utilizam como substitutos de tecidos duros, os principais métodos são descritos a seguir.

Os métodos químicos mais comuns são: o tratamento químico, a deposição química de vapor e a modificação bioquímica.

Os métodos físicos mais comuns são: a descarga de plasma, a pulverização térmica, a implantação iónica e a deposição física de vapor.

O tratamento químico pode ser ácido ou alcalino. O tratamento ácido é utilizado para a remoção de contaminações e da camada de óxido que fica reduzida a menos de 10 nanómetros. O tratamento alcalino conduz ao aumento da bioactividade uma vez que favorece a posterior formação de apatite, tal como já fora demonstrado em cerâmicos bioactivos.

A deposição química de vapor, ou CVD do inglês *chemical vapor deposition*, é um processo em que ocorrem reacções químicas entre a superfície do substrato e substâncias do meio gasoso envolvente resultando na deposição de compostos não voláteis. Por CVD podem obter-se filmes com cerca de 1 micrómetro de espessura de, por exemplo: TiN, TiC, TiCN e DLC (*diamond-like carbon*).

A modificação das superfícies através de formação de monocamadas SAM (*self-assembled monolayers*) pode ter como objectivo, para além do desempenho biomecânico, a utilização em biosensores. Nas SAM's obtêm-se uma monocamada estável de moléculas orgânicas adsorvidas quimicamente à superfície do metal.

Nos processos físicos de modificação de superfícies não ocorrem reacções químicas entre o substrato e as substâncias precursoras daquelas que se vão depositar.

A descarga de plasma (*plasma glow discharge*) é uma técnica de limpeza e modificação de superfícies efectuada a baixa temperatura e baixa pressão. Durante o tratamento a superfície é bombardeada com electrões e iões e, consoante o gás utilizado (Ar, O₂, N₂), pode ocorrer a oxidação ou nitratação do substrato. Se o gás utilizado for o argón a camada natural de óxido é removida.

Na pulverização térmica as substâncias a serem depositadas são fundidas, por plasma ou por chama, e incidem e condensam sobre a superfície a modificar. A principal diferença entre estas duas variantes é a temperatura à qual funcionam. No processo com chama podem obter-se temperaturas até 3000 K enquanto que no processo com plasma obtêm-se temperaturas até 12000 K, tornando possível o revestimento com materiais de elevado ponto de fusão. As vantagens da pulverização térmica são a possibilidade de se obter revestimentos com espessuras até 5 mm e taxas de deposição elevadas (até 80 g/min). Por pulverização térmica obtêm-se, por exemplo, revestimentos de hidroxiapatite e outros cerâmicos bioactivos.

Os processos de implantação e deposição iónica consistem na introdução de iões no interior da superfície a modificar ou na formação de um filme fino de revestimento. Existem duas variantes principais neste processo: o *beam-line ion implantation* e o *plasma immersion ion implantation* (PIII). No primeiro um feixe de iões é extraído da fonte de iões, acelerado e direccionado à superfície a modificar, o que torna difícil a uniformidade do revestimento nos objectos com forma complexa. No processo PIII forma-se uma camada de plasma em redor do objecto, que orienta os iões a colidirem perpendicularmente com as superfícies daquele e assim obtém-se uma maior uniformidade no revestimento.

Nos processos de deposição física de vapor, ou PVD do inglês *physical vapor deposition*, o material a ser depositado é extraído de uma fonte e acumula-se no substrato formando a camada de revestimento. A extracção da fonte pode ser feita por evaporação, *sputtering* e *ion plating*. Além disso, podem ser também depositadas substâncias originárias dos gases presentes na câmara de deposição. Para ser possível a evaporação a partir de sólidos é necessário que a pressão da câmara esteja entre 0.1 e 1 Pa consoante os materiais a utilizar. No processo de *sputtering* usam-se iões de argón que incidem sobre o cátodo constituído pelo material a depositar, extraindo partículas deste que depois se depositam no substrato a revestir. A pressão da câmara situa-se entre 2 e 5 Pa para

diminuir as colisões entre partículas. Embora a taxa de deposição no processo por *sputtering* seja inferior à do processo por evaporação, o *sputtering* permite o revestimento com materiais cuja evaporação seja difícil. Utilizando a tecnologia PVD podem obter-se revestimentos mais espessos que os obtidos por CVD. Por exemplo, os revestimentos produzidos para o presente trabalhos tinham uma espessura entre 2 e 5 μm .

2.4. Interação entre Macromoléculas e Superfícies Sólidas

2.4.1. Mecanismo de adsorção

In vivo a adsorção de proteínas aos biomateriais inicia-se quase instantaneamente após o contacto entre ambos e antes da chegada de células à interface. Assim, as células interagem principalmente com a camada de proteína e não com o biomaterial em si, o que pode tornar o processo de adsorção das proteínas na etapa controladora da adesão celular e de biocompatibilidade.

Ocorrerá adsorção numa superfície se a termodinâmica do processo (Figura 4) assim o permitir, ou seja, se a variação da energia de Gibbs for negativa, [42], o que significa que o sistema atingiu um patamar mais estável de menor energia (Figura 5).

Superfície + proteína (aq.) $\rightarrow$ Superfície com proteína adsorvida

Figura 4 – Processo de adsorção de uma proteína.

$$\Delta G_{\text{ads.}} = \Delta H_{\text{ads.}} - T\Delta S_{\text{ads.}} < 0 \quad (\text{Equação 10})$$

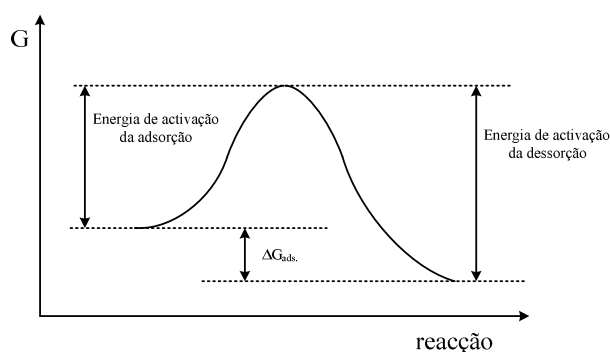


Figura 5 – Representação gráfica de $\Delta G_{\text{ads.}}$

O processo de adsorção pode ser dividido em três etapas: a aproximação, a adsorção e a relaxação, [43].

A aproximação consiste no transporte convectivo ou difusivo das moléculas até próximo da superfície. Longe da superfície, o processo de transporte mais importante é o convectivo, superado pela difusão a distâncias inferiores a 10 μm . A distâncias menores que 1 μm , as forças interfaciais tornam-se decisivas na aproximação e

adsorção de moléculas. As três principais forças interfaciais são a força de solvatação, a força electrostática e as forças de van der Waals.

Quando a molécula atinge e se adsorve na superfície podem ocorrer vários fenómenos: ou desorve, ou ocorre difusão superficial, ou sofre processos de relaxação de modo a que a energia do sistema diminua. A relaxação pode ocorrer sob a forma de alterações conformacionais que levam ao aumento da área de contacto entre a molécula e a superfície. Devido a estas alterações a forma e dimensões das moléculas podem ser diferentes daquelas que apresentavam em solução, e se forem permanentes diz-se que a proteína foi desnaturada.

Se existirem várias espécies de proteínas em solução o processo de adsorção é mais complexo uma vez que pode ocorrer o designado fenómeno de Vroman no qual as proteínas de menor peso molecular se adsorvem primeiro à superfície mas vão sendo substituídas por proteínas de maior peso molecular com maior afinidade com a superfície.

2.4.1.1. Isotérmicas de adsorção

Os resultados da medida de adsorção a temperatura constante, que relacionam a quantidade adsorvida com a concentração em equilíbrio na solução descrevem aquilo a que se chama uma isotérmica de adsorção. Existem vários modelos teóricos de isotérmicas, sendo os mais usados, pela sua simplicidade, os modelos de Langmuir e de Freundlich.

Langmuir obteve, a partir da teoria cinética, um tratamento quantitativo simples para a adsorção de gases a superfícies sólidas que também se pode aplicar à adsorção a partir de soluções diluídas. Para isso admitiu as seguintes hipóteses, [44]:

- a adsorção é um processo reversível;
- as entidades adsorvidas à superfície não têm mobilidade nesta após a adsorção;
- cada local de adsorção só pode acomodar uma entidade adsorvida, ou seja, no máximo só é possível a formação de uma monocamada;
- os locais de adsorção são idênticos energeticamente, ou seja, a energia de adsorção num local é independente dos locais vizinhos e do facto de estes estarem ocupados ou não

A expressão da isotérmica de Langmuir é:

$$\theta = \frac{K_L P}{1 + K_L P} \quad (\text{Equação 11})$$

em que K_L é a constante de equilíbrio de adsorção, P é a pressão de equilíbrio e θ é a fracção da superfície ocupada por entidades adsorvidas, ou seja:

$$\theta = \frac{\Gamma}{\Gamma_{\infty}} \quad (\text{Equação 12})$$

em que Γ é a quantidade adsorvida, ou a concentração superficial, e Γ_{∞} é a quantidade quando a monocamada está completa, ou a concentração superficial máxima. A isotérmica de Langmuir pode também ser aplicada para a adsorção a partir de soluções líquidas resultando na seguinte expressão:

$$\Gamma = \frac{\Gamma_{\infty} K_L C}{1 + K_L C} \quad (\text{Equação 13})$$

em que C é a concentração de equilíbrio.

A isotérmica de Langmuir apresenta uma assíntota na qual quando a concentração da solução, C , tende para infinito a quantidade adsorvida tende para Γ_{∞} .

A determinação experimental dos parâmetros Γ_{∞} e K_L é obtida, por linearização da expressão da isotérmica de Langmuir, representando C/Γ em função de C . A partir do declive da recta obtem-se o valor de Γ_{∞} e a partir da ordenada na origem obtem-se o valor de K_L :

$$\frac{C}{\Gamma} = \frac{1}{K_L \Gamma_{\infty}} + \frac{1}{\Gamma_{\infty}} C \quad (\text{Equação 14})$$

A energia livre de Gibbs padrão da adsorção em meio aquoso, ΔG_0^{ads} , relaciona-se com K_L através de, [45]:

$$K_L = \frac{1}{c_{\text{solv.}}} \exp\left(\frac{\Delta G_{\text{ads.}}^0}{RT}\right) \quad (\text{Equação 15})$$

em que R é a constante dos gases, T a temperatura e c_{solv} a concentração molar do solvente que para o caso da água é 55.5 mol/L.

A entalpia de adsorção pode ser obtida, se forem conhecidas duas isotérmicas às temperaturas T_1 e T_2 através da seguinte equação, semelhante à de Clausius-Clapeyron, [32]:

$$\left(\ln \frac{C_1}{C_2}\right)_{\Gamma} = \frac{\Delta H_{\text{ads.}} (T_2 - T_1)}{RT_1 T_2} \quad (\text{Equação 16})$$

Na realidade a isotérmica de Langmuir nem sempre é verificada devido, sobretudo, à incorrecção da terceira hipótese. Verifica-se frequentemente que a entalpia de adsorção diminui à medida que θ aumenta, o que implica que a hipótese de os locais de adsorção serem energeticamente idênticos e independentes da vizinhança não é verdadeira. Tal pode ser confirmado calculando $\Delta H_{\text{ads.}}$ para vários Γ . Além disso, em muitos casos a segunda hipótese também falha uma vez que ocorre a formação de multicamadas.

Quando a superfície é heterogénea existe outro modelo mais adequado expresso pela isotérmica de Freundlich definida por, [44]:

$$\Gamma = K_F C^{\frac{1}{n_F}} \quad (\text{Equação 17})$$

em que K_F e n_F são parâmetros que se podem obter por linearização representando $\ln(\Gamma)$ em função de $\ln(C)$. A partir do declive da recta obtem-se o valor de n_F e a partir da ordenada na origem obtem-se o valor de K_F :

$$\ln(\Gamma) = \ln(K_F) + \frac{1}{n_F} \ln(C) \quad (\text{Equação 18})$$

A expressão de Freundlich, ao contrário da de Langmuir, não apresenta nenhuma assíntota, pelo que na isotérmica não existe nenhum patamar a concentração elevada. Isto significa que o modelo de Freundlich não contempla a hipótese de a adsorção se limitar a uma monocamada.

As expressões apresentadas até aqui aplicam-se apenas à adsorção de uma espécie pelo que são suficientes no sistema de adsorção de BSA utilizado neste trabalho. A isotérmica de Langmuir pode ser adaptada para sistemas com adsorção simultânea de várias espécies a partir das equações cinéticas. Outros modelos de adsorção competitiva, ou de adsorção de uma única espécie, podem encontrar-se, por exemplo, em Hinz e em Limousin *et. al.*, [46,47].

2.4.2. Métodos Analíticos de Medida de Adsorção

Apresentam-se em seguida alguns dos principais métodos analíticos de medida da adsorção de macromoléculas a superfícies sólidas.

Além dos métodos apresentados: QCM-D (Microbalança de Cristal de Quartz com Dissipação), Elipsometria, SPR (*Surface Plasmon Resonance*) e OWLS (*Optical Waveguide Lightmode Spectroscopy*) existem muitos outros como por exemplo: RiFS (Reflectometric Interference Spectroscopy), [48], SAR (*Scanning Angle Reflectometry*), [49], depleção, radiomarcagem, etc.

Os métodos seleccionados permitem o acompanhamento da adsorção em tempo real pelo que além dos parâmetros de equilíbrio pode ser estudada a cinética de adsorção.

O método de QCM-D mereceu particular destaque uma vez que foi o utilizado no trabalho laboratorial.

2.4.2.1. QCM-D

Os métodos acústicos são baseados no efeito piezoeléctrico dos materiais, reportado em 1880 pelos irmãos Curie, [50], no qual a aplicação de forças mecânicas na superfície do material origina o aparecimento de cargas eléctricas. O efeito inverso também é verificado, ou seja, a deformação mecânica por aplicação de carga

eléctrica. Em 1889, Rayleigh mostrou que a frequência de ressonância do cristal de quartzo é modificada alterando a sua inércia. De facto os cristais podem ser excitados a vibrações ultra-sónicas aplicando-lhes voltagens nas faces opostas, [51].

Embora existam vários tipos de materiais com propriedade piezoeléctrica apenas o α -quartzo, [52], designado a partir de agora simplesmente por “quartzo”, possui a combinação de características mecânicas, eléctricas, térmicas e químicas necessárias à utilização comercial, que se intensificou a partir da Segunda Guerra Mundial com o advento da electrónica, [48]. De todas destacam-se as duas seguintes, [52]: o quartzo apresenta pequena dependência em relação à temperatura na frequência de vibração à temperatura ambiente; e a baixa influência na frequência de vibração de filmes superficiais ou contactos eléctricos pré-montados.

No entanto, foi apenas a partir da década de 1960, após Sauerbrey ter demonstrado a linearidade entre a massa adsorvida na superfície do cristal de quartzo e a variação da sua frequência de ressonância, em vácuo, que se iniciou a aplicação dos ressonadores de quartzo em métodos quantitativos de determinação de espessuras de filmes rígidos em ar ou vácuo, [48].

Existem três formulações da equação de Sauerbrey, [52,53], todas válidas apenas para ressonadores do tipo TSM (*Thickness Shear Mode*):

$$\Delta m = -\Delta f \frac{\rho_q t_q}{f_0} \quad (\text{Equação 19})$$

$$\Delta m = -\Delta f \frac{\rho_q v_q}{2f_0^2} \quad (\text{Equação 20})$$

$$\Delta m = -\Delta f \frac{\sqrt{\rho_q \mu_q}}{2f_0^2} \quad (\text{Equação 21})$$

em que Δm é a variação de massa por unidade de área associada à variação de frequência, Δf , do cristal de quartzo de espessura t_q , densidade ρ_q , módulo de corte μ_q e frequência de ressonância f_0 . A velocidade da onda de corte no quartzo, v_q , é 3340 m/s.

Como estas três equações são equivalentes, e para o confirmar basta considerar as seguintes definições, [52]:

$$f_0 = \frac{v_q}{2t_q} \quad (\text{Equação 22})$$

$$v_q = \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \quad (\text{Equação 23})$$

podemos simplificar a equação de Sauerbrey para:

$$\Delta m = -\Delta f \cdot C_S \quad (\text{Equação 24})$$

em que C_S é uma constante.

Na Figura 6 apresentam-se os quatro principais tipos de ressonadores, [48], sendo o mais comum, e aquele que se utiliza na QCM: o TSM.

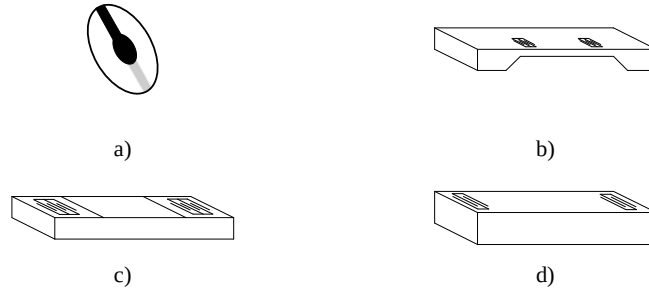


Figura 6 – Quatro tipos de ressonadores de quartzo: a) TSM, b) FPW, c) SAW e d) SH-APM.

Geralmente os ressonadores TSM são obtidos a partir do corte do cristal de quartzo no formato *AT-cut* com um ângulo em relação ao eixo do z de 35.17°, [52], (35°10' ≈ 35.17°, [50], 35.25°, [48]) uma vez que é nesta configuração que apresentam maior estabilidade da frequência de vibração.

As frequências de vibração do cristal, f , podem ser estimadas pela equação, [48]:

$$f = \frac{nK_R}{t_q} \quad (\text{Equação 25})$$

que é obtida a partir da equação das ondas, admitindo configuração unidimensional, ou seja, que a espessura do cristal é muito inferior ao raio, [48].

Considerações matemáticas e físicas demonstram que o parâmetro n apenas pode tomar como valores números ímpares positivos, pelo que o cristal vibra apenas nas harmônicas $n=2m+1$ com m pertencente aos números naturais. Cada um dos valores n designa-se por harmónica. Por exemplo a frequência fundamental, f_0 , corresponde a $n=1$, enquanto que $n=3$ corresponde à 3ª harmónica e $n=5$ à 5ª harmónica, etc.

K_R é denominada por constante de frequência do cristal de quartzo AT-cut e tem o valor de 1664 m/s. Assim, por exemplo, um cristal de quartzo com corte AT-cut com 0.33 mm de espessura tem uma frequência fundamental de vibração de cerca de 5 MHz.

Admitindo que a variação de frequência é proporcional à harmónica, a equação de Sauerbrey generalizada para a harmónica n é:

$$\Delta m = -\Delta f \cdot \frac{C_s}{n} \quad (\text{Equação 26})$$

A equação de Sauerbrey foi deduzida para o caso em que um filme rígido e uniforme é adsorvido em vácuo, pelo que a sua aplicação noutras condições deve ser prudente. Mesmo nas condições referidas, a equação de Sauerbrey só deve ser aplicada quando a massa adsorvida é muito inferior à massa do cristal de quartzo, ou seja quando a variação de frequência é muito inferior à frequência de vibração ($\Delta f_n < f_n$), [53]. Marx, [50], refere que os valores previstos pela equação de Sauerbrey apresentam desvios grosseiros quando a massa do filme adsorvido é superior a 2% da massa do cristal de quartzo inicial. Já Rickert *et. al.*, [54], referem que é aceitável admitir que a adsorção produz um filme rígido, fino, e uniforme se a massa adsorvida for inferior a 0.05% da massa do cristal de quartzo. Esta afirmação pode ser controversa até porque como se explicará à frente, existem outras formas de estudar a rigidez do filme adsorvido.

Em 1982 Nomura, [55], mostrou que cristais de quartzo imersos em líquido também podem ser colocados a oscilar de forma estável, o que levou a nova expansão na utilização dos cristais de quartzo como meio analítico na electroquímica e nas ciências biológicas.

Em 1985, Kanazawa deduziu uma equação para a variação de frequência do cristal de quartzo quando este passa do contacto com o ar para o contacto com um líquido Newtoniano que não “escorregue” na superfície, [50,55,56]:

$$\Delta f = \sqrt{\frac{f_0^3 \eta_l \rho_l}{\pi \mu_q \rho_q}} \quad (\text{Equação 27})$$

em que η_l e ρ_l são respectivamente a viscosidade e densidade do líquido.

O factor de dissipação para a mesma passagem ar-líquido, D_l , quando apenas um lado do cristal é utilizado no contacto, pode ser estimado por, [55]:

$$D_l = \frac{2}{\rho_q t_q} \sqrt{\frac{\rho_l \eta_l}{2\omega}} \quad (\text{Equação 28})$$

em que ω é a frequência de vibração angular definida por $\omega = 2\pi f$.

Para estimar as propriedades viscoelásticas dos filmes adsorvidos é necessário obter mais parâmetros da oscilação do cristal de quartzo para além da variação de frequência com a massa adsorvida.

Se o filme for viscoso e elástico ocorrerá dissipação para o meio circundante de parte da energia gerada pela oscilação. Assim, a dissipação de energia será um bom parâmetro para definir a rigidez do filme. Kaufmann *et. al.*, [57], admitiram que uma camada é rígida se a variação de dissipação, ΔD , por cada 5 Hz de variação de frequência, Δf , for inferior a 10^{-6} .

As propriedades mecânicas podem ser obtidas fazendo aproximações do modelo mecânico a modelos eléctricos, já que em última análise são parâmetros eléctricos que se adquirem dos equipamentos, [48].

O modelo mais simples, quando o cristal vibra próximo da frequência de ressonância, é o modelo de Butterworth-van-Dyke (BVD), representado na Figura 7, [48,55], em que C_q , R_q e L_q são, respectivamente, a capacitância, a resistência e indutância do cristal de quartzo e C_0 a capacitância estática.

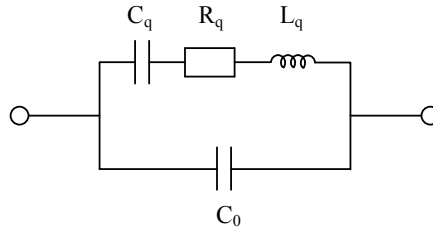


Figura 7 – Modelo eléctrico de Butterworth-van-Dyke.

O factor de dissipação, D , é um parâmetro indicativo da dissipação energética para a vizinhança do sistema oscilatório definido por, [55]:

$$D = \frac{1}{Q} = \frac{E_d}{2\pi E_a} \quad (\text{Equação 29})$$

em que Q é o factor de qualidade, E_d é a energia dissipada para a vizinhança e E_a é a energia armazenada no sistema.

O factor de dissipação pode ser obtido usando o modelo BVD, [55]:

$$D = \frac{R_q}{\omega L_q} \quad (\text{Equação 30})$$

em que ω é a frequência angular ($\omega = 2\pi f$).

Uma forma de determinar o factor de dissipação baseia-se no facto de que, ao desligar-se a passagem de corrente pelo cristal a amplitude de oscilação, $A(t)$, decai exponencialmente através de:

$$A(t) = A_0 e^{-t/\tau} \sin(\omega t + \phi) + c, \quad t \geq 0 \quad (\text{Equação 31})$$

em que t é o tempo, τ é a constante de decaimento, ϕ é a fase e c uma constante. A dissipação está relacionada com o factor de decaimento através de:

$$D = \frac{2}{\omega \tau} \quad (\text{Equação 32})$$

Para maior detalhe sobre a obtenção do factor de dissipação pode consultar-se Rodahl *et al.*, [58].

Quando o filme adsorvido é viscoelástico aplica-se o modelo de Voigt no qual as propriedades daquele são descritas através do módulo de corte complexo, G , [59]

$$G_f = G_f' - iG_f'' = \mu_f + i\omega\eta_f \quad (\text{Equação 33})$$

em que μ_f e η_f são, respectivamente, a parte real do módulo de corte e viscosidade da camada de filme.

O sistema do cristal de quartzo coberto com um filme e imerso num líquido Newtoniano pode ser aproximado por um sistema descrito pela impedância acústica local complexa, $\zeta = \zeta' + i\zeta''$, [60],

$$\frac{\Delta f}{f_0} = -\frac{\Delta\zeta''}{\omega\rho_q t_q} = -\frac{\Delta m}{\rho_q t_q} \left[1 - \frac{\rho_l}{\rho_f} \operatorname{Re} \left(\frac{G_l}{G_f} \right) \right] = -\frac{\Delta m}{\rho_q t_q} \left[1 - \frac{\omega\rho_l\eta_l}{\rho_f} J_f'' \right] \quad (\text{Equação 34})$$

em que ρ_f é a densidade do filme adsorvido e J é definido tal que:

$$J_f = J_f' - iJ_f'' = G_f^{-1} \quad (\text{Equação 35})$$

pelo que se obtém a equação de Sauerbrey modificada:

$$\Delta m = -\frac{\Delta f \cdot C}{n} \cdot \lambda \quad (\text{Equação 36})$$

com

$$\lambda = \frac{1}{\left(1 - \omega\rho_l\eta_l \frac{J_f''}{\rho_f} \right)} \quad (\text{Equação 37})$$

e

$$J_f'' = \frac{\omega\eta_f}{\mu_f^2 + \omega^2\eta_f^2} \quad (\text{Equação 38})$$

No método de Voigt, [59,61-63], as propriedades viscoelásticas do filme, μ_f , η_f , e t_f , são calculadas iterativamente com base em várias harmónicas de vibração e na atribuição de uma densidade à camada de filme, em que t_f é a espessura da camada de filme adsorvido. Vários autores referem que os resultados obtidos pelo método de Voigt são praticamente independentes do valor arbitrado para a densidade do filme se este estiver no intervalo 1.1 a 1.7 g/cm³, [64,65].

É ainda de referir que para espessuras de filmes inferiores a 100 nm com a equação de Sauerbrey se obtêm resultados subestimados, [59].

2.4.2.2. Métodos Ópticos

Os métodos ópticos utilizados na quantificação de adsorção de macromoléculas a superfícies sólidas baseiam-se nas alterações provocadas na radiação incidente sobre as superfícies no qual se adsorve o filme de proteína.

Os três principais métodos ópticos utilizados são a elipsometria, a *surface plasmon ressonance* (SPR) e a *optical waveguide lightmode spectroscopy* (OWLS).

Elipsometria

A elipsometria é baseada na alteração que ocorre numa onda monocromática polarizada reflectida pelo material em análise como se exemplifica na Figura 8, [66,67]. Através de modelação podem obter-se parâmetros como a constante dielétrica complexa, o índice de refração complexo ou a espessura da camada ou multicamadas adsorvidas.

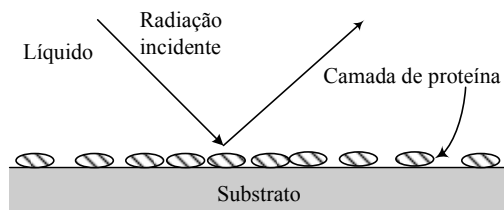


Figura 8 – Esquema de funcionamento da elipsometria.

Se estiver disponível o valor da densidade da camada adsorvida, obtida por qualquer método independente da elipsometria, a concentração superficial é dada por:

$$\Gamma = t_f \cdot \rho_f \quad (\text{Equação 39})$$

Se se poder assumir que a camada adsorvida é transparente o valor de Γ pode ser obtido pela fórmula de Feijter:

$$\Gamma = t_f \cdot \frac{(n_f - n_0)}{dn/dc} \quad (\text{Equação 40})$$

em que n_f e n_0 são os índices de refração da camada adsorvida e do meio, e dn/dc é a razão incremental do índice de refração com a concentração. Para a maior parte das proteínas que não sofram alterações conformacionais dn/dc é praticamente a $0.18 \text{ cm}^3/\text{g}$, [65,67,68].

A imagiologia elipsométrica, [69,70], é uma técnica recente que permite visualizar a espessura em áreas até $15 \times 25 \text{ mm}$, [66]. A resolução lateral é da ordem dos micrometros e a resolução vertical é da ordem dos nanómetros.

SPR

Surface plasmon resonance é uma oscilação na densidade de carga que pode existir na interface entre dois meios com constantes dieléctricas de sinal oposto, [71], como por exemplo um metal e um dieléctrico.

A configuração do SPR clássico está representada na Figura 9, [72].

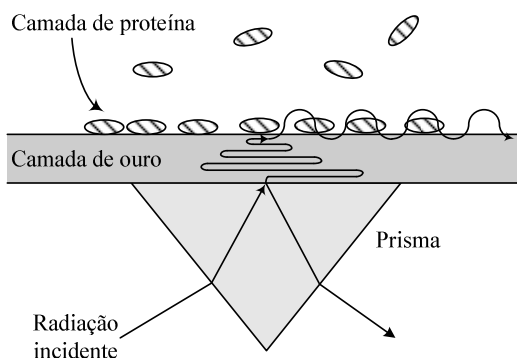


Figura 9 – Esquema de funcionamento do SPR.

A certos ângulos e comprimentos de onda de luz incidente no metal a ressonância é excitada e parte da energia é transferida para os plasmões provocando uma atenuação brusca na intensidade da luz reflectida, [72,73].

O ângulo a que esta atenuação ocorre, Θ , é muito sensível ao índice de refração do meio em análise que está em contacto com a superfície metálica, o que permite determiná-lo conjuntamente com a espessura do filme, [65,72].

Tal como na elipsometria a concentração superficial pode ser obtida pela equação de Feijter que no caso em que a espessura da camada adsorvida seja muito inferior ao comprimento de decaimento da onda evanescente se simplifica para:

$$\Gamma = C_{\text{SPR}} \cdot \Delta\Theta \quad (\text{Equação 41})$$

em que C_{SPR} é uma constante.

OWLS

A tecnologia OWLS utiliza uma onda laser polarizada que é difractada numa rede óptica e que para determinado ângulo de incidência excita os modos transverso eléctrico e transverso magnético de uma onda aumentado a intensidade captada pelo detector como indicado na Figura 10, [67,74,75].

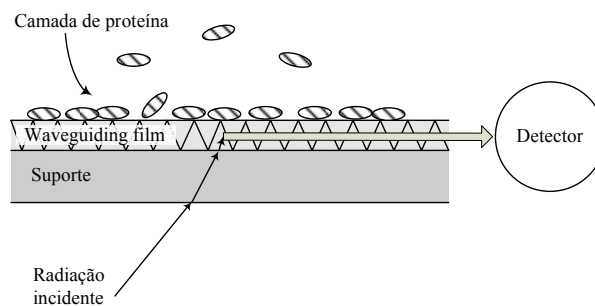


Figura 10 – Esquema de funcionamento da OWLS.

Através de modelação, a variação no ângulo de incidência traduz-se na determinação da variação de índices de refração e da espessura da camada adsorvida. Tal como nos outros métodos ópticos a concentração superficial da camada adsorvida é obtida utilizando a equação de Feijter.

2.4.2.3. Comparação dos métodos

A sensibilidade da QCM-D é inferior às sensibilidades dos métodos ópticos, [76], no entanto a principal diferença entre ambos é que na QCM-D a variação de frequência inclui a contribuição das moléculas de solvente aprisionadas no filme, enquanto que nos outros métodos a variação do índice de refração é influenciada apenas pela(s) substância(s) em estudo. Por isso os resultados obtidos pela QCM-D são sempre superiores aos obtidos pelos outros métodos, sendo que a quantidade de solvente acoplado varia bastante de sistema para sistema, encontrando-se valores típicos de massa de solvente entre 1.5 e 4 vezes a massa da substância em causa. Por exemplo, Hook *et al.*, [59], obteve, para a adsorção da proteína Mefp-1, uma razão entre a massa total e a massa de substância seca de 10.7. Esta razão é tanto maior quanto menos compacta for a camada de filme.

Esta aparente desvantagem torna-se no grande trunfo da QCM-D porque utilizando modelos matemáticos adequados permite determinar as propriedades viscoelásticas do filme adsorvido, o que não é possível nos métodos ópticos. Por isso a tendência actual é utilizar simultaneamente a QCM-D com um qualquer método óptico de modo a obter a massa de filme seco e por diferença a massa de solvente acoplado. Além disso é possível estimar a densidade e espessura efectivas do filme, ρ_f e t_f , com os valores de variação de massa obtida pelos dois métodos, [64,67]:

$$t_f = \frac{\Delta m_{QCM}}{\rho_f} = \frac{\Delta m_{\text{óptico}}}{\rho_{\text{proteína}}} + \frac{\Delta m_{QCM} - \Delta m_{\text{óptico}}}{\rho_{\text{água}}} \quad (\text{Equação 42})$$

2.4.3. Forças de Adesão

Os diagramas força *versus* distância são compostos por duas curvas: a curva de aproximação e a curva de afastamento.

Os dados que se obtêm directamente do equipamento são a variação na posição do piezoeléctrico, Z_p , e a deflecção sofrida pelo *cantilever*, Z_c .

Para substratos rígidos não ocorre deformação da superfície pelo que a distância entre esta e a *tip* é dada por, [38]:

$$D = Z_p + Z_c \quad (\text{Equação 43})$$

em que Z_p é a distância entre a superfície e a *tip* quando esta se encontra na posição de repouso, ou seja quando não são exercidas forças como se mostra na Figura 11, [38]. Se a força actuante for atractiva o *cantilever* deflecte para baixo pelo que Z_c é negativo e a distância diminui. Se a força for repulsiva o *cantilever* deflecte para cima, pelo que Z_c é positivo e a distância aumenta.

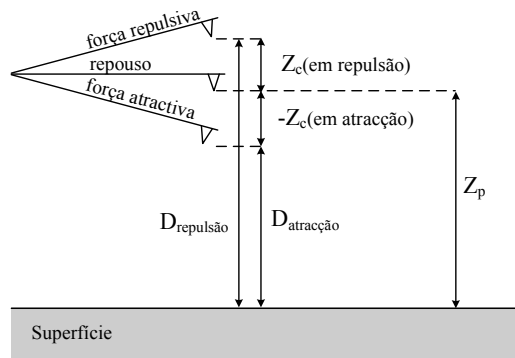


Figura 11 – Definição da distância entre a superfície e a *tip*.

Os dados que se obtêm do equipamento AFM são a posição Z_p e a intensidade de corrente medida no fotodetector, I_{PSD} . Para se obter o diagrama força *versus* distância é necessário converter a intensidade da luz incidente, I_{PSD} , em Z_c . Isso é feito determinando a sensibilidade do aparelho, que é dada pelo declive da recta no regime de contacto no gráfico I_{PSD} *versus* Z_p .

Para começar a análise das curvas força *versus* distância pensemos apenas na curva de aproximação do gráfico I_{PSD} *versus* Z_p . Admitindo que sobre a *tip* não são exercidas forças de qualquer tipo e que o substrato é não deformável então a linha horizontal, às maiores distâncias, corresponde à força zero e o ponto de contacto entre a superfície e a *tip* situa-se no ponto de intersecção entre a linha horizontal e a linha diagonal (Figura 12 a) e b)). É esta a recta que nos dá a sensibilidade do equipamento.

Se apenas existirem forças atractivas, por exemplo forças de Van der Waals, a certa distância o gradiente da força supera a constante de elasticidade normal do *cantilever* e ocorre uma aproximação brusca da *tip* à superfície (Figura 12 c) e d)). Se as forças forem repulsivas os gráficos serão semelhantes aos da Figura 12 e) e f).

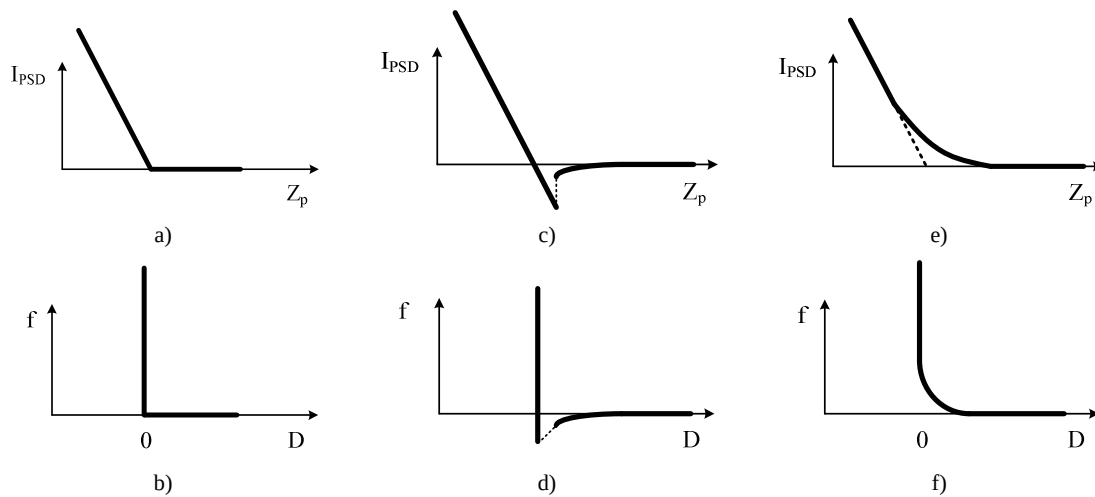


Figura 12 – Gráficos característicos de I_{PSD} vs. distância e força vs. distância na aproximação da *tip* à superfície admitindo que é superfície indeformável. Os casos a) e b) correspondem à inexistência de forças; os casos c) e d) correspondem a uma força atractiva e os casos e) e f) a uma força repulsiva.

A curva de afastamento muitas vezes não se sobrepõe à de aproximação como se vê no exemplo apresentado na Figura 13, [38]. Na região da força zero, ou seja na região da recta horizontal as curvas podem não se sobrepor, especialmente em meio líquido, quando a velocidade de varrimento é elevada. Na região de contacto, o declive também pode ser diferente se houver deformação plástica ou viscoelástica da superfície. No entanto a principal diferença na curva de afastamento, em relação à curva de aproximação, verifica-se no instante de separação entre a *tip* e a superfície. Como o *cantilever* funciona como uma mola muitas vezes no afastamento a *tip* mantém-se em contacto com a superfície até que a força do *cantilever* supere a força de adesão, F_{ad} , e nestes casos a distância de separação é superior à distância a que ocorreu o contacto.

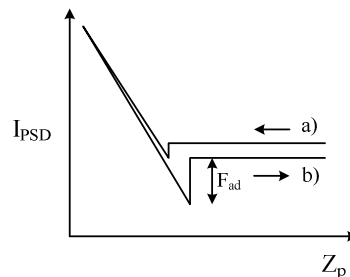


Figura 13 – Diferenças entre as curvas de aproximação, linha a), e afastamento, linha b).

Além dos materiais em si existem outros factores que afectam a força de adesão. Assim, em alguns casos, o aumento da carga aplicada conduz ao aumento da força de adesão devido à deformação plástica, [35]. Também o aumento do tempo de contacto entre a *tip* e a superfície pode resultar numa maior força de adesão, uma vez que podem ocorrer processos de adsorção ou de emaranhamento entre cadeias das moléculas existentes nas superfícies, nos casos em que estas estão funcionalizadas, [35,77,78]. A rugosidade da superfície também pode influenciar a força de adesão, [35]. Bowen *et. al.*, [80], estudaram o impacto da rugosidade na força de adesão

em aço e concluíram que esta aumenta com a diminuição da rugosidade, o que pode ser explicado pelo aumento da área de contacto.

A força de adesão pode ser obtida utilizando o mesmo tipo de *tips* de análise topográfica no entanto a técnica mais usada é a da *colloid probe* na qual uma esfera de diâmetro conhecido, normalmente entre 1 e 50 μm , [35,79], ou qualquer outro tipo de partícula, é fixada na ponta do *cantilever*. A técnica da *colloid probe* utilizando esferas tem a vantagem de a geometria da partícula estar bem definida, mas tem como desvantagem a difícil fixação da esfera no *cantilever*. Além disso, se a esfera for colada, existe o risco de existir excesso de cola que interfira com a solução ou com os resultados da força de adesão. No artigo de Xu *et. al.*, [81], descreve-se um método de modificação de *tips* por desgaste químico por forma a que o seu raio de curvatura aumente, até 3 μm , sem haver a dificuldade de utilização de esferas. Além de esferas podem ser utilizadas outras partículas como, por exemplo, células, [82,83].

As forças de adesão experimentais podem ser comparadas com as previstas por modelos teóricos. Admitindo que entre a superfície e a *tip* apenas existem forças de van der Waals, a força de adesão entre ambas pode ser estimada por, [38].

$$F = -\frac{A_H R}{6D^2} \quad (\text{Equação 44})$$

em que A_H é constante de Hamaker, R é o raio da *tip* e D é a distância entre as superfícies que se admite ser igual ao espaçamento interatómico. A este parâmetro atribui-se frequentemente o valor de 0.165 nm embora não seja muito adequado quando o meio é um líquido com ligações de hidrogénio, [38].

A constante de Hamaker entre duas superfícies separadas por um meio podem ser aproximadas por A_{123} , [84]:

$$A_{123} = \frac{3k_B T}{4} \frac{(\epsilon_1 - \epsilon_3)(\epsilon_2 - \epsilon_3)}{(\epsilon_1 + \epsilon_3)(\epsilon_2 + \epsilon_3)} + \frac{3h\nu_e}{8\sqrt{2}} \frac{(n_1^2 - n_3^2)(n_2^2 - n_3^2)}{\sqrt{n_1^2 + n_3^2} \sqrt{n_2^2 + n_3^2} \left[\sqrt{n_1^2 + n_3^2} + \sqrt{n_2^2 + n_3^2} \right]} \quad (\text{Equação 45})$$

em que k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em Kelvin, h é a constante de Planck, ν_e é a frequência de absorção electrónica que se admite igual para os três materiais e igual a $3 \cdot 10^{15}$ Hz, [85,86], ϵ_i e n_i são respectivamente a constante dielétrica e o índice de refração do material i , sendo que $i=1$ e $i=2$ correspondem às duas superfícies e $i=3$ corresponde ao meio entre ambas.

2.5. Materiais em Estudo

2.5.1. Cerâmicos de Titânio

A principal característica dos cerâmicos de titânio, em comparação com outros materiais, é a sua elevada dureza e baixa taxa de desgaste pelo que são muito utilizados como revestimentos de peças mecânicas sujeitas a cargas cíclicas com o objectivo de assim prolongar a vida útil das peças. É o caso do TiN, do TiNbN e do TiCN, estudados neste trabalho, que são usados como revestimento em peças de corte e perfuração, [87-90], em peças automóveis, [91], em armamento, [92], e nas partes móveis de próteses de articulações ortopédicas

Os cerâmicos de titânio são também utilizados como revestimentos de peças decorativas, principalmente o TiN devido à sua cor dourada, [93].

Embora sejam materiais cerâmicos são também condutores eléctricos, e por exemplo o TiNbN é utilizado como material condutor em equipamento electrónico, [94].

Nas últimas décadas os cerâmicos de titânio têm sido alvo de vários estudos, quer sejam focados nas suas propriedades mecânicas e tribológicas, quer sejam mais virados para a biocompatibilidade e resposta celular e dos tecidos vivos para a utilização em implantes.

Em termos tribológicos os cerâmicos de titânio apresentam elevada dureza e baixa taxa de desgaste, sendo estas propriedades influenciadas pela método de deposição do revestimento, pela composição, [95,96], e pela rugosidade, [96]. A implantação iónica permite, em geral, reduzir a taxa de desgaste e o atrito, [7,89,97].

O titânio e suas ligas são conhecidos pela sua biocompatibilidade, já o uso de cerâmicos de titânio em implantes de articulações era até alguns anos atrás controversa devido a falhas mecânicas observadas aquando das extracções em cirurgias de substituição ou *post mortem*.

Apesar de terem maior resistência ao desgaste e à corrosão que o titânio e que as ligas de titânio, [98,99], existem vários estudos que mostram que, em alguns casos, a utilização de cerâmicos de titânio pode ter como consequência efeitos indesejados. Jones *et. al.*, [100], mostraram que implantes revestidos com TiN que contactem com sangue têm pior desempenho do que os revestidos com DLC (*diamond-like carbon*) uma vez que se verifica a formação de trombos. Conclusões semelhantes, mas em relação a implantes dentários, foram obtidos por Jeyachandran *et. al.*, [101], que verificaram uma maior adesão de bactérias à superfície dos implantes comparativamente ao titânio e à hidroxiapatite. Por outro lado em Dong *et. al.*, [102], concluem que o de TiC_xN_{1-x} tem melhor hemocompatibilidade que o titânio não tratado.

Outros problemas comuns são a delaminação do revestimento, [98,103-105], e a formação de depósitos minerais, [106], o que leva a um aumento do atrito e do desgaste, do implante, podendo conduzir à falha deste.

Uma forma de se obter revestimentos com maior resistência à delaminação é por deposição em multicamada ou em gradiente uma vez que se diminuem as tensões na interface entre o revestimento e o substrato, [96,107-109]. Um material derivado do TiN que apresenta menor coeficiente de atrito e taxa de desgaste é a Micronite, [110].

Na Tabela 4 apresentam-se valores de dureza e módulo de Young de vários revestimento de cerâmicos de titânio e de outros substratos (aço, titânio e liga Ti6Al4V). É importante referir que os valores dos parâmetros apresentados dependem do método de revestimento e no caso da dureza da carga aplicada na indentação.

Tabela 4 – Comparação da dureza e módulo de Young de cerâmicos de titânio com ligas de titânio e aço

Material	Dureza (GPa)	Dureza de Vickers (HV)	Módulo de Young (GPa)
TiN	29 ± 2 ¹ [91]	2200 ⁵ [92]	$170.34 - 180.25$ ³ [111] $195 - 298$ [95]
	22.3 ± 1.9 ² [109]		
	$8.24 - 11.02$ ³ [111]		
	$20 - 29$ ⁴ [95]		
	$22 - 25$ [89]		
	23 [33]		
TiNbN	30 [33]	2900 [33]	n.d.
	51.5 ± 3.9 ⁶ [108]		
TiCN	35 ± 4 ¹ [91]	3000 ⁵ [92] 3100 ⁷ [90]	$182.83 - 199.28$ [111]
	34.6 ² [109]		
	$11.84 - 14.09$ ³ [111]		
	$34.4 - 38.1$ [112]		
	$26 - 28$ [89]		
	29 [33]		
TiAlN	45 ± 5 ¹ [91]	3300 ⁵ [92] 2800 ⁷ [90]	n.d.
	$28 - 30$ [89]		
TiC	$20.56 - 23.64$ ³ [111]	n.d.	$264.81 - 272.06$ [111]
Ti	2.4 ± 0.3 [95]	n.d.	169 [95]
	4.42 [113]		120 [113]
			110 [12]
Ti6Al4V	$6.0 - 9.2$ [114]	100 [13]	116 [10,12]
SS316L	2.0 [33]	190 [13]	190 [10,12]
	$5.2 - 6.7$ [114]		

¹ Deposição por *ion bonding*; carga de indentação: 0.05 Kg.

² Deposição por *magnetron sputtering*; carga de indentação: 5 mN.

³ Deposição por *plasma enhanced CVD*; carga de indentação: 100-1000 μ N.

⁴ Deposição por *ion implantation*.

⁵ HV0.05.

⁶ Deposição por *vacuum arc*.

⁷ Deposição por PVD; carga de indentação: 25 mN.

2.5.2. Albumina

A albumina é a proteína existente em maior quantidade no plasma sanguíneo (cerca de 50% do total proteico) com uma concentração aproximada de 40 mg/mL, [115], é produzida no fígado (entre 9 e 12 gramas diários) e tem como principais funções o transporte e a regulação da pressão osmótica sanguínea. Além do plasma, que possui entre 30 e 40% do total, a albumina encontra-se ainda nos tecidos musculares e na pele,

[115,116]. No caso particular do líquido sinovial a concentração de albumina é, segundo vários autores cerca de um terço da concentração no sangue. Ratner *et. al.*, [10], referem que a concentração no líquido sinovial se situa entre 3.1 e 11.3 mg/mL.

A estrutura primária da albumina é constituída pela sequência de 585 aminoácidos o que lhe confere um peso molecular próximo de 66.5 kDa.

De acordo com vários estudos de cristalografia de raios-X a estrutura terciária da albumina, no estado sólido, é composta por três domínios homólogos (designados por I, II e III) com certo grau de liberdade de movimento entre si, e cada um destes está subdividido em dois subdomínios, (Figura 14). Cerca de 67% da estrutura secundária é constituída por hélice- α . Segundo alguns autores a estrutura secundária não contém estruturas em folha- β , [116,117], no entanto outros afirmam que sim, [118]. A estrutura terciária confere à albumina uma forma semelhante a um coração, que na terminologia inglesa se designa por *heart-shape*, ou a um triângulo equilátero com lados de 8 nm e espessura de 3 nm, [117,119]. Não se verifica consenso quanto à estrutura terciária em solução. Enquanto alguns autores dizem que em solução neutra a estrutura da albumina é semelhante à do estado sólido, [117], outros afirmam que é semelhante a um elipsóide, [115,116]. Em solução, a estrutura da BSA é sensível ao pH, [120], podendo existir em três formas principais: pH neutro, pH inferior a 4.3 e pH superior a 8.3. Em pHs de transição podem coexistir duas formas. Na Figura 14 apresenta-se a estrutura terciária da albumina, na forma de *heart-shape*, complexada com ácido palmítico, [121].

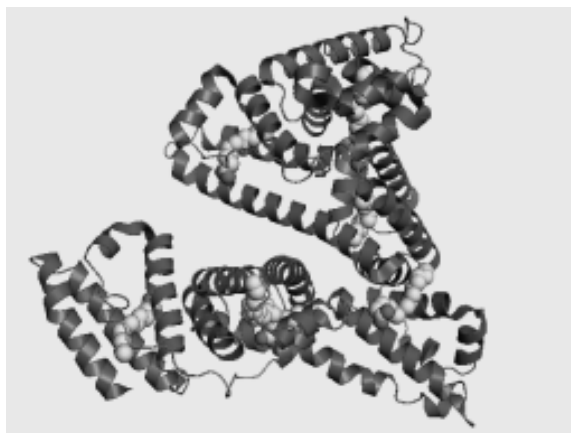


Figura 14 – Estrutura terciária da HSA complexada com ácido palmítico (cadeias cinzentas claras).

Vários autores consideram, como primeira aproximação, que a albumina é uma molécula com forma elipsoidal, ou de “charuto”, e referem a concentração superficial máxima que a monocamada de albumina adsorvida a uma superfície pode atingir no caso de se adsorver ao longo do lado mais comprido do elipsóide (*side-on*) ou através dos topos (*end-on*), [45,122-124]. Estes valores variam de autor para autor, uma vez que não existe concordância acerca das dimensões do modelo tomado para a molécula (Tabela 5). Na Figura 15 mostram-se as representações esquemáticas destes dois modelos de adsorção. Na realidade, na adsorção nunca é obtida uma monocamada perfeita e uniforme uma vez que, por razões termodinâmicas, é difícil que as moléculas se disponham ordenadamente na superfície, daí que a concentração superficial real de uma monocamada deva ser inferior ao valor máximo teórico. As razões para este comportamento são o facto de a superfície não ser uniforme, o que leva a que existam locais preferenciais onde a adsorção ocorre, e a dificuldade de movimento da

molécula adsorvida para libertar espaço vazio e acomodar outras a seu lado. Existem vários modelos de simulação de adsorção de proteínas. Uma família de modelos que melhor a descreve é a que se baseia no modelo RSA (*Random Sequential Adsorption*) no qual se admite a existência de um limite máximo de cobertura da superfície, [43,125]. Para partículas esféricas esse limite é de cerca de 55%. Hook *et al.*, [67], apresentam valores para as concentrações superficiais de BSA calculadas para a cobertura total e pelo modelo RSA.

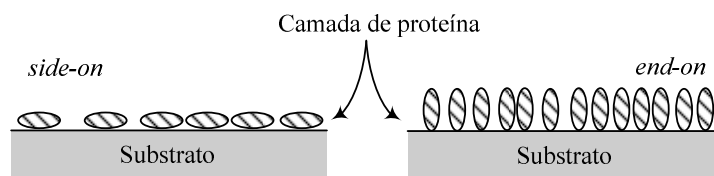


Figura 15 – Modelos de adsorção da albumina side-on e end-on

Tabela 5 – Concentrações superficiais máximas da albumina adsorvida em *side-on* ou *end-on*.

	Dimensões (nm)	Conc. superficial em <i>side-on</i> (mg/m ²)	Conc. superficial em <i>end-on</i> (mg/m ²)
Anzai <i>et al.</i> [122]	14 x 4 x 4	1.4	5.5
Jackson <i>et al.</i> [45]	11.5 x 4	2.5	6.7
Hook <i>et al.</i> [67]	8 x 8.7 x 6	1.55	2.26
Rezwan <i>et al.</i> [123]	9 x 5.5 x 5.5	2.23	3.65
Zhang <i>et al.</i> [126]	-	2.5	9.0
Stobiecka <i>et al.</i> [124]	9.6 x 4 x 4	2.98	-

Norde *et al.*, [127], estudaram as alterações conformacionais na BSA provocadas pela adsorção e concluíram que em silício (superfície hidrofílica), ou após dessorção desta superfície, a proteína mantém a sua estrutura conformacional, enquanto que a adsorção em polietileno (superfície hidrofóbica) provoca alterações permanentes.

2.5.2.1. Estudos prévios sobre adsorção de Albumina

A adsorção de albumina, quer a de origem bovina quer a humana, a superfícies sólidas tem sido alvo de estudo sistemático na última década através de vários métodos como por exemplo: QCM-D, [5,51,118,122,128-132]; EQCM, [124,133,134]; elipsometria, [69,135]; OWLS, [129,136]; espectrofotometria, [5,123,127,134]; marcação por radio-isótopos, [2,5]; DCA [51]; AFM, [5,77,78,82,124,131,135,138-145]; XPS, [146] e *immunoassays*, [146].

Os estudos recaem sobre materiais de biocompatibilidade comprovada ou sobre novos biomateriais. Existem estudos da adsorção de albumina em aço, [5,80,137]; liga cobalto-crômio-molibdênio, [2]; titânio, [133,137,146];

dióxido de titânio, [129,147]; hidroxiapatite [137]; alumina, [2,5,123]; mica, [148]; sílica, [127]; ouro, [51,124,132,133]; platina, [134] ; prata, [130]; poliestireno, [128,139]; polietileno, [78]; polianilina, [126]; teflon, [129], PMLG, [131,149], polietersulfona, [82]; e em vários tipos de SAMs, [57,69,118,122,135,140-143].

Na Tabela 6 apresentam-se valores de adsorção de albumina a vários materiais obtidos por QCM.

Tabela 6 – Concentrações superficiais obtidas por QCM para a adsorção de BSA a vários materiais.

Substrato	Temperatura (°C)	Concentração (mg/mL)	Observações	Γ (mg/m ²)	Referência
Aço	25	∞	HBSS, pH=6.0	3.4	[5]
Alumina	25	∞	HBSS, pH=6.0	1.2	[5]
Ouro-OH	25	∞	PBS, pH=7.4	8.4 [†]	[118]
Ouro-CH ₃	25	∞	PBS, pH=7.4	7.2 [†]	[118]
PAN	n.d.	∞	PBS, pH 7.5	7.1	[126]
PAN-ClO ₄ ⁻	n.d.	∞	PBS, pH 7.5	6.5	[126]
PAN-SDS	n.d.	∞	PBS, pH 7.5	9.9	[126]
PMLG	25	∞	pH=6.8	2.7	[131]
Ouro	n.d.	∞	PBS	1.1 [†]	[51]
Prata	20	2.00	PBS, pH=7.4	1.5 [†]	[130]
Ouro-EM	20	0.10 [†]	10 minutos, pH=7.0	2.6	[122]
Ouro-AET	20	0.10 [†]	10 minutos, pH=7.0	1.9	[122]
Ouro-ME	20	0.10 [†]	10 minutos, pH=7.0	1.7	[122]
Ouro-TGA	20	0.10 [†]	10 minutos, pH=7.0	1.4	[122]
TiO ₂	25	0.04	30 minutos, HEPES, pH=7.4	2.4 [†]	[129]
Teflon	25	0.04	30 minutos, HEPES, pH=7.4	0.9 [†]	[129]

[†] Calculado a partir dos dados expressos na respectiva referência bibliográfica

Voros, [129], estudou a adsorção de albumina a TiO₂ e Teflon por QCM e OWLS tendo obtido uma razão de massa adsorvida entre os dois métodos de cerca de 2.2 (Tabela 7). Razões comparativas ligeiramente inferiores entre a adsorção de BSA a TiO₂ estudada por QCM, OWLS e elipsometria foram obtidas num dos trabalhos de Höök *et. al.*, [67] , (ver Tabela 8). Em ambos os estudos, as razões entre a massa adsorvida obtida por QCM e a massa adsorvida obtida pelos métodos ópticos encontram-se em concordância com o intervalo atrás referido, que se situa-se entre 1.5 e 4.

Tabela 7 – Comparação da adsorção de BSA a TiO₂ estudada por QCM e OWLS.

Substrato	Γ por QCM-D (mg/m ²)	Γ por OWLS (mg/m ²)	Rácio entre Γ obtidas por QCM e OWLS
TiO ₂	1.65	0.73	2.3
Teflon	0.88	0.40	2.2

Tabela 8 – Comparação da adsorção de BSA a TiO₂ estudada por QCM, OWLS e elipsometria.

Método	Γ (mg/m ²)	Rácio entre Γ obtidas por QCM e método alternativo
Elipsometria	1.62	2.1
OWLS	2.14	1.6
QCM	3.33	-

Van de Keere *et. al.*, [145], estudaram a espessura da camada de HSA adsorvida, ao ar e em líquido, em mica e titânio CP com rugosidades médias quadradas de 0.04 e 0.17 nm respectivamente. A duração do tempo de adsorção foi limitado a um minuto para se obterem agregados de proteína pequenos e obtiveram os valores expressos na Tabela 9.

Tabela 9 – Espessura de HSA adsorvida em mica e titânio comercial, em seco e líquido.

Substrato	Rq (nm)	Espessura a seco (nm)	Espessura em líquido (nm)
Mica, [145]	0.04 ± 0.01	1.01 ± 0.25	4.60 ± 0.69
Mica, [138]	n.d.	2.9 – 3.5	n.d.
Titânio CP, [145]	0.17 ± 0.05	0.47 ± 0.11	3.92 ± 0.62

Geralmente considera-se que as proteínas globulares, como a BSA, apresentam maior afinidade para superfícies hidrofóbicas uma vez que a interacção entre a parte hidrofóbica da proteína e da superfície é suficiente para expulsar as moléculas de água situadas junto da superfície. Numa superfície hidrofílica existe forte afinidade entre esta e a água adsorvida pelo que torna-se mais difícil a proteína substituí-la. No entanto a adesão da BSA não depende apenas da hidrofobicidade da superfície como demonstrou Wang *et. al.*, [141], no estudo em que obteve forças de adesão da BSA a uma superfície hidrofílica superiores, comparativamente a outras superfícies hidrofóbicas. Estes resultados comprovam que existem outras forças além da hidrofóbica, como a electrostática e de van der Waals, com influência no processo de adsorção.

O adsorção de albumina é também estudada para verificar o seu efeito no coeficiente de fricção entre superfícies, [3].

2.5.3. Ácido Hialurónico

O ácido hialurónico foi descoberto por Karl Mayer e John Palmer em 1934 mas a sua estrutura apenas foi determinada mais de vinte anos depois, [150].

Estruturalmente o ácido hialurónico é formado pela repetição de ácido D-glucurónico e N-acetil-D-glucosamina, o que o torna num polímero linear não ramificado, [151,152]. O ácido hialurónico está presente, sob a forma de hialuronato, (Figura 16), em todos os vertebrados e também nas cápsulas de algumas estirpes de estreptococcus.

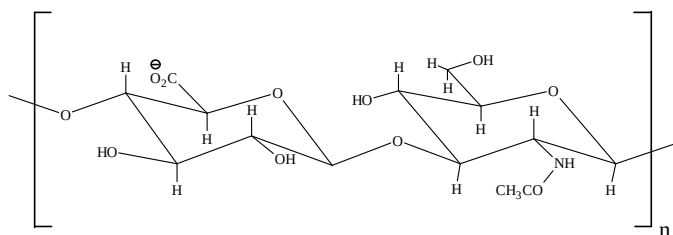


Figura 16 – Estrutura do hialuronato.

No corpo humano existe, por exemplo, no líquido vítreo ocular (0.1-0.4 mg/g), no fluido sinovial (3-4 mg/mL) e na matriz extracelular. Num adulto cerca de 50% da massa total de ácido hialurónico (7-8 g) encontra-se na pele com teores de 0.5 mg/g na derme e 0.1 mg/g na epiderme.

Em solução aquosa o hialuronato apresenta uma conformação de cadeia helicoidal torcida aleatoriamente, com um raio de giração de 200 nanómetros, [153], em resultado das ligações de hidrogénio internas e do facto de em cada dissacárido uma das faces é hidrofóbica e a outra é hidrofílica sequencialmente. No entanto a conformação e comportamento hidrodinâmico é fortemente dependente do pH, da concentração salina, das condições de fluxo e do peso molecular. De facto, o peso molecular do ácido hialurónico varia entre 10^4 a 10^7 Da dependendo da fonte e dos processos de purificação.

O hialuronato é usado na medicina, especialmente em oftalmologia, dermatologia e ortopedia, e nas últimas décadas a investigação direccionada às aplicações têm continuado incidindo também nos seus derivados como os ésters de hialuronato e os *hylans*, [154].

2.5.3.1. Estudos prévios sobre propriedades e adsorção de Ácido Hialurónico

Embora tenha sido descoberto há mais de 50 anos, as propriedades e principalmente os mecanismos de funcionamento do ácido hialurónico continuam longe de estarem clarificados, [155].

Tal como para a albumina, vários estudos demonstram que em solução o ácido hialurónico, sob a forma de hialuronato de sódio (NaHA), reduz o coeficiente de fricção, e que o seu efeito é superior ao da albumina, [3,157].

A formação de complexos entre o NaHA e a albumina, ou outras proteínas, é um tema que apresenta na literatura resultados controversos principalmente porque as condições experimentais são diversas.

É referido por Grymonpré *et al.* que os complexos entre o hialuronato e a albumina não se formam nas condições de pH fisiológicas ou seja próximo da neutralidade, [156]. Igualmente Taglienti *et al.* afirma que o hialuronato tem pouca interação com a albumina, [158]. Já Croll *et al.* vai mais longe ao referir que o hialuronato é não adesivo à maior parte das proteínas, [159].

De facto na maior parte dos estudos consultados a ligação entre o hialuronato e a albumina só é efectiva em condições ácidas. A excepção é a adsorção de NaHA à monocamada de BSA, adsorvida previamente ao polímero PMLG, (*poly(γ -methyl-L-glutamate*), que é realizada a pH=6.8, [131]. No entanto os estudos posteriores realizados pelos mesmos autores são efectuados em condições mais ácidas (pH=5.8-6.0), [149,160-162]. Estes mesmos estudos mostram que a quantidade de massa adsorvida de NaHA, em meio ácido, aumenta com o peso molecular, enquanto que a quantidade molar adsorvida tem comportamento inverso. Em todos os casos foi considerado que a adsorção de NaHA à BSA segue uma isotérmica de Langmuir. Foram ainda determinados o coeficiente de atrito e a força de adesão por AFM. O coeficiente de atrito era para o NaHA de 0.19 e aumenta com o aumento da proporção de BSA na solução enquanto que a força de adesão do NaHA era de 2.9 nN e tem comportamento inverso.

Hu *et. al.*, [163], estudaram a adsorção de BSA à camada de hialuronato (peso molecular de 7.6×10^5 Da), adsorvido em PHBV, *Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)*, e em quitosano e verificaram que era praticamente nula (inferior a 0.1 mg/m^2). Este valor corresponde a uma diminuição na adsorção de cerca de 90% em relação aos substratos não cobertos com hialuronato o que é outra evidência da fraca interação entre ambas as substâncias a pH neutro.

A adsorção directa de NaHA, com peso molecular de 4×10^6 Da, a mica e a grafite foi estudada por AFM, em meio seco, por Spagnoli *et al.*, que concluiu que a adsorção é superior na grafite por esta ser mais hidrofóbica, [164]. Já no estudo de Xu *et al.* não houve adsorção de NaHA, com peso molecular de 8.5×10^5 Da, a PMLG a pH=5.8, [162].

Existem ainda vários estudos sobre a formação de mono ou multicamadas de hialuronato com outras substâncias em vários substratos. No entanto para a formação de monocamadas é necessário funcionalizar o substrato de maneira a que se formem ligações covalentes que fixem o hialuronato, [165], enquanto que para a formação de multicamadas é necessário utilizar agentes de *cross-linking* para que estas sejam estabilizadas, [159,166,167].

3. Parte Experimental

3.1. Materiais e Reagentes

Os revestimentos de nitreto de titânio, TiN, nitreto de titânio e nióbio, NbTiN, e carbonitreto de titânio, TiCN, foram depositados por PVD em vários substratos pela empresa Ceramed (Lisboa). Como substratos utilizaram-se cristais de quartzo revestidos com ouro para utilização na microbalança de cristal de quartzo, discos de aço para o estudo de AFM e placas de aço para análise de XPS. Os cristais de quartzo foram adquiridos à KSV Instruments Ltd. Alguns discos foram polidos segundo o procedimento descrito mais à frente no texto.

As substâncias cujas adsorções se estudaram foram a albumina de soro bovino, BSA, (Albumin bovine fraction V, pH 7.0) ref. 11930 da Sigma e o hialuronato de sódio, NaHA, (Hyaluronic acid sodium salt from streptococcus equi. sp.) ref. 53747 da Sigma–Aldrich.

Prepararam-se soluções destas substâncias por dissolução em HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), ref. H8264 da Sigma com concentrações 0.05, 0.6, 4, 10 e 15 mg/mL para a BSA e 1 mg/mL para o NaHA. A solubilização de NaHA em HBSS mostrou-se difícil, à temperatura ambiente, pelo que nas soluções contendo esta substância se utilizou agitação mecânica durante pelo menos uma hora.

As soluções foram armazenadas a 8°C no frigorífico por um período máximo de 24 horas.

Na funcionalização das tips para a determinação das forças de adesão por AFM utilizou-se gluteraldeído, ref. G5882 da Sigma e (3-aminopropil)triethoxisilano, ref. 09324 da Fluka.

Outras substâncias, utilizadas na limpeza e polimento dos substratos e na limpeza do equipamento foram: SDS (Sodium dodecyl sulfate, for electrophoresis), ref. L3771 da Sigma, Extran, ref. 107555 da Merck, ácido sulfúrico a 96%, ref. 131058 da Panreac, álcool isopropílico puro da Pronalab, acetona ref. 131007, da Panreac, lubrificante líquido com partículas de diamante de 1µm, da Mecaprex, água destilada e desionizada (DD) e azoto canalizado.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparação de discos e cristais

Os revestimentos de TiN, TiNbN e TiCN foram depositados por PVD por evaporação por arco a 300 °C, [8]. Para a deposição de TiN e TiCN foi utilizado um cátodo de titânio enquanto que para a deposição do TiNbN foi utilizado um cátodo de liga de titânio e nióbio. A deposição foi conduzida nas seguintes condições: corrente do cátodo de 200 A e voltagem de 100 V (*bias voltage*); a pressão do gás era 1.4×10^{-2} mbar (atmosfera de azoto, nos casos dos TiN e TiNbN, e atmosfera de azoto e acetileno no caso do TiCN).

Antes da deposição dos revestimentos, os substratos de aço foram bombardeados com iões de titânio a 900V para limpeza da superfície.

Alguns discos revestidos, utilizados em AFM, foram polidos. O objectivo do polimento foi a diminuição da rugosidade de modo a tornarem-se perceptíveis os aglomerados de proteína após incubação e a zona de riscagem, na determinação da espessura de filme adsorvido. O polimento foi efectuado contra um pano de nylon Mecaprex Mag Top, no tribómetro TRM 1000 da Wazau controlado pelo software TriboV4 version 4.1, utilizando como lubrificante líquido com partículas de diamante de 1 μ m, da Mecaprex. Os discos com revestimento de TiN foram polidos durante sete minutos com uma carga de 30 N a uma velocidade linear de 142 mm·s⁻¹, [4]. Os discos com revestimentos de TiCN e TiNbN foram polidos durante 26 minutos com uma carga de 15 N a uma velocidade linear de 90 mm·s⁻¹.

Os cristais e discos com BSA adsorvida para ensaios de AFM foram preparados por imersão em solução de proteína durante 90 minutos. Para os ensaios de AFM a seco os cristais/discos são lavados com água desionizada e secos, primeiro moderadamente com azoto e por fim em forno de vácuo à temperatura ambiente durante pelo menos 60 minutos. Para os ensaios de AFM em líquido os cristais/discos são lavados e mantidos em água DD.

Nos ensaios de riscagem e obtenção das forças de adesão em AFM utilizaram-se soluções de BSA de concentração igual a 10 mg/mL.

Após cada utilização os cristais/discos são lavados durante 5 minutos por ultra-sons em solução 3% (m/m) de SDS. Em seguida passam por água corrente e por um banho de ácido sulfúrico durante um minuto. Depois de lavados com água corrente e com água desionizada são secos com azoto e guardados em local apropriado.

3.2.2. QCM

As isotérmicas de adsorção da BSA foram obtidas, a 25°C, realizando ensaios de adsorção na Microbalança de Cristal de Quartzo modelo QCM-Z500 da KSV Instruments Ltd. e o software de aquisição e de análise KSV QCM-Z500 Measurement Software version 2.1.3 e KSV QCM-Z500 Data Analyser version 1.6.2 ambos da KSV Instruments Ltd. Os valores dos parâmetros necessários à realização dos ensaios e análise de resultados encontram-se no anexo 7.2.

Para a obtenção da isotérmica de adsorção da BSA foram utilizadas soluções de BSA, em HBSS, com as seguintes concentrações: 0.05, 0.6, 4, 10 e 15 mg/mL. No estudo da adsorção de NaHA aos revestimentos ou a uma monocamada de proteína, utilizou-se uma solução de NaHA, em HBSS, com concentração de 1 mg/mL. No caso da adsorção simultânea as concentrações de BSA e NaHA eram 10 e 1 mg/mL respectivamente.

Em cada ensaio de adsorção é efectuado um ensaio prévio referente à transição do fluido, em contacto com o cristal, de ar para HBSS, para se definir o patamar inicial para a adsorção seguinte.

A adição de novas substâncias à célula de medida, ou o enxaguamento (*rinsing*) com HBSS, foram realizadas após a estabilização da frequência de vibração da etapa anterior.

Em todas as etapas é necessário manter a célula a temperatura constante pelo que as soluções devem ser previamente termostatzadas no *bypass* durante pelo menos 10 minutos.

Monitorizaram-se vários parâmetros entre os quais a frequência e a dissipação ao longo do tempo de todas as harmónicas (fundamental, 3ª, 5ª, 7ª, 9ª e 11ª). Os resultados foram obtidos por análise por pontos após

definição dos patamares de interesse. A curva da frequência fundamental nunca foi utilizada para tratamento de resultados, como indicado pelo fabricante.

Para cada concentração realizaram-se no mínimo três ensaios até se obterem resultados concordantes.

O procedimento de limpeza da QCM consistiu em várias lavagens da célula de medida e tubagem com solução 3% (m/m) de SDS deixando repousar durante alguns minutos, lavando de seguida com água corrente e água DD. Finalmente secava-se com azoto. As peças em teflon e viton foram lavadas durante 5 minutos por ultra-sons com solução de 10% (v/v) de Extran, seguido de lavagem com água corrente e com água DD. Finalmente secava-se com azoto.

No software de análise da microbalança, os resultados foram obtidos por ajuste aos valores experimentais, através da análise por pontos pelo método “RF+VL+L” (*rigid film + viscous layer + liquid*).

3.2.3. AFM

A obtenção de imagens e a determinação de forças de adesão, por microscopia de força atómica, foram realizadas utilizando o Digital Instruments CP-II System e vários modelos de *tips* (MPP-11120, MPP-31120, MLCT-AUNM) da Veeco Instruments. O software de aquisição é o ProScan version 1.9.00 da Digital Instruments.

As imagens a seco de substratos sem proteína foram obtidas com *tips* MPP-31120 em modo de contacto, enquanto que as imagens a seco de substratos com proteína foram obtidas com *tips* MPP-11120 em modo de *tapping*. As imagens em célula de líquidos de substratos com proteína foram obtidas com *tips* MPP-11120 em modo de *tapping*.

O tratamento de imagens e obtenção de vários parâmetros característicos topográficas das superfícies foram obtidos utilizando os programas de tratamento de imagem Image Processing and Data Analysis version 2.1.15 da TM Microscopes e Veeco DI SPMLab NT version 6.0.2 da Veeco Instruments.

As imagens obtidas foram corrigidas pelo processo de *flatten*, disponível no software de tratamento de imagem. Este tratamento foi feito na direcção de varrimento utilizando aproximações de 2ª e 3ª ordem, conforme o adequado, e excluindo picos e vales que influenciem a imagem final de modo indesejado. No caso de existirem linhas com descontinuidades na imagem aplicou-se o processo de *deglitch* que a suaviza.

Nalgumas imagens, o ruído excessivo tornou impossível o seu aproveitamento total, mas não impediu que se usassem algumas zonas da imagem para o estudo.

As riscagens em célula de líquidos foram obtidas com *tips* MPP-11120. Iniciou-se o processo de riscagem com uma imagem em *tapping*, de seguida realizaram-se várias imagens (pelo menos quatro) em contacto de 2x2 µm aplicando a força máxima permitida (normalmente entre 6000 e 12000 pN após calibração) e finalmente uma imagem em *tapping* para verificar que a riscagem foi efectuada, e efectuar as medidas da espessura da camada de proteína

As forças de adesão foram obtidas com *tips* MPP-31120, a seco, e MLCT-AUNM, em célula de líquidos, e calculadas a partir da curva força *versus* distância de afastamento subtraindo a força “zero”, que se admitiu ser a força a distâncias elevadas (cerca de 0.3 a 0.5 mm), e o mínimo do gráfico perto da distância de contacto. Cada ensaio de força de adesão consistiu em obter a curva de aproximação e afastamento numa área de 1x1 µm de malha de 8 por 8 à velocidade de 1 Hz.

Para determinar as forças de adesão em líquido entre substrato-BSA e BSA-BSA foi necessário funcionalizar as *tips* com proteína. Basicamente, após limpeza com descarga de plasma de argônio de 18W durante 30 minutos, os *cantilevers* contendo as *tips* foram incubados durante uma hora numa solução de 1% (v/v) de 3(aminopropil)triétoxissilano em etanol. Depois de serem lavados cuidadosamente, com acetona e abundantemente com água DD, os *cantilevers* foram incubados durante uma hora numa solução de 5% (v/v) de glutaraldeído em PBS. Os vestígios de glutaraldeído foram removidos lavando os *cantilevers* com PBS quatro vezes. Finalmente os *cantilevers* foram incubados durante uma hora numa solução de 20 mg/mL de BSA em HBSS, limpos com água DD e guardados em água a 4°C durante um período máximo de dois dias. Este método mostrou permitir suficiente mobilidade e flexibilidade das moléculas de proteína para se rodarem e orientarem na ligação às superfícies, [138].

3.2.4. XPS

Foram analisadas duas placas de aço de cada revestimento no laboratório de XPS do ICEMS (IST).

As análises foram efectuadas no equipamento Microlab 310F da VG Scanning. Os espectros foram obtidos à pressão de 5×10^{-9} mbar usando a fonte de raios-X Mg K α (15 kV / 20 mA). A identificação química foi baseada na ionização obtida com uma energia da passagem de 30 eV. Os fotoelectrões foram analisados a um ângulo de saída de 30°. Os factores de sensibilidade elementar foram obtidos da base de dados do sistema. As desconvoluções dos espectros foram obtidas por ajuste utilizando um algoritmo Gaussiano-Lorenziano.

Foram identificadas, nos espectros XPS de cada um dos três substratos cerâmicos, as bandas correspondentes às ejeções de electrões das orbitais Ti2p, Nb2p, N1s, O1s e C1s.

Por desconvolução das bandas experimentais, e após ajuste do pico adequado da desconvolução da orbital 1s do carbono ao valor de 285.1 eV, obtiveram-se as energias de ligação que foram atribuídas a vários tipos de ligações químicas.

As percentagens elementares foram obtidas por proporcionalidade das áreas de cada banda.

As percentagens elementares apresentadas no capítulo de resultados são as médias das duas análises efectuadas a cada material. Os valores percentuais em cada análise individual eram semelhantes.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise dos Substratos por XPS e AFM

4.1.1. XPS

A atribuição das ligações químicas às bandas obtidas por desconvolução das bandas dos espectros (Figura 17 e Figura 18) foi efectuada comparando-as com valores da literatura. Através dos artigos de Bertóti *et al.*, [168], e Kirchner *et al.*, [169], atribuíram-se a maior parte das bandas do espectro do TiN. Como as ligações químicas existentes no TiN também estão presentes nos outros cerâmicos, grande parte destas ficam automaticamente identificadas. O espectro da orbital 2p do nióbio foi caracterizado por comparação com os valores de Jouve *et al.*, [170]. A banda que faltava definir no espectro da orbital 1s do carbono do TiCN foi atribuída por comparação com o valor de Dong *et al.*, [102].

Por desconvolução da banda da orbital 2p do titânio obtiveram-se, em todos os materiais quatro bandas, duas delas correspondem a dupletos. As duas bandas principais são atribuídas às ligações TiN e TiO₂ por ordem crescente de energia, [168,169].

A banda do nióbio existe apenas no TiNbN e por desconvolução obtem-se quatro bandas. Duas bandas são atribuídas às ligações NbN e Nb₂O₅ por ordem crescente de energia, [170], e as restantes duas correspondem a dupletos.

A desconvolução da banda da orbital 1s do azoto é a mais difícil de caracterizar porque a localização dos picos variou muito de análise para análise. Ainda assim, pode-se admitir, com base na literatura, a atribuição das seguintes ligações químicas, por ordem crescente de energia, às três bandas: TiN_{1+x}, TiN, TiO_xN_y, [168-171].

A desconvolução da banda da orbital 1s do oxigénio é consensual na literatura que atribui a banda de mais baixa energia ao TiO₂, [168], e a de maior energia a ligações OH provenientes de água adsorvida, [168-171].

A desconvolução da banda da orbital 1s do carbono originou entre duas e quatro bandas. A banda entre 281.7 e 282.1 eV existe apenas no TiCN e corresponde à ligação TiC, [102]. A banda que se situa entre 283.9 e 284.9 eV existe em todos os materiais e corresponde a ligações C-C ou C-H. Esta foi a banda que se utilizou para ajuste aos 285.1 eV. Depois aparecem mais uma ou duas bandas, consoante a análise, que foram atribuídas a ligações C=O e a outras contaminações orgânicas, [168,169].

A existência de oxigénio e carbono nos cerâmicos que não os deviam conter, como são os casos do TiN e do TiNbN, é explicada pela difusão e adsorção de oxigénio atmosférico, água e compostos orgânicos.

Na Tabela 10 apresentam-se as gamas dos picos de desconvolução obtidos para as várias análises e a ligação química atribuída.

Tabela 10 – Desconvolução das bandas de XPS e atribuição dos picos a ligações químicas.

Banda	Desconvolução (eV)	Ligação química
Ti (2p)	455.4 – 456.1	TiN ou TiN_xO_y
	457.8 – 458.4	TiO_2
Nb (2p)	203.8 – 204.3	NbN
	207.2 – 207.7	Nb_2O_5
N (1s)	395.7 – 396.5	TiN_{1+x}
	396.9 – 398.0	TiN
	399.5 – 400.0	TiN_xO_y
O (1s)	529.8 – 530.3	TiO_2
	531.8 – 532.6	OH
C (1s)	281.7 – 282.1	TiC
	283.9 – 284.9	C-C ou C-H
	285.4 – 286.4	C=O
	287.8 – 288.3	contaminações orgânicas

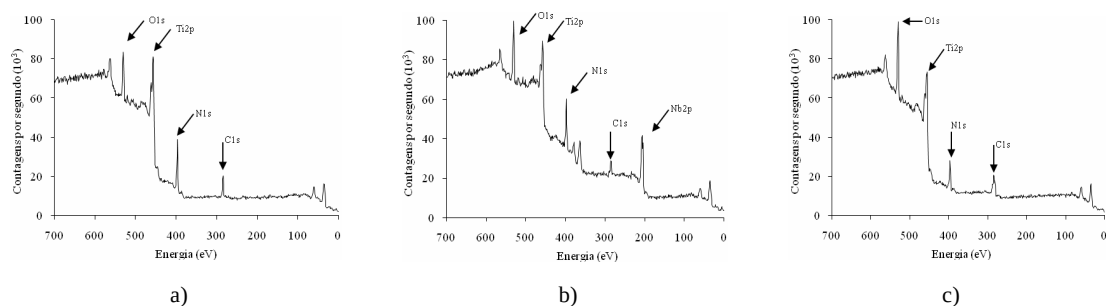


Figura 17 – Espectros XPS de: a) TiN, b) TiNbN e c) TiCN.

As áreas de cada banda, definidas até à linha base, permitem calcular a percentagem de cada ligação química e com as somas referentes a cada elemento químico obtiveram-se as composições químicas elementares superficiais, expressas na Tabela 11.

Tabela 11 – Composição química percentual elemental superficial dos revestimentos.

	TiN	TiNbN	TiCN
Ti	30.7	22.8	27.1
N	20.8	20.6	10.3
O	34.1	38.0	41.0
C	14.4	11.5	21.6
Nb	-	7.2	-
Total	100.0	100.0	100.0

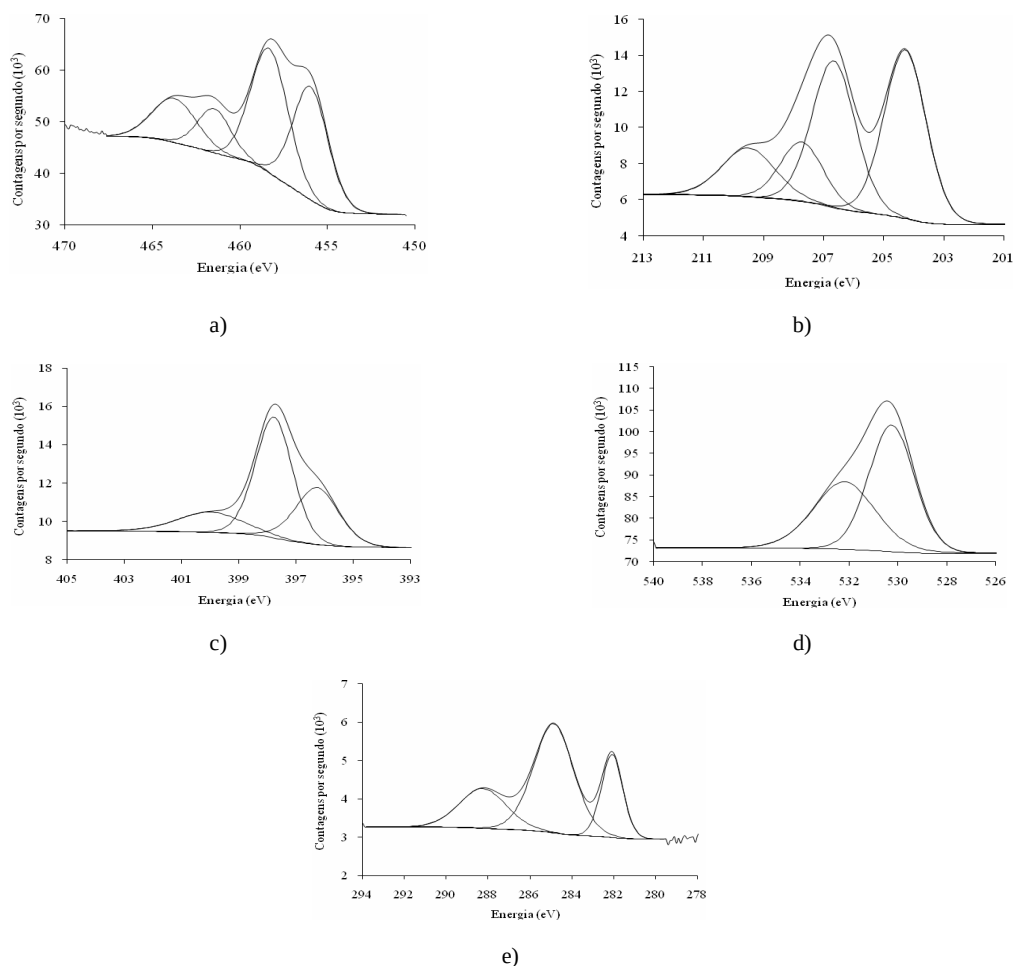


Figura 18 – Exemplos de desconvoluções de bandas das orbitais a) Ti2p, b) Nb2p, c) N1s, d) O1s e e) C1s.

Pelas percentagens elementares apresentadas e pelas considerações que serão descritas a seguir observa-se que a percentagem média conjunta dos metais depositados a partir do cátodo (titânio e nióbio) é de 29.3%, enquanto que a percentagem média conjunta do azoto e carbono depositados a partir dos gases é de 19.6%.

A banda da ligação TiC no TiCN corresponde a uma percentagem média de 5.4%. Nos casos do TiN e do TiNbN todo o carbono é proveniente de contaminações pelo que admitindo um máximo de 14.4% de carbono por esta via (máximo obtido na análise do TiN) obtem-se uma percentagem média de carbono depositado por PVD no TiCN de 7,2%. Este valor não é absurdo dado que 5.4% corresponde à banda TiC. O restante pode estar contido na banda C-C, que apresenta maior percentagem comparativamente aos casos do TiN e TiNbN, já que no TiCN podem existir ligações C-C entre átomos de carbono depositados por PVD.

Com estas percentagens obtem-se uma fórmula genérica para o revestimento depositado de $Ti_xNb_{1-x}N_yC_{0.67-y}$ com $0 \leq x \leq 1$ e $0 \leq y \leq 0.67$.

No entanto é de realçar que a análise XPS efectuada tem uma profundidade máxima de 5 nm, [172], que é comparável à camada natural de óxido.

4.1.2. AFM

Através das imagens obtidas por AFM verifica-se que o aço utilizado como substrato apresenta depressões significativas que podem atingir na vertical cerca de $1\text{ }\mu\text{m}$. Estas depressões mantêm-se após o revestimento por PVD como se verifica na Figura 19.

A rugosidade depende da área e zona da imagem analisada. A rugosidade do aço e revestimentos, ambos não polidos, em áreas de $30\times 30\text{ }\mu\text{m}$ ou $50\times 50\text{ }\mu\text{m}$ varia entre de cerca de 30 e 40 nm. Seleccionando zonas menores e mais lisas ($10\times 10\text{ }\mu\text{m}$) obtêm-se rugosidades nas amostras não polidas entre 3 e 25 nm. Após polimento, (Figura 20), a rugosidade diminui até cerca de 10 nm nas imagens maiores e até cerca de 1 nm nas imagens $10\times 10\text{ }\mu\text{m}$. Em áreas de $10\times 10\text{ }\mu\text{m}$ os cristais utilizados na QCM-D apresentam rugosidades ligeiramente superiores às dos discos polidos (3 a 8 nm). Na Tabela 12 apresentam-se os valores médios da rugosidade média, R_a , em substratos polidos e não polidos obtidos em imagens de várias dimensões.

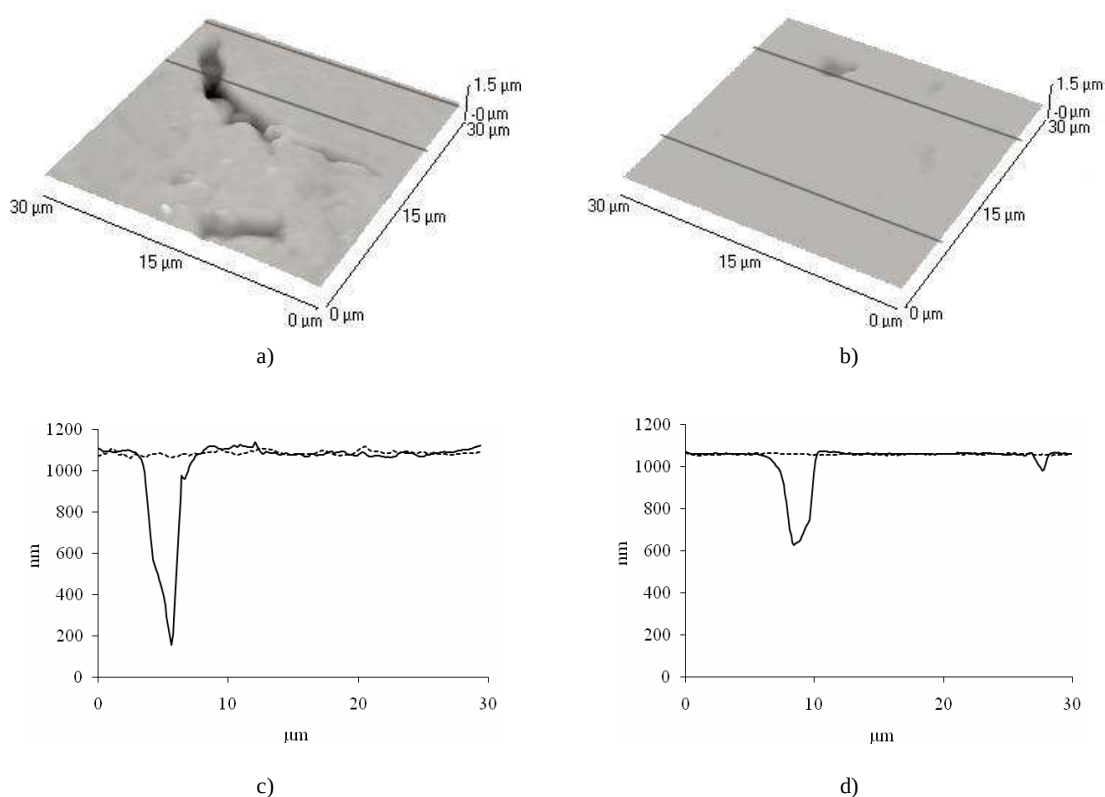


Figura 19 – Imagens topográficas 3D de: a) aço não polido, b) TiNbN não polido. Em baixo apresentam-se os perfis (a cheio e tracejado) das linhas seleccionadas nas imagens topográficas: c) aço não polido, d) TiNbN não polido.

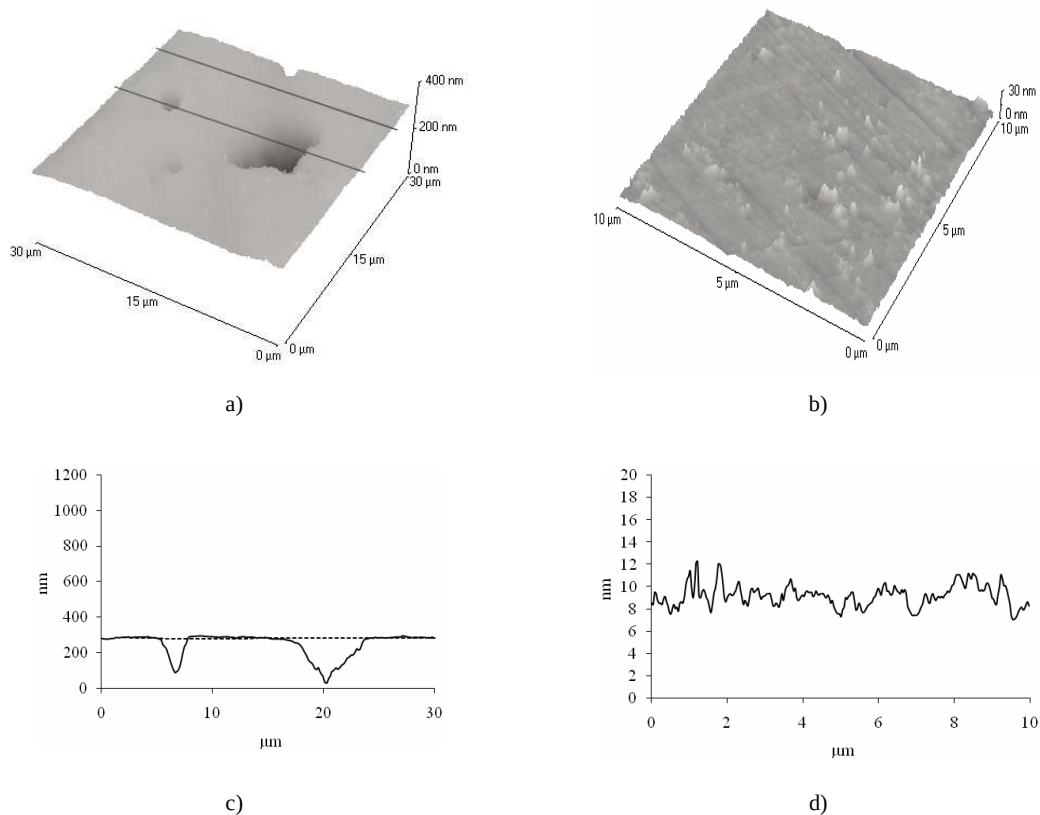


Figura 20 – Imagens topográficas 3D de: a) TiCN polido 30x30 μm, b) TiCN polido 10x10 μm. Em baixo apresentam-se os perfis (a cheio e tracejado) das linhas seleccionadas nas imagens topográficas a) e b).

Tabela 12 – Gammas de rugosidade média R_a , obtida por AFM, de aço utilizado como substrato e dos revestimentos.

	10x10 μm	30x30 μm ou 50x50 μm	136x136 μm
Aço			
não polido	3 – 10	7 – 25	n.d.
TiN			
não polido	16 – 23	34 – 43	n.d.
polido	1.2 – 3.2	n.d.	n.d.
TiNbN			
não polido	8 – 12	22 – 32	n.d.
polido	1.1 – 1.5	10 – 22	21 – 26
TiCN			
não polido	6 – 25	33 – 61	n.d.
polido	1.1 – 1.6	7 – 14	16 – 26

4.2. Análise das Adsorções

4.2.1. Análise da Adsorção de Albumina por QCM e AFM

Ao adicionar-se BSA à célula de medida da QCM verifica-se uma diminuição na frequência de vibração do cristal, indicativo de que houve um aumento na massa acoplada a este, como se mostra na Figura 21 para um ensaio com TiNbN. Após a lavagem com HBSS (*rinsing*) verifica-se uma diminuição na variação da frequência de vibração, em relação ao ponto inicial, indicativo que alguma massa se desorveu.

De acordo com a Figura 22 a desorção é tanto maior quanto maior a concentração da solução, o que é equivalente a dizer que a desorção é tanto maior quanto maior a concentração superficial de BSA.

Uma das explicações é que, à medida que a concentração superficial aumenta, diminui a área de contacto disponível entre a proteína e a superfície pelo que aquela não se encontra ligada ao substrato tão fortemente quanto nas concentrações mais baixas. Podemos imaginar que em concentrações baixas, a BSA se adsorve na forma *side-on* e que, à medida que a concentração superficial aumenta, o espaço disponível para novas moléculas se adsorverem vai diminuindo pelo que algumas das moléculas passam a ligar-se na forma *end-on*. Nesta forma a área de contacto e a força de ligação à superfície são menores pelo que quando é efectuado o *rinsing* algumas moléculas são arrastadas.

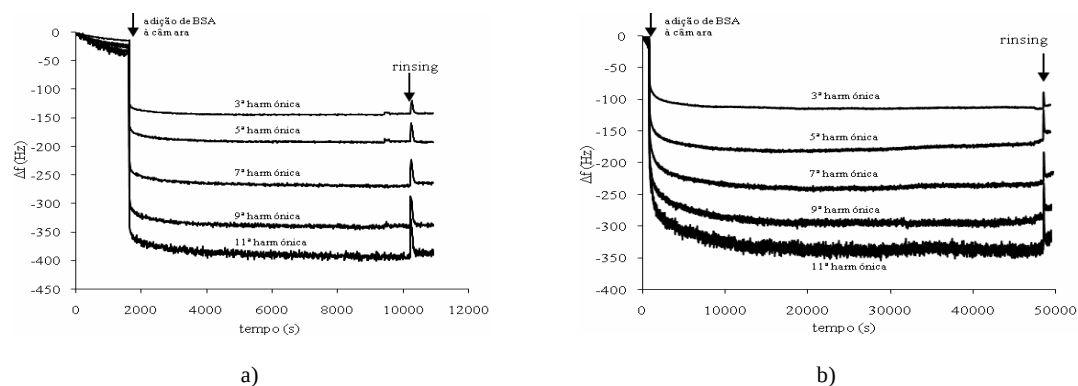


Figura 21 – Ensaio, curta e longa duração, de adsorção de BSA (10 mg/mL) a superfície de TiNbN: a) ensaio NbTiN 10 5.21; b) ensaio NbTiN 10 8.9.

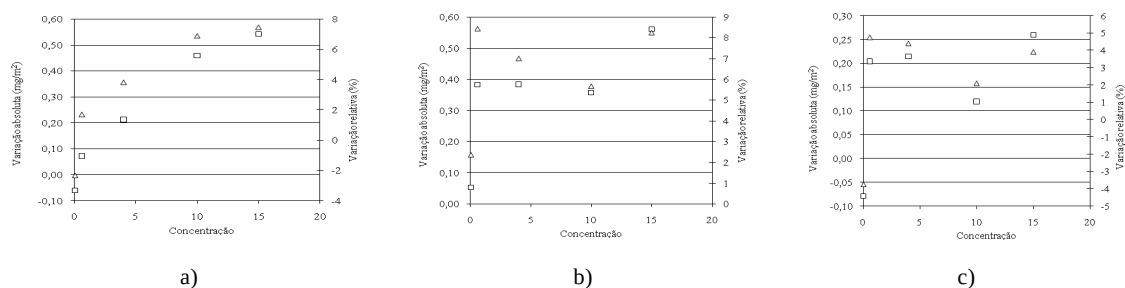


Figura 22 – Variação absoluta (quadrado) e relativa (triângulo) de massa adsorvida após o rinsing: a) em TiN, b) em TiNbN e c) em TiCN.

Podemos admitir que o filme de BSA adsorvida tem um comportamento rígido uma vez que a variação de dissipação por cada 5 Hz de variação de frequência de vibração, $\Delta D/(\Delta f/5)$, é inferior a 10^{-6} , que é o valor a partir do qual se considera que o filme não é rígido, Figura 23. Outra forma de o verificar é comparar os resultados obtidos pelos modelos de Sauerbrey e Sauerbrey modificado. Pela Tabela 13 verifica-se que os dois modelos apresentam resultados com diferenças inferiores a 8% pelo que, considerar que, o filme é rígido é uma aproximação aceitável.

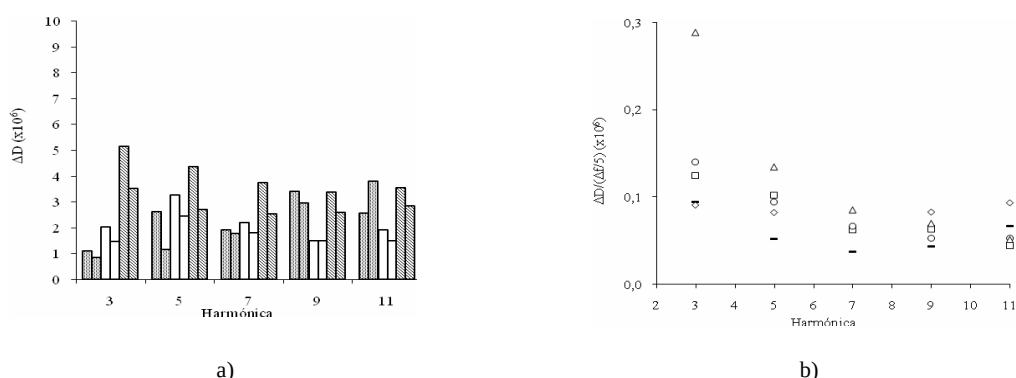


Figura 23 – Dissipação média do filme de BSA em TiN em várias harmónicas: a) dissipação total, antes e após do *rinsing*, nas concentrações de 0.6 mg/mL (ponteados), 4 mg/mL (branco) e 10 mg/mL (linhas diagonais), em que para cada concentração a barra da esquerda corresponde ao “antes” e a da direita ao “após”; b) $\Delta D/(\Delta f/5)$, após o *rinsing*, nas concentrações 0.05 mg/mL (traço), 0.6 mg/mL (losango), 4 mg/mL (quadrado), 10 mg/mL (círculo) e 15 mg/mL (triângulo).

Tabela 13 – Diferenças percentuais entre as médias de concentração superficial entre os modelos de Sauerbrey Modificado e Sauerbrey.

Concentração (mg/mL)	Diferença percentual no TiN	Diferença percentual no TiNbN	Diferença percentual no TiCN
0.05	2.2	3.1	7.6
0.6	1.2	0.4	0.4
4	2.6	1.7	4.2
10	4.3	2.0	2.8
15	6.1	2.5	1.3

A Figura 24 mostra que para valores baixos de adsorção todas as harmónicas conduzem a valores semelhantes de massa adsorvida, Γ . À medida que a adsorção aumenta, as harmónicas de ordem mais elevada originam valores mais baixos de Γ , pelo que não existe correlação perfeita entre todas as harmónicas como definido pela equação 26.

Os estudos realizados por QCM e AFM permitem admitir que a adsorção de BSA nos três materiais estudados é quantitativamente semelhante. Embora a ordem de adsorção nos materiais, em termos de concentração superficial, Γ , se mantenha geralmente a mesma, com maior adsorção no TiN seguido do TiNbN e do TiCN, a verdade é que as diferenças absolutas entre as médias de Γ não são muito significativas quando comparadas com os erros associados, como se verifica na Tabela 14 e Figura 25.

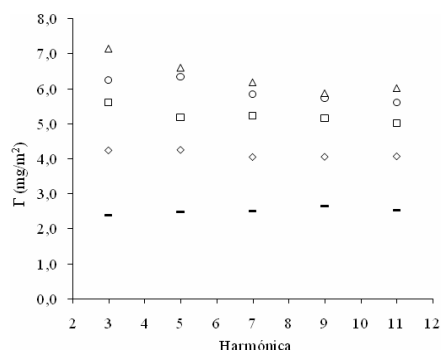


Figura 24 – Médias de Γ na adsorção em TiN a várias concentrações em várias harmônicas: 0.05 mg/mL (traço), 0.6 mg/mL (losango), 4 mg/mL (quadrado), 10 mg/mL (círculo) e 15 mg/mL (triângulo).

Tabela 14 – Médias da massa do filme adsorvido em vários materiais e em várias concentrações da solução de BSA (modelo de Sauerbrey modificado).

Concentração (mg/mL)	TiN Γ (mg/m ²)	TiNbN Γ (mg/m ²)	TiCN Γ (mg/m ²)
0.05	2.6 ± 0.5	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.3
0.6	4.2 ± 0.9	4.2 ± 1.4	4.1 ± 1.4
4	5.4 ± 1.0	5.1 ± 0.7	4.6 ± 0.7
10	6.2 ± 0.8	5.9 ± 1.0	5.6 ± 1.0
15	6.7 ± 1.2	6.3 ± 0.9	6.3 ± 0.9

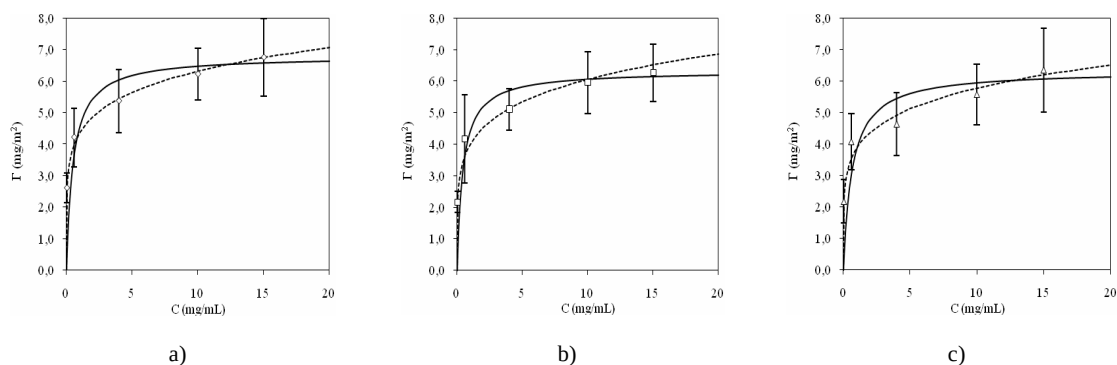


Figura 25 – Ajuste de isotérmicas de adsorção de BSA, médias experimentais e erros associados: a) TiN, b) TiNbN e c) TiCN. Isotérmica de Langmuir: linha a cheio, e isotérmica de Freundlich: linha pontuada.

Por linearização das isotérmicas de Langmuir e Freundlich, equações 14 e 18, obtêm-se todos os valores dos parâmetros que melhor as ajustam aos valores experimentais, e através da equação 15 determinam-se as variações da energia de Gibbs de adsorção, ΔG_0^{ads} , (Tabela 15).

No ajuste dos valores experimentais às isotérmicas obtém-se melhor coeficiente de correlação para a isotérmica de Langmuir como está expresso na Figura 26, no entanto, curiosamente, o desvio absoluto nos valores experimentais em relação às isotérmicas é menor no caso da isotérmica de Freundlich como se pode

observar nas Figuras 25 e 26. De facto para concentrações baixas (0.05 e 0.6 mg/mL) o desvio relativo em relação à isotérmica de Langmuir é muito elevado, e nas concentrações mais altas (4, 10 e 15 mg/mL) não se verifica a estabilização de Γ num patamar como supõe uma das hipóteses da isotérmica de Langmuir. Para a construção de uma isotérmica inequívoca deveriam ter sido estudadas concentrações superiores no entanto para o objectivo do trabalho tal é desnecessário uma vez que a concentração da BSA no líquido sinovial é muito inferior à concentração sanguínea.

Tabela 15 – Parâmetros obtidos por ajuste dos valores experimentais às isotérmicas de Langmuir e Freunlich.

	TiN	TiNbN	TiCN
Γ_{∞} (mg/m ²)	6.78	6.32	6.33
K_L (L/g)	2.00	2.31	1.56
ΔG_0^{ads} (KJ/mol)	-39.2	-39,6	-38,6
K_F	4.34	3.99	3.88
n_F	6.16	5.56	5.77

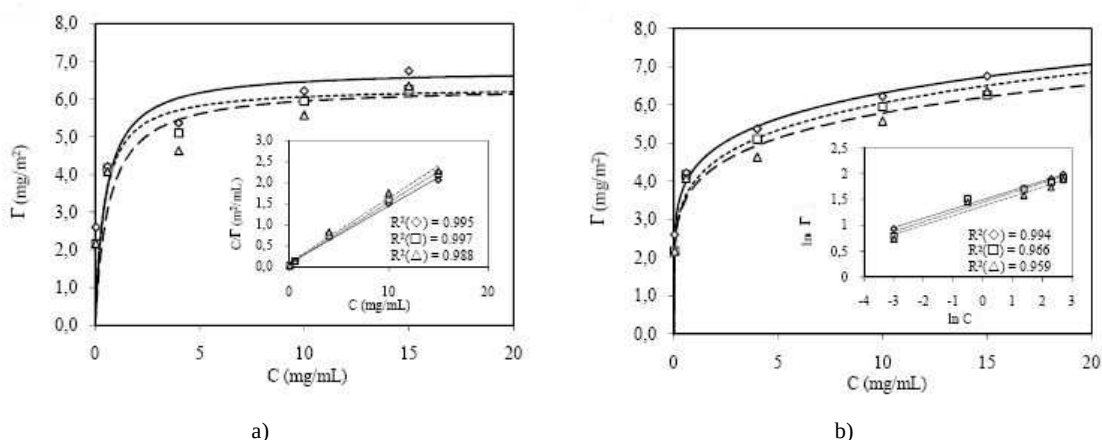


Figura 26 – Ajuste de isotérmicas de adsorção de BSA a vários materiais: TiN (linha a cheio), TiNbN (pontead) e TiCN (tracejado). Médias experimentais: TiN (losango), TiNbN (quadrado) e TiCN (triângulo). a) isotérmica de Langmuir e b) isotérmica de Freundlich.

A módulo de corte (elasticidade) e viscosidade dos filmes de proteína, parâmetros necessários no modelo de Sauerbrey modificado, foram obtidas no software de análise da balança QCM. Na Figura 27 apresentam-se os valores correspondentes aos filmes antes do rinsing uma vez que a análise após o rinsing resulta em valores médios semelhantes mas com barras de erro superiores que ultrapassam o limite físico do zero.

Apesar de as barras de erro serem muito grandes, parece haver a tendência de diminuição do módulo de corte com o aumento da concentração. Este comportamento está de acordo com as observações anteriores da variação da dissipação com a concentração. De facto, na Figura 23a) verifica-se que nas três primeiras harmónicas, (as mais sensíveis), a dissipação aumenta com a concentração o que é indicativo que que nas maiores concentrações o filme é menos rígido, tal como se conclui da diminuição do módulo de corte (Figura 27).

A viscosidade parece ter um comportamento semelhante no entanto não encontramos explicação para este facto uma vez que à medida que a adsorção aumenta o filme deveria ficar mais viscoso e não o contrário.

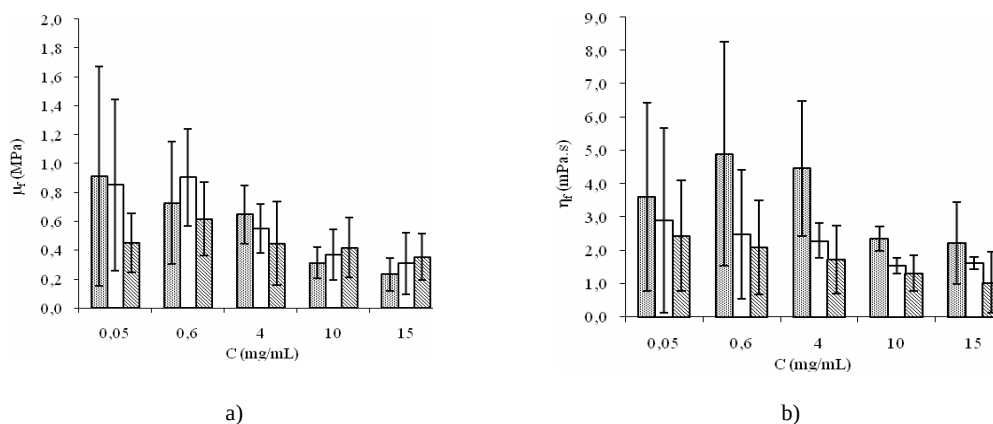


Figura 27 – a) Módulo de corte e b) viscosidade dos filmes de BSA em TiN (ponteados), TiNbN (branco) e TiCN (linhas diagonais).

No mesmo software é obtido a espessura do filme. Na Figura 28 apresentam-se os valores após o *rinsing*. Os valores da espessura, para a mesma concentração de proteína em solução, são semelhantes nos três materiais e aumentam quando a concentração aumenta. Por exemplo, para a concentração de BSA em solução de 10 mg/mL as espessuras foram: 6.6 ± 0.8 nm no TiN, 7.6 ± 1.6 nm no TiNbN e 5.6 ± 1.0 nm no TiCN. Existem duas explicações, não exclusivas, para que exista a dependência da espessura com a concentração: o software determina a espessura do filme como a média das espessuras entre a área coberta e não coberta por proteína e por isso apresenta um valor intermédio, e, como a BSA é uma proteína não-rígida, à medida que a superfície vai sendo preenchida a conformação altera-se de *side-on* para *end-on*, o que está de acordo com o que já foi dito anteriormente (página 48).

No entanto, o mais importante a registar é que se obtiveram valores de espessura do filme compatíveis com a formação de uma monocamada. O mesmo sucedeu no valor estimado por riscagem em AFM de superfícies com BSA adsorvida onde se obtiveram espessuras médias entre 3.5 e 4.9 nm. A espessura média foi obtida por diferença entre a média da altura no interior da riscagem e a média da altura no exterior dos picos resultantes da acumulação de proteína. Na Figura 29 e na Tabela 16 apresentam-se perfis característicos das riscagens e os valores obtidos para as espessuras médias nos três materiais obtidas pelos perfis respectivos. Os valores obtidos são concordantes com os expressos por van de Keere *et. al.*, [145], que obtêm espessuras da HSA em meio líquido de 4.6 ± 0.7 nm em mica e 3.9 ± 0.6 nm em titânio CP.

Se admitirmos que na adsorção de BSA o rácio entre a massa total da camada de filme e a de proteína adsorvida varia entre 1.6 e 2.3, como referido atrás (ver página 36), [67,129], e que a monocamada corresponde a uma concentração superficial de filme de 6.5 mg/m^2 (média dos três materiais), então a concentração superficial de BSA varia entre 2.8 e 4.1 mg/m^2 . O valor mais baixo é superior à monocamada em *side-on*, enquanto que o valor mais alto, dependendo das fontes (ver Tabela 5), está próximo ou ultrapassa a monocamada em *end-on*. Seria, portanto, importante conhecer o valor deste rácio para melhor prever a orientação da proteína

adsorvida. De qualquer forma demonstrou-se, por QCM e AFM, que a espessura do filme é compatível com a adsorção em monocamada.

Para se obter um valor mais exacto para o rácio acima descrito a adsorção deveria ter sido também estudada por um qualquer método óptico, referido no texto.

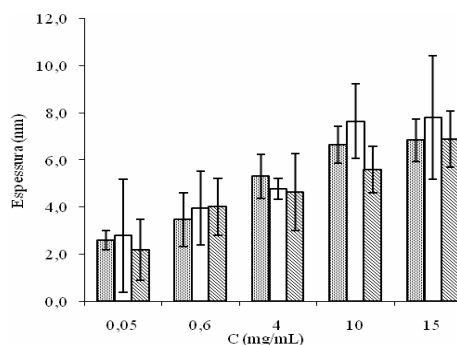


Figura 28 – Espessura dos filmes de BSA por QCM-D, após o *rinsing*, em TiN (ponteados), TiNbN (branco) e TiCN (linhas diagonais).

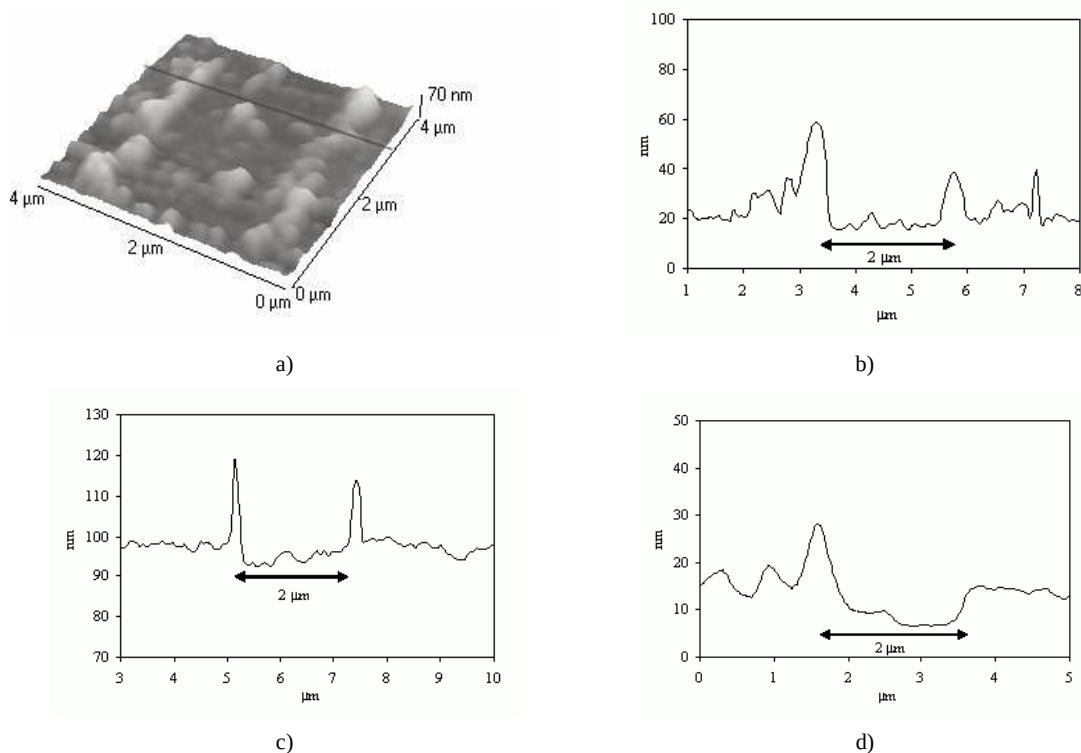


Figura 29 – Riscagem de filmes de BSA em AFM, após o *rinsing*: a) imagem topográfica 3D da riscagem em TiNbN, b) perfil da linha seleccionada na imagem topográfica, c) perfil da riscagem em TiN, d) perfil da riscagem em TiCN.

Tabela 16 – Espessuras das riscagens em AFM.

Revestimento	Espessura média (nm)
TiN	3.5
TiNbN	3.5
TiCN	4.9

Na Figura 30 faz-se a comparação entre superfícies sem e com BSA adsorvida através das imagens topográficas em três dimensões obtidas por AFM. Nas imagens sem proteína observam-se alguns sinais particulares da superfície, em particular riscos causados pelo polimento e pequenos picos que podem ser gotículas resultantes da deposição por PVD ou contaminações. Nas imagens com proteína estes defeitos esbatem-se com a camada de proteína adsorvida na superfície. Além disso, em dois dos três substratos analisados, TiN e TiCN, a rugosidade diminuiu, como se verifica na Tabela 17, o que pode ser explicado pela cobertura pela proteína das depressões existentes inicialmente.

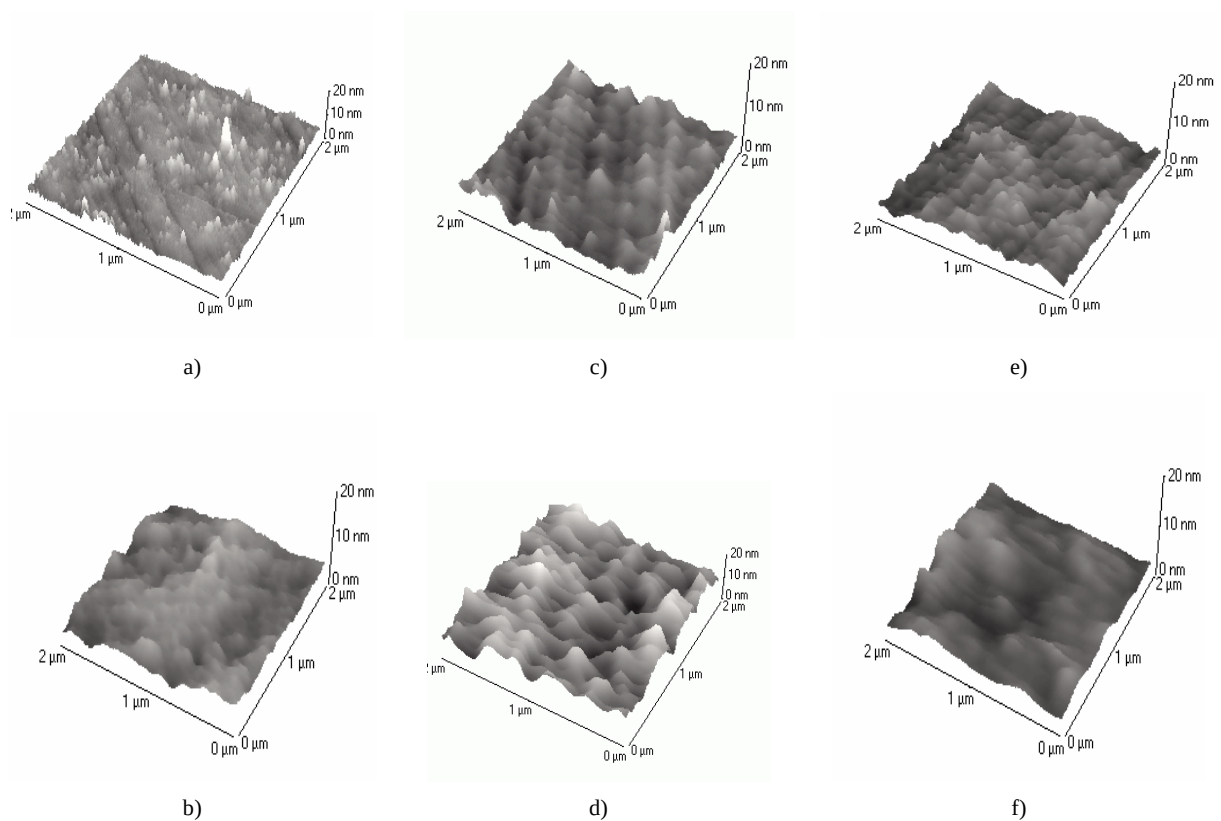


Figura 30– Comparação entre imagens topográficas de substratos sem e com BSA: a) TiN sem BSA, b) TiN com BSA, c) TiNbN sem BSA, d) TiNbN com BSA, e) TiCN sem BSA e f) TiCN com BSA.

Tabela 17 – Comparação entre a rugosidade, R_a , e a distância *peak-to-valley*, pV, das superfícies sem e com proteína da Figura 30.

Revestimento	Sem proteína	Com proteína
TiN	R_a : 1.07 pV: 17.89	R_a : 0.87 pV: 7.18
TiNbN	R_a : 0.79 pV: 10.10	R_a : 2.45 pV: 10.93
TiCN	R_a : 0.81 pV: 7.54	R_a : 0.72 pV: 5.60

4.2.2. Análise da Adsorção de Ácido Hialurónico por QCM

Foi estudada a adsorção de hialuronato de sódio a TiNbN através de QCM-D tendo sido verificado que a adição do hialuronato provoca diminuição da frequência de vibração o que é indicativo da adsorção à superfície.

No entanto nos quatro ensaios efectuados, em que a concentração da solução em hialuronato de sódio era 1 mg/mL, verificou-se elevada dispersão na variação da frequência de vibração, pelo que o erro associado à média obtida é relativamente elevado, (Figura 31).

A concentração superficial resultante da adsorção de hialuronato de sódio calculada pelo método de Sauerbrey modificado foi de $1.5 \pm 0.5 \text{ mg/m}^2$.

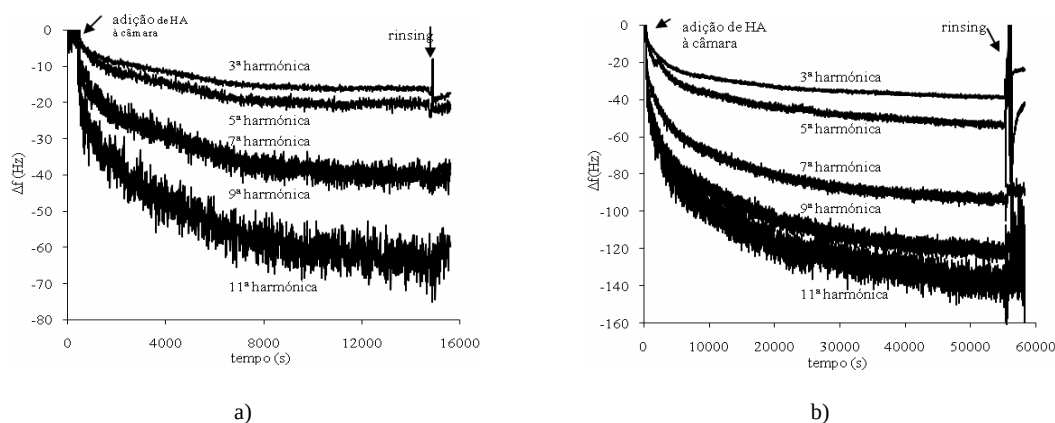


Figura 31 – Ensaio de adsorção de hialuronato de sódio (1 mg/mL) a superfície de TiNbN: a) ensaio NbTiN HA1 5.23; b) ensaio NbTiN HA1 8.12.

A variação de dissipação por cada 5 Hz de variação de frequência de vibração foi inferior a 10^{-6} , (ver Figura 32), por isso pelo que critério já referido admite-se que a camada de hialuronato de sódio adsorvida tem comportamento rígido. Uma explicação plausível para que o filme seja compacto é a de que a cadeia linear do hialuronato ao se adsorver se estenda ao longo da superfície, [164], e não como um aglomerado com água aprisionada no interior. Assim a cadeia adsorvida junto à superfície apresenta um comportamento rígido, [158].

Como a adsorção do NaHA foi relativamente baixa comparado com a adsorção de BSA optou-se por não se testa-la nos outros dois revestimentos, dando ênfase ao estudo da proteína.

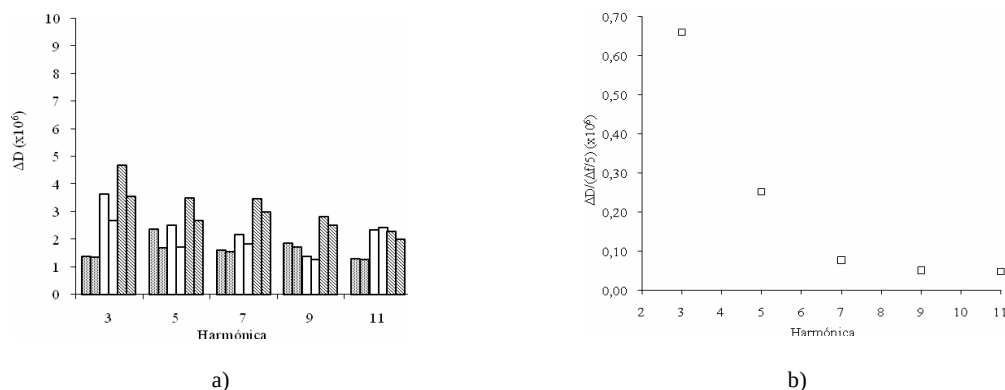


Figura 32 – a) dissipação total, em várias harmônicas, do filme de hialuronato de sódio, antes e após o *rinsing*, barras esquerda e direita, respectivamente; b) $\Delta D/(\Delta f/5)$ após o *rinsing*.

4.2.3. Análise da Adsorção de Conjunta de Albumina e Hialuronato de Sódio por QCM

Os ensaios de adsorção sequencial mostram que o hialuronato de sódio não se adsorve à camada de BSA uma vez que em 12 dos 13 ensaios realizados, com TiN, TiNbN e TiCN, a generalidade das frequências vibração não só não desceu, após adição de hialuronato, como teve uma ligeira variação positiva indicando que alguma da massa de proteína desorveu. Houve apenas um ensaio inconclusivo em que a frequência desceu o que pode ter-se devido a variações de pressão na câmara durante a manipulação da válvula da balança já que a quando do rinsing houve uma subida na frequência muito elevada.

As únicas explicações para a subida da frequência, ou seja para a desorção de proteína, são o arrastamento de proteína fracamente adsorvida à superfície ou a desorção por formação de um complexo solúvel estável com o hialuronato de sódio.

Os resultados confirmam a fraca interação, a pH neutro, entre a albumina adsorvida e o hialuronato de sódio demonstrada para a HSA por Hu *et. al.*, [163].

A adsorção simultânea de BSA e hialuronato de sódio em TiN resulta numa concentração superficial de $6.5 \pm 1.0 \text{ mg/m}^2$ que é um valor semelhante à da adsorção monocomponente de BSA, $6.7 \pm 0.7 \text{ mg/m}^2$. Considerando os erros calculados, não é possível afirmar que esta pequena diferença é resultado da presença do hialuronato de sódio na solução. Uma explicação plausível para esta semelhança é que a maioria da massa adsorvida corresponde a BSA uma vez que, sendo esta molécula mais pequena que o do hialuronato, o seu transporte, na solução viscosa, para junto da superfície, é mais rápido e por isso quando aquele se aproxima encontra a monocamada de proteína e não a superfície do cerâmico. Como se viu nos ensaios sequenciais o hialuronato de sódio não se adsorve à camada de BSA, pelo que provavelmente também não se adsorverá nos ensaios simultâneos.

Por estes motivos a adsorção simultânea em TiNbN e em TiCN não foi estudada uma vez que, admitindo que o NaHA ao chegar à superfície interage com a proteína e não com o revestimento, o substrato terá pouca influência na adsorção à monocamada de BSA.

4.3. Forças de Adesão

Determinaram-se experimentalmente as forças de adesão, a seco e em célula de líquidos, em diferentes condições. Os resultados experimentais foram comparados com os obtidos pelo tratamento de Hamaker de previsão de forças de van der Waals.

As amostras utilizadas foram revestimentos de TiN e TiNbN virgens ou com BSA adsorvida. As tips foram utilizadas virgens ou funcionalizadas com BSA.

As forças de adesão obtidas a seco, entre amostras e tips virgens, são entre uma e duas ordens de grandeza superiores às obtidas em célula de líquidos. Enquanto que em célula de líquidos a força de adesão foi sempre inferior a 1 nN, a seco obtiveram-se valores entre 20 e 100 nN. A razão para diferença entre as forças de adesão a seco e em água assenta na força de capilaridade. Os ensaios a seco são afectados pela humidade adsorvida nas superfícies que devido às forças de capilaridade tornam a separação entre a amostra e a tip mais difícil, [173].

A força de adesão média a seco, em 48 pontos, no TiN polido foi 35 ± 3 nN, (ver Figura 33). No TiNbN não polido a força de adesão média a seco, em 26 pontos, foi 24 ± 2 nN. Os resultados experimentais de adesão a seco não estão em concordância com o estudo de Bowen *et. al.*, [80], na qual dizem que a força de adesão aumenta com a rugosidade. No entanto como se apresenta apenas um resultado para cada material, como a diferença de rugosidades não é muito elevada e como a seco a força de adesão depende da humidade, e esta não foi controlada, não podemos afirmar com total certeza que a diferença na força de adesão a seco se deve à rugosidade.

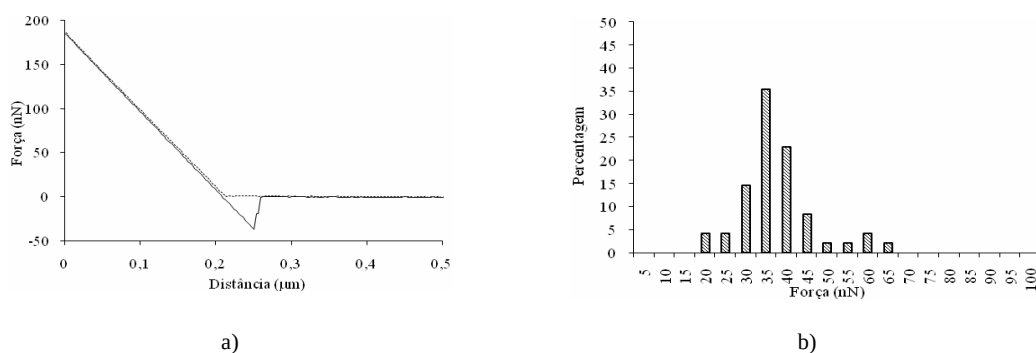


Figura 33 – Força de adesão, a seco, entre superfície de TiN polida e *tip* de Si₃N₄: a) exemplo da curva força *versus* distância, b) histograma das forças obtidas.

Em célula de líquidos analisaram-se os sistemas amostra virgem *versus tip* virgem, amostra virgem *versus tip* funcionalizada com BSA e amostra com camada adsorvida de BSA *versus tip* funcionalizada com BSA.

As forças de adesão, em água, entre o substrato virgem e a *tip* virgem são inferiores a 1 nN (Figura 34). No entanto não foi possível obter valores precisos uma vez que, na maior parte dos ensaios, não se conseguiram obter patamares bem definidos para a força nula, nas curvas força *versus* distância.

Nos ensaios com *tip* funcionalizada conseguiram-se algumas curvas das quais foi possível determinar as médias das forças de adesão, (Tabela 18). Indicam-se o número de curvas utilizadas para os cálculos.

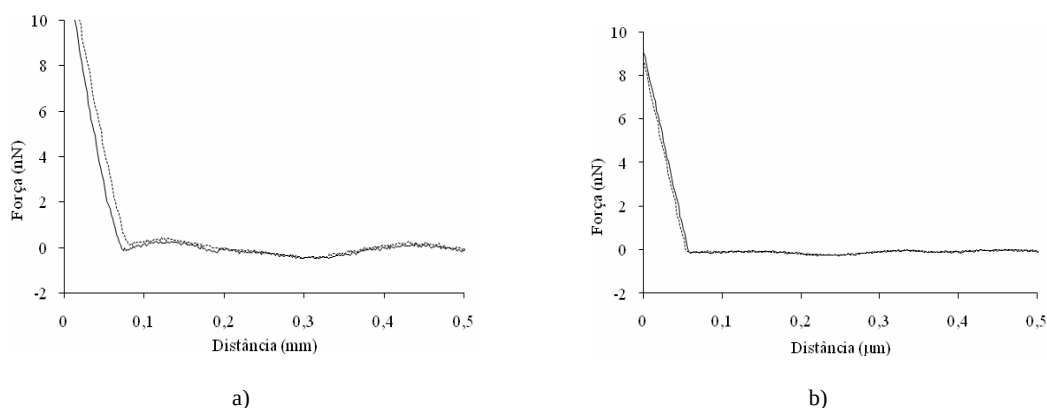


Figura 34 – Exemplos de curvas de força vs. distância, em água, tip de Si_3N_4 e: a) TiN, b) TiNbN.

Nas Figura 35 e Figura 36 apresentam-se curvas típicas força vs. distância e a distribuição das forças obtidas com substratos TiN e TiNbN respectivamente

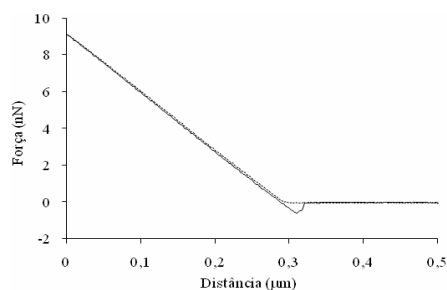
A existência de BSA na superfície do substrato diminui ligeiramente a força de adesão contra a *tip* funcionalizada (ver Tabela 18) em relação aos ensaios em que apenas existe BSA numa das superfícies. Tal efeito já tinha sido descrito por Agnihotri *et. al.*, [138], que o justifica pela diminuição das forças de van der Waals.

Algumas curvas de afastamento, principalmente no TiN, apresentam saltos múltiplos o que é característico do emaranhamento entre proteínas das duas superfícies (ver Figura 35b)). Nos ensaios com TiNbN este comportamento não foi observado (Figura 36).

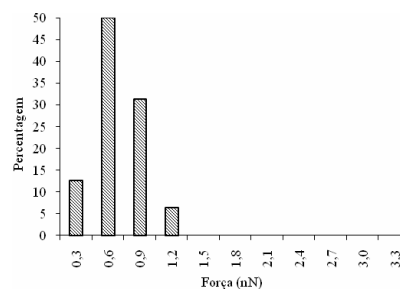
Tabela 18 – Forças de adesão em líquido.

Interação	TiN (nN)		TiNbN (nN)	
	Força de adesão (nN)	nº de curvas	Força de adesão (nN)	nº de curvas
Superfície – <i>tip</i> Si_3N_4	n.d.	-	n.d.	-
Superfície – <i>tip</i> funcionalizada com BSA	0.67 ± 0.21	32	0.34 ± 0.05	62
Superfície com BSA – <i>tip</i> funcionalizada com BSA	0.56 ± 0.07	32	0.23 ± 0.03	62

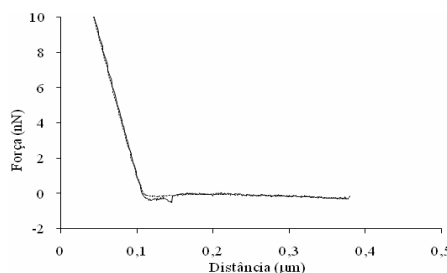
Os resultados experimentais das forças de adesão em TiN foram comparados com os obtidos pelo tratamento de Hamaker das forças de van der Waals, (Tabela 19). O modelo prevê com sucesso a diminuição da força de adesão quando existe BSA na superfície da *tip*, quer se admita que este é composto por TiN ou por TiO_2 . No entanto, verifica-se que os valores das forças experimentais são muito superiores aos previstos para as forças de van der Waals o que pode ser explicado pela existência de outras forças participantes na adesão. Além disso os valores experimentais estão afectados pela incerteza no valor da constante de elasticidade do *cantilever*, enquanto que os previstos pelo tratamento de Hamaker estão afectados pela incerteza do valor do raio de curvatura da *tip* e no valor assumido para o parâmetro D da equação 44.



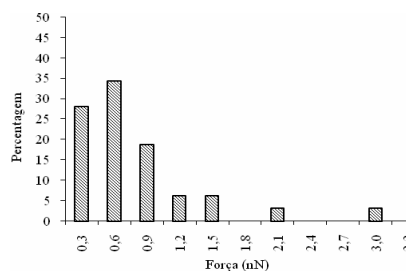
a)



c)

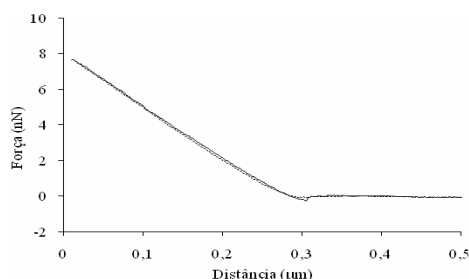


b)

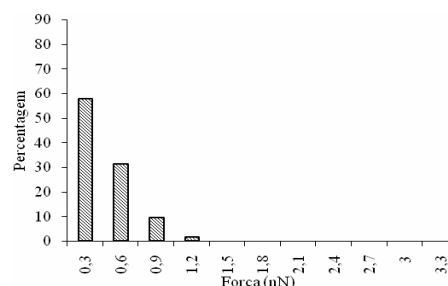


d)

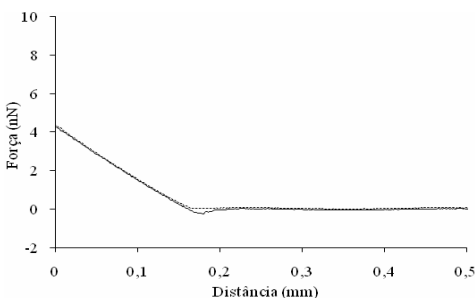
Figura 35 – Forças de adesão, em água, com o substrato TiN. a) exemplo de curva força vs. distância entre TiN e Si_3N_4 funcionalizado com BSA, b) exemplo de curva f vs. d entre TiN (com camada de BSA) e Si_3N_4 funcionalizado com BSA, c) histograma das forças entre TiN e Si_3N_4 funcionalizado com BSA, d) histograma das forças entre TiN (com camada de BSA) e Si_3N_4 funcionalizado com BSA.



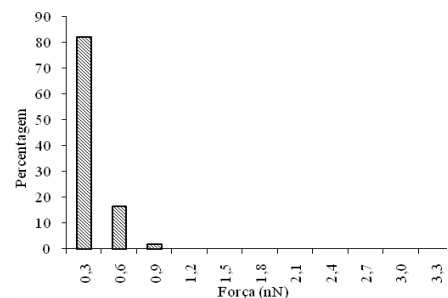
a)



c)



b)



d)

Figura 36 – Forças de adesão, em água, com o substrato TiNbN. a) exemplo de curva força vs. distância entre TiNbN e Si_3N_4 funcionalizado com BSA, b) exemplo de curva f vs. d entre TiNbN (com camada de BSA) e Si_3N_4 funcionalizado com BSA, c) histograma das forças entre TiNbN e Si_3N_4 funcionalizado com BSA, d) histograma das forças entre TiNbN (com camada de BSA) e Si_3N_4 funcionalizado com BSA.

Tabela 19 – Constante de Hamaker e força de van der Waals.

	Van der Waals	
	Constante de Hamaker	Força de van der Waals (nN)
TiN-Água-Si ₃ N ₄	$6.2 \cdot 10^{-20}$	0.11
TiN-Água-SiO ₂	$1.5 \cdot 10^{-20}$	0.03
TiO ₂ -Água-Si ₃ N ₄	$1.9 \cdot 10^{-19}$	0.35
TiO ₂ -Água-SiO ₂	$3.8 \cdot 10^{-20}$	0.07
TiN-Água-BSA	$2.5 \cdot 10^{-20}$	0.05
TiO ₂ -Água-BSA	$7.0 \cdot 10^{-20}$	0.13
BSA-Água-BSA	$1.7 \cdot 10^{-20}$	0.03
TiN-Ar-Si	$2.8 \cdot 10^{-19}$	0.52

Na Tabela 20 encontram-se referidas os valores de k_c fornecidos pelo fabricante e os determinados pelo modelo geométrico e pelo modelo de Albrecht corrigido. Verifica-se que existem diferenças assinaláveis e como não sabemos como foi determinado o valor fornecido pelo fabricante esta é uma incerteza que se mantém. As *tips* ao serem usadas podem sofrer deformações que conduzam à alteração do seu raio de curvatura. Se este for alterado também o será a área de contacto entre a tip e a superfície pelo que o resultado da força de adesão é afectado. Além disso o fabricante não fornece valores precisos uma vez que refere que o raio de curvatura é de 10 nm mas que pode atingir os 40 nm, [174].

Os valores estimados pelos modelos teóricos são afectados por todos os seus parâmetros. Os que apresentam maior incerteza são o raio de curvatura e a distância entre as superfícies. O raio de curvatura foi estimado em 30 nm através do software SPIP da Image Metrology. A distância entre as superfícies foi admitido como sendo o espaçamento interatómico que tem o valor característico de 0.165 nm. No entanto é referido na literatura que este valor não adequado quando se utiliza um meio líquido no qual existam ligações de hidrogénio, como é o caso da água que foi o meio utilizado. Quanto às constantes de Hamaker elas são função do índice de refração e da constante dieléctrica que por sua vez dependem do comprimento de onda da radiação.

Tabela 20 – Constantes de elasticidade dos *cantilevers*.

	k_c (MPP-111) (N/m)	k_c (MPP-311) (N/m)	k_c (MLCT-E) (N/m)
Fornecido pelo fabricante	40.0	0.90	0.10
Modelo geométrico	48.7	1.04	0.21
Modelo de Albrecht corrigido	n.d.	n.d.	0.16

5. Conclusão

O presente trabalho teve como objectivo o estudo da adsorção de BSA e NaHA a cerâmicos de titânio utilizados como revestimentos em implantes médicos

A adsorção de BSA foi estudada quantitativamente com uma microbalança de cristal de quartzo com dissipação (QCM-D) obtendo-se as isotérmicas, a 25 °C, para cada um dos cerâmicos. Os valores experimentais foram ajustados aos modelos de Langmuir e Freundlich. Apesar de os coeficientes de correlação no ajuste à isotérmica de Langmuir serem maiores verifica-se que a isotérmica de Freundlich descreve melhor o comportamento das curvas experimentais

A adsorção, embora com comportamento semelhante nos três revestimentos, pode ordenar-se, segundo os resultados obtidos pela equação de Sauerbrey modificada, pela seguinte ordem: TiN > TiNbN > TiCN.

Os resultados obtidos por QCM-D foram comparados com as observações obtidas por microscopia de força atómica (AFM). Com esta técnica foi possível confirmar a existência de uma monocamada de BSA adsorvida na superfície dos três revestimentos.

O estudo da adsorção do NaHA permitiu concluir que, para a mesma concentração em solução, se adsorve em menor quantidade que a BSA e que a interação entre ambos, quando existe uma monocamada de BSA previamente adsorvida, é fraca, a pH próximo da neutralidade. Além disso, nos ensaios em que coexistem as duas substâncias em solução não se verifica alteração significativa na concentração superficial, pelo que, se pode admitir que a adsorção de BSA bloqueia a de NaHA uma vez que a molécula de proteína, sendo mais pequena, deve ter um coeficiente de difusão maior e adsorve-se mais rapidamente que o NaHA.

Em todos os estudos, realizados por QCM-D, obtiveram-se resultados que, quer seja pela variação da dissipação ou pela proximidade entre os valores obtidos pelo modelo de Sauerbrey simples ou modificado, permitem considerar que o filme adsorvido é essencialmente rígido.

6. Referências bibliográficas e de internet

Todas as referências a artigos foram adaptadas ao modelo da revista Langmuir:

Autor(es), *Revista* **Ano**, *Volume*, Páginas

Todas as referências a livros e teses foram adaptadas ao seguinte modelo:

Autor(es), Título, Edição, Editora, **Ano**

Todas as referências a sítios de internet foram adaptadas ao seguinte modelo:

Endereço url (data de consulta)

- [1] Katti, K.S., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2004**, 39, 133-142
- [2] Serro, A.P.; Gispert, M.P.; Martins, M.C.L.; Brogueira, P.; Colaço, R.; Saramago, B., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2006**, 78 (3), 581-589
- [3] Gispert, M.P.; Serro, A.P.; Colaço, R.; Saramago, B., *Wear* **2006**, 260, 149–158
- [4] Gispert, M.P.; Serro, A.P.; Colaço, R.; Pires, E.; Saramago, B., *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2007**, 84 (1), 98-107
- [5] Gispert, M.P.; Serro, A.P.; Colaço, R.; Pires, E.; Saramago, B., *Surface and Interface Analysis, Bovine serum albumin adsorption onto 316L stainless steel and alumina: a comparative study using depletion, protein radiolabeling, quartz crystal microbalance and atomic force microscopy*, (aceite)
- [6] Serro, A.P.; Completo, C.; Colaço, R.; Santos, F.; Silva, C.L.; Cabral, J.M.S.; Araújo, H.; Pires, E.; Alves, E.; Saramago, B., *A comparative study of titanium nitrides, TiN, TiNbN and TiCN, as coatings for biomedical applications*, (a submeter)
- [7] Gispert, M.P.; Serro, A.P.; Colaço, R.; Rego, A.M.B.; Alves, E.; Silva, R.C.; Brogueira, P.; Pires, E.; Saramago, B., *Wear* **2007**, 262, 1337–1345
- [8] Gispert, M.P.; Serro, A.P.; Colaço, R.; Pires, E.; Saramago, B., *Wear* **2007**, 263, 1060–1065
- [9] Williams, D.F.; *Biomaterials* **2008**, 29, 2941-2953
- [10] Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J.; Lemons, J.E., *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, **1996**
- [11] Smith, W.F., *Princípios de Ciência e Engenharia dos Materiais*, Mgraw-Hill, **1998**
- [12] Park, J.B.; Bronzino, J.D., *Biomaterials – Principles and Applications*; CRC Press, **2002**
- [13] Piconi C.; Maccauro, G., *Biomaterials* **1999**, 20, 1 -25
- [14] Best, S.M.; Porter, A.E.; Thian, E.S.; Huang, J., *J. of the European Ceramic Society* **2008**, 28, 1319–1327
- [15] Hench, L.L.; Wilson, J., *An Introduction to Bioceramics*, World Scientific, **1993**
- [16] Sadi, A.Y.; Shokrgozar, M.A.; Homaeigohar, S.S.; Khavandi, A., *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **2008**, 19, 2359–2365
- [17] Kangwantrakool, S.; Takenaka, A.; Suwanprateeb, J.; Shinohara, K., *J. Ceramic Soc. Japan* **2005**, 113(12), 768-773
- [18] Liu, Y.; Wang, M., *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, 106, 2780-2790
- [19] Ignjatovic, N.; Uskokovic, D., *Applied Surface Science* **2004**, 238, 314–319
- [20] Rezwan, K.; Chen, Q.Z.; Blaker, J.J.; Boccaccini, A.R., *Biomaterials* **2006**, 27, 3412-3431
- [21] Ruan, J.M.; Zou, J.P.; Zhou, Z.C., *Powder Metallurgy* **2006**, 49(1), 62-65

- [22] Stanishevsky, A.; Chowdhury, S.; Chinoda, P.; Thomas, V., *J. of Biom. Mat. Res. A* **2008**, 86(4), 873-882
- [23] Nath, S.; Bodhak, S.; Basu, B., *J. Biom. Mat. Res. Part A* **2007**, 83, 191-208
- [24] <http://www.rsc.org/education/teachers/learnnet/inspirational/resources/3.1.2.pdf> (27/09/2008)
- [25] Bayne, S.C., *Journal of Dental Education* **2005**, 69(5), 571-585
- [26] http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_electron_microscope (07/09/2008)
- [27] Bhushan, B., *Handbook of Micro/Nano Tribology*, 2nd ed., CRC Press, **1999**
- [28] <http://en.wikipedia.org/wiki/Hardness> (07/09/2008)
- [29] Tabor, D., *The Hardness of Metals*, Clarendon Press, 1951
- [30] Lesage, J.; Pertuz, A.; Puchi-Cabrera, E.S.; Chicot, D., *The Solid Films* **2006**, 497, 232-238
- [31] http://en.wikipedia.org/wiki/Calo_tester (07/09/2008)
- [32] Alberty, R.A.; Silbey, J.R., *Physical Chemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, **1996**
- [33] Gispert, M.P., *Friction and Wear Mechanisms in Hip Prosthesis: Comparision of Joint Materials*, Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico, **2007**
- [34] Thomas, T.R., *Rough Surfaces*, Longman, 1982
- [35] Kappl, M.; Butt, H.-J., *Part. Part. Syst. Charact.* **2002**, 19, 129-143
- [36] Cappella, B.; Baschieri, P.; Frediani, C.; Miccoli, P.; Ascoli, C., *IEEE Engineering in Medicine and Biology* **1997**, March/April
- [37] Clifford, C.A.; Seah, M.P., *Nanotechnology* **2005**, 16, 1666–1680
- [38] Butt, H.-J.; Cappella, B.; Kappl, M., *Surface Science Reports* **2005**, 59, 1-152
- [39] Müller, M.; Schimmel, T.; Häußler, P.; Fettig, H.; Müller, O.; Albers, A., *Surf. Interface Anal.* **2006**, 38, 1090–1095
- [40] Liu, X.; Chu, P.K.; Ding, C., *Materials Science and Engineering* **2004**, R47, 49-121
- [41] Chaki, N.K.; Salam, M.; Sharma, J.; Vijayamohanan, K., *Proc. Indian Acad. Sci. (Chem. Sci.)* **2001**, 113(5-6), 659–670
- [42] Norde, W.; Lyklema, J., *J. Biomater. Sci. Polym.* **1991**, 2(3), 183-202.
- [43] Rechendorff, K., *The influence of surface roughness on protein adsorption*, PhD Thesis, University of Aarhus, **2006**
- [44] Figueiredo, J.L.; Ribeiro, F.R., *Catálise Heterogéna*, Fundação Calouste Gulbenkian, **1989**
- [45] Jackson, D.R.; Omanovic, S.; Roscoe, S.G.; *Langmuir* **2000**, 16, 5449-5457
- [46] Hinz, C., *Geoderma* **2001**, 99, 225–243
- [47] Limousin, G.; Gaudet, J.-P.; Charlet, L.; Szenknect, S.; Barthès, V.; Krimissa, M., *Applied Geochemistry* **2007**, 22, 249–275
- [48] Janshoff, A.; Galla, H.; Steinem, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 4004-4032
- [49] Huetz, P.; Schaaf, P.; Voegel, J.C. ; Mann, E.K.; Miras, B.; Ball, V.; Freund, M.; Cazenave, J.P., *Proteins Interfaces II* **1995**, 602, 334–349
- [50] Marx, K.A. *Biomacromolecules* **2003**, Vol. 4, No. 5, 1109-1120
- [51] Stadler, H.; Mondon, M.; Ziegler, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 375, 53–61
- [52] Buck, R.P.; Lindner, E.; Kutner, W.; Inzel, G. *Pure Appl. Chem.* **2004**, Vol. 76, No. 6, 1139–1160
- [53] Rodahl, M.; Höök, F.; Fredriksson, C.; Keller, C.A.; Krozer, A.; Brezezinski, P.; Voinova, M.; Kasemo, B. *Faraday Discuss.* **1997**, 107, 229-246
- [54] Rickert, J.; Brecht, A.; Göpel, W. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 1441-1448

- [55] Rodahl, M.; Höök, F.; Fredriksson, C.; Krozer, A.; Brezezinski, P.; Kasemo, B. *Rev. Sci. Instrum.* **1995**, 66 (7), 3924-3930
- [56] Cooper, M.A.; Singleton, V.T. *J. Mol. Recognit.* **2007**, 20, 154–184
- [57] Kaufman, E.D.; Belyea, J.; Johnson, M.C.; Nicholson, Z.M.; Ricks, J.L.; Shah, P.K.; Bayless, M.; Pettersson, T.; Feldotö, Z.; Blomberg, E.; Claesson, P.; Franzen, S., *Langmuir* **2007**, 23, 6053-6062
- [58] Rodahl, M.; Höök, F.; Kasemo, B.; *Anal. Chem* **1996**, 68, 2219-2227
- [59] Höök, F.; Kasemo, B.; Nylander, T.; Fant, C.; Sott, K.; Elwing, H. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5796-5804
- [60] Kankare, J. *Langmuir* **2002**, 18, 7092-7094
- [61] Bandey, H.L.; Hillman, A.R.; Brown, M.J.; Martin, S.J., *Faraday Discussions* **1997**, 107, 105-122
- [62] Voinova, M.V.; Rodahl, M.; Jonson, M.; Kasemo, B., *Phys. Scr.* **1999**, 59, 391-396.
- [63] Joahnsmann, D., *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, 200, 501–516
- [64] Larsson, C.; Rodahl, M.; Höök, F., *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5080-5087
- [65] Reimhult, E.; Larsson, C.; Kasemo, B.; Höök, F. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 7211-7220
- [66] Arwin, H. *Thin Solid Films* **2000**, 377-378, 48-56
- [67] Höök, F.; Vörös, J.; Rodahl, M.; Kurrat, R.; Böni, P.; Ransden, J.J.; Textor, M.; Spencer, N.D.; Tengvall, P.; Gold, J.; Kasemo, B.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2002**, 24, 155–170
- [68] Rechendorff, K.; Hovgaard, M.B.; Foss, M.; Zhdanov, V.P.; Besenbacher, F. *Langmuir* **2006**, 22, 10885-10888
- [69] Ying, P.; Yu, Y.; Jin, G.; Tao, Z. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, 32, 1-10
- [70] Asinovski, L.; Beaglehole, D.; Clarkson, M.T. *phys. stat. sol. (a)* **2008**, 205, No. 4, 764–771
- [71] Homola, J.; Yee, S.S.; Gauglitz, G. *Sensors and Actuators B* **1999**, 54, 3-15
- [72] Jung, L.; Campbell, C.T.; Chinowsky, T.M.; Mar, M.N.; Yee, S.S. *Langmuir* **1998**, 14, 5636-5648
- [73] Salamon, Z.; Macleod, H.A.; Tollin, G. *Biochimica et Biophysica Acta* **1997**, 1331, 117–129
- [74] Vörös, J.; Ramsden, J.J.; Csúcs, G.; Szendro, I.; De Paul, S.M.; Textor, M.; Spencer, N.D. *Biomaterials* **2002**, 23, 3699-3710
- [75] Brusatori, M.A.; Van Tassel, P.R.; *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, 18, 1269-1277
- [76] Su, X.; Wu, Y.-J.; Knoll, W., *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, 21, 719–726
- [77] Xu, L.-C.; Logan, B.E., *Langmuir* **2006**, 22, 4720-4727
- [78] Xu, L.-C.; Siedlecki, C.A., *Biomaterials* **2007**, 28, 3273–3283
- [79] Stegemann, B.; Backhaus, H.; Kloss, H.; Santner, E., *Modern Research and Educational Topics in Microscopy* **2007**, 3, 820-827
- [80] Bowen, W.R.; Lovitt, R.W.; Wright, C.J., *Journal of Materials Science* **2001**, 36, 623– 629
- [81] Xu, H.; Xu, G.; An, Y., *J. Zheijang Univ Science B* **2006**, 7(4), 304-309
- [82] Bowen, W.R.; Hilal, N.; Lovitt, R.W.; Wright, C.J., *Journal of Membrane Science* **1999**, 154, 205-212
- [83] Tanaka, T.; Nakamura, N.; Matsunaga, T., *Electrochimica Acta* **1999**, 44, 3827-3822
- [84] Israelachvili, J., *Intermolecular Surface Forces*, Academic Press, 1992
- [85] Eichenlaub, S.; Chan, C.; Beaudoin, S.P., *Journal of Colloid and Interface Science* **2002**, 248, 389–397
- [86] Feldman, K.; Tervoort, T.; Smith, P.; Spencer, N.D., *Langmuir* **1998**, 14, 372-378
- [87] Bezerra, A.A.; Coelho, R.T., *Materials Science and Engineering A* **2006**, 423, 46–51
- [88] Malyer, E.; Oztarhan, A., *Surface & Coatings Technology* **2005**, 196, 369– 372
- [89] Mitsuo, A.; Uchida, S.; Yamamoto, S.; Aizawa, T., *Surface & Coatings Technology* **2004**, 188–189, 630–635
- [90] Reiter, A.E.; Brunner, B.; Ante, M.; Rechberger, J., *Surface & Coatings Technology* **2006**, 200, 5532 – 5541

- [91] Agarwal, A.K.; Garg, A.; Srivastava, D.K.; Shukla, M.K., *Surface & Coatings Technology* **2007**, 201, 6182–6188
- [92] Shaffer, S.J.; Rogers, M.J., *Wear* **2007**, 263, 1281–1290
- [93] Hibbins, A.P.; Sambles, J.R.; Lawrence, C.R., *Journal of Modern Optics* **1998**, 45(10), 2051–2062
- [94] Cecil, T.W.; Weikle, R.M.; Kerr, A.R.; Lichtenberger, A.W., *IEEE Transactions on Applied Superconductivity* **2007**, 17(2), 3525–3528
- [95] Guemmaz, M.; Mosser, A.; Grob, J.J., *Appl. Phys. A* **1997**, 64, 407–415
- [96] Bull, S.J.; Bhat, D.G.; Staiac, M.H., *Surface and Coatings Technology* **2003**, 163–164, 507–514
- [97] Stoiber, M.; Badisch, E.; Lugmair, C.; Mitterer, C., *Surface and Coatings Technology* **2003**, 163–164, 451–456
- [98] Liu, C.; Bi, Q.; Matthews, A., *Surface and Coatings Technology* **2003**, 163–164, 597–604
- [99] Huang H.-H.; Hsu, C.-H.; Pan, S.-J.; He, J.-L.; Chen, C.-C.; Lee, T.-L., *Applied Surface Science*, **2005**, 244, 253–256
- [100] Jones, M.I.; McColl, I.R.; Grant, D.M.; Parker, K.G.; Parker, T.L., *J. Biomedical Materials Research* **2000**, 52(2), 413–421
- [101] Jeyachandran, Y.L.; Venkatachalam, S.; Karunagaran, B.; Narayandass, S.K.; Mangalaraj, D.; Bao, C.Y.; Zhang, C.L., *Materials Science and Engineering C* **2007**, 27, 35–41
- [102] Dong, Y.-X.; Chen, Y.-S.; Chen, Q.; Liu, B.; Song, Z.-X., *Surface & Coatings Technology* **2007**, 201, 8789–8795
- [103] Harman, M.K.; Banks, S.A.; Hodge, W.A., *The Journal of Arthroplasty* **1997**, 12(8), 938–945
- [104] Clem, W.C.; Kononov, V.V.; Chowdhury, S.; Vohra, Y.K.; Catledge, S.A.; Bellis, S.L., *Journal of biomedical materials research. Part A* **2006**, 76(2), 279–287
- [105] Raimondi, M.T.; Pietrabissa, R., *Biomaterials* **2000**, 21, 907–913
- [106] Pisanec, S.; Ciacchi, L.C.; Vesselli, E.; Comelli, G.; Sbaizero, O.; Meriani, S.; Vita, A., *Acta Materialia* **2004**, 52, 1237–1245
- [107] Beake, B.D.; Ranganathan, N., *Materials Science and Engineering A* **2006**, 423, 46–51
- [108] Zhitomirsky, V.N., *Surface & Coatings Technology* **2007**, 201, 6122–6130
- [109] Chen, L.; Wang, S.Q.; Du, Y.; Li, J., *Materials Science and Engineering A* **2008**, 478, 336–339
- [110] Hoseini, M.; Jedenmalm, A.; Boldizar, A., *Wear* **2008**, 264, 958–966
- [111] Fang, T.-H.; Jian, S.R.; Chu, D.-S., *Applied Surface Science* **2004**, 228, 365–372
- [112] Bull, S.J.; Bhat, D.G.; Staiac, M.H., *Surface and Coatings Technology* **2003**, 163–164, 499–506
- [113] Hainsworth, S.V.; Soh, W.C., *Surface and Coatings Technology* **2003**, 163–164, 515–520
- [114] Yeung, K.W.K.; Poon, R.W.Y.; Chu, P.K.; Chung, C.Y.; Liu, X.Y.; Lu, W.W.; Chan, D.; Chan, S.C.W.; Luk, K.D.K.; Cheung, K.M.C., *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2007**, 82A(2), 403–414
- [115] Evans, T.W., *Aliment Pharmacol Ther* **2002**, 16 (Suppl. 5), 6–11
- [116] Quinlan, G.J.; Martin, G.S.; Evans, T.W., *Hepatology* **2005**, 41(6), 1211–1219
- [117] Kragh-Hansen, U.; Chuang, V.T.G.; Otagiri, M., *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25(6), 695–704
- [118] Roach, P.; Farrar, D.; Perry, C.C., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 8168–8173
- [119] Oncley, J.L., *Biophysical Chemistry* **2003**, 100, 151–158
- [120] Efimova, Y.M.; Haemers, S.; Wierczinski, B.; Norder, W.; van Well, A.A., *Biopolymers* **2006**, 85(3), 264–273
- [121] http://en.wikipedia.org/wiki/Human_serum_albumin (07/09/2008)
- [122] Anzai, J.; Guo, B.; Osa, T.; *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **1996**, 40, 35–40

- [123] Rezwan, K.; Meier, L.P.; Rezwan, M.; Vörös, J.; Textor, M.; Gauckler, L.J., *Langmuir* **2004**, *20*, 10055-10061
- [124] Stobiecka, M.; Hepel, M.; Radecki, J., *Electrochimica Acta* **2005**, *50*, 4873-4887
- [125] Ravichandran, S.; Talbot, J., *Biophysical Journal* **2000**, *78*, 110-120
- [126] Zhang, Y.; Fung, Y.; Sun, H.; Zhu, D.; Yao, S., *Sensors and Actuators B* **2005**, *108*, 933-942
- [127] Norde, W.; Giacomelli, C.E., *Journal of Biotechnology* **2000**, *79*, 259-268
- [128] Welle, A.; Chiumiento, A.; Barbucci, R., *Biomolecular Engineering* **2007**, *24*, 87-91
- [129] Vörös, J., *Biophysical Journal* **2004**, *87*, 553-561
- [130] Mao, Y.; Wei, W.; Peng, H.; Zhang, J., *Journal of Biotechnology* **2001**, *89*, 1-10
- [131] Nonogaki, T.; Xu, S.; Kugimiya, S.; Sato, S.; Miyata, I.; Yonese, M., *Langmuir* **2000**, *16*, 4272-4278
- [132] Nakata, S.; Kido, N.; Hayashi, M.; Hara, M.; Sasabe, H.; Sugawara, T.; Matsuda, T., *Biophysical Chemistry* **1996**, *62*, 63-71
- [133] Lori, J.A.; Hanawa, T., *Spectroscopy* **2004**, *18*, 545-552
- [134] Xie, Q.; Xiang, C.; Yuan, Y.; Zhang, Y.; Nie, L.; Yao, S., *Journal of Colloid and Interface Science* **2003**, *262*, 107-115
- [135] Lousinian, S.; Logothetidis, S., *Microelectronic Engineering* **2007**, *84*, 479-485
- [136] Brusatori, M.A.; Tie, Y.; Van Tassel, P.R., *Langmuir* **2003**, *19*, 5089-5097
- [137] Serro, A.P.; Bastos, M.; Pessoa, J.C.; Saramago, B., *Journal of Biomedical Materials Research* **2004**, *70*, 420-427
- [138] Agnihotri, A.; Siedlecki, C.A., *Ultramicroscopy* **2005**, *102*, 257-268
- [139] Browne, M.M.; Lubarsky, G.V.; Davidson, M.R.; Bradley, R.H., *Surface Science* **2004**, *553*, 155-167
- [140] Tang, Q.; Xu, C.-H.; Shi, S.-Q.; Zhou, L.M., *Synthetic Metals* **2004**, *147*, 247-252
- [141] Wang, M.S.; Palmer, L.B.; Schwartz, J.D.; Razatos, A., *Langmuir* **2004**, *20*, 7753-7759
- [142] Sethuraman, A.; Han, M.; Kane, R.S.; Belfort, G., *Langmuir* **2004**, *20*, 7779-7788
- [143] Kidoaki, S.; Matsuda, T., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2002**, *23*, 153-163
- [144] Bowen, W.R.; Hilal, N.; Lovitt, R.W.; Wright, C.J., *Journal of Colloid and Interface Science* **1998**, *197*, 348-352
- [145] van de Keere, I.; Willaert, R.; Tourwé, E.; Hubin, A.; Vereecken, J., *Surf. Interface Anal.* **2008**, *40*, 157-161
- [146] Cai, K.; Bossert, J.; Jandt, K.D., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2006**, *49*, 136-144
- [147] Sousa, S.R.; Moradas-Ferreira, P.; Saramago, B.; Melo, L.V.; Barbosa, M.A., *Langmuir* **2004**, *20*, 9745-9754
- [148] Mori, O.; Imae, T., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1997**, *9*, 31-36
- [149] Xu, S.; Sato, S.; Miyata, I.; Yamanaka, J.; Yonese, M., *Molecular Simulation* **2003**, *29*(10-11), 711-716
- [150] McDonald, J.; Haskall, V.C., *The Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*(7), 4575-4579
- [151] Lapčík, L. Jr; Lapčík, L.; De Smedt, S.; Demeester; Chabreček, P., *Chemical Reviews*, **1998**, *98*(8), 2663-2684
- [152] Haskall, V.C.; Laurent, T.C., *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*; <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html> (07/09/2008)
- [153] Laurent, T.C.; Fraser, J.R., *The FASEB Journal* **1992**, *6*, 2397-2404
- [154] Rwei, S.-P.; Chen, S.-W.; Mao, C.-F.; Fang, H.-W., *Biochemical Engineering Journal* **2008**, *40*, 211-217
- [155] Tadmor, R.; Chen, N.; Israelachvili, J., *Macromolecules* **2003**, *36*, 9519-9526
- [156] Grymonpré, K.R.; Staggemeier, B.A.; Dubin, P.L.; Mattison, K.W., *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 422-429
- [157] Flannery, M.; Jones, E.; Birkinshaw, C., *Wear* **2008**, *265*, 1009-1016

- [158] Taglienti, A; Cellesi, F.; Crescenzi, V.; Sequi, P.; Valentini, M.; Tirelli, N., *Macromol. Biosci.* **2006**, 6, 611–622
- [159] Croll, T.I.; O'Connor, A.J.; Stevens, G.W.; Cooper-White, J.J., *Biomacromolecules* **2006**, 7, 1610-1622
- [160] Xu, S.; Yamanaka, J.; Sato, S.; Miyata, I.; Yonese, M., *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, 48(6), 779-783
- [161] Xu, S.; Yamanaka, J.; Sato, S.; Miyata, I.; Yonese, M., *Colloid Polym Sci.* **2004**, 282, 440–445
- [162] Xu, S.; Song, Y.; Sato, S.; Miyata, I.; Yamanaka, J.; Yonese, M., *Colloid Polym. Sci.* **2005**, 283, 383–392
- [163] Hu, S.-G.; Jou, C.-H.; Yang, M.C., *Biomaterials* **2003**, 24, 2685–2693
- [164] Spagnoli, C.; Kornikov, A.; Ulman, A.; Balazs, E.A.; Lyubchenko, Y.L.; Cowman, M.K., *Carbohydrate Research* **2005**, 340, 929–941
- [165] Morra, M.; Cassinella, C.; Carpi, A.; Giardinoc, R.; Finic, M., *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2006**, 60, 365–369
- [166] Johansson, J.Å.; Halthur, T.; Herranen, M.; Söderberg, L.; Elofsson, U.; Hilborn, J., *Biomacromolecules* **2005**, 6, 1353-1359
- [167] Chiumiento, A.; Lamponi, S.; Barbucci, R., *Biomacromolecules* **2007**, 8, 523-531
- [168] Bertóti, I.; Mohai, M.; Sullivan, J.L.; Saied, S.O., *Applied Surface Science* **1995**, 84, 357-371
- [169] Kirchner, C.N.; Hallmeier, K.H.; Szargan, R.; Raschke, T.; Radehaus, C.; Wittstock, G., *Electroanalysis* **2007**, 19(10), 1023–1031
- [170] Jouve, G.; Séverac, C.; Cantacuzène, S., *Thin Solid Films* **1996**, 287, 146-153
- [171] Jeyachandran, Y.L.; Narayandass, S.K.; Mangalaraj, D.; Areva, S.; Mielczarski, J.A., *Materials Science and Engineering A* **2007**, 445–446, 223–236
- [172] <http://gecea.ist.utl.pt/Auger/indexP.html> (07/09/2008)
- [173] Serro, A.P.; Colaço, R.; Saramago, B., *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, 325, 573-579
- [174] Catálogo Veeco, **2005**
- [175] Welle, A.; Chiumiento, A.; Barbucci, R., *Biomolecular Engineering* **2007**, 24, 87–91
- [176] Leng, J.M.; Chen, J.; Fanton, J.; Senko, M.; Ritz, K.; Opsal, J., *Thin Solid Films* **1998**, 313-314, 308-313
- [177] <http://www.siliconfareast.com/sio2si3n4.htm> (07/09/2008)
- [178] Polymeric Materials Encyclopedia, <http://books.google.pt> (07/09/2008)
- [179] <http://ece-www.colorado.edu/~bart/book/ellipstb.htm> (07/09/2008)
- [180] http://www.clippercontrols.com/info/dielectric_constants.html (07/09/2008)
- [181] <http://www.luxpop.com> (07/09/2008)
- [182] [http://en.wikipedia.org/wiki/Water_\(data_page\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Water_(data_page)) (07/09/2008)
- [183] <http://www.lsbu.ac.uk/water/data.html> (07/09/2008)
- [184] Montgomery, D.C.; Runger, G.C., *Applied Statistics and Probability for Engineers*, Wiley, **1994**

7. Anexos

7.1. Ensaios na QCM

Tabela 21 – Ensaios de adsorção de BSA em TiN na QCM.

Con. (mg/m L)	Data	Cri.	Massa (g)	Vol. (mL)	R _{ar} (Ohm)	μ _f (kg.m ⁻¹ .s ⁻²)	η _f (kg.m ⁻¹ .s ⁻¹)	J'' (m.s ⁻² .kg ⁻¹)	λ	Δm _S (ng.cm ⁻²)	Δm _{SM} (ng.cm ⁻²)	Espess. (nm)	Espess. (nm) (rinsing)
0.05	27-03-2007	2.10	-	-	-	2.10E+05	3.49E-03	1.94E-06	1.050	197.6	194.7	2.43	2.08
0.05	28-03-2007	2.11	-	-	-	7.10E+05	4.83E-03	2.85E-07	1.007	219.7	218.8	2.42	2.68
0.05	22-11-2007	K7.04	0.0012	25	24	4.29E+06	1.16E-03	1.95E-09	1.000	267.6	251.5	2.17	2.34
0.05	27-11-2007	K7.07	-	-	55	3.28E+05	7.72E-03	1.46E-06	1.037	307.9	344.4	3.28	3.16
0.05	01-03-2008	K9.08	0.0400	diluiç.	110	1.79E+06	1.08E-03	1.04E-08	1.000	284.9	271.7	2.54	2.74
0.05	03-03-2008	K7.19	0.0407	diluiç.	26	7.37E+05	2.48E-03	1.40E-07	1.003	236.4	226.0	2.52	2.16
0.05	04-03-2008	K9.09	0.0407	diluiç.	-	9.98E+05	4.44E-04	1.39E-08	1.000	268.3	272.6	2.43	2.42
0.6	18-10-2007	K4.15	0.0060	10.0	430	3.55E+05	6.18E-03	1.18E-06	1.030	375.0	386.3	3.41	2.96
0.6	20-11-2007	K8.05	0.0071	11.8	64	8.93E+05	2.99E-03	1.16E-07	1.003	442.2	443.2	4.30	4.23
0.6	21-11-2007	K7.03	0.0065	10.8	54	9.38E+05	8.56E-03	2.80E-07	1.007	430.8	433.8	3.80	3.71
4	19-10-2007	K4.17	0.0397	10.0	580	4.18E+05	5.27E-03	8.15E-07	1.021	565.6	578.8	5.90	5.69
4	16-11-2007	K8.02	0.0404	10.0	16	8.30E+05	3.43E-03	1.52E-07	1.004	421.0	425.8	4.49	3.81
4	16-11-2007	K7.01	0.0404	10.0	16	8.20E+05	4.45E-03	2.00E-07	1.005	604.4	607.6	5.84	5.74
4	16-11-2007	K8.03	0.0401	10.0	43	6.50E+05	1.71E-03	1.25E-07	1.003	447.9	448.8	4.67	4.25
4	19-11-2007	K7.02	0.0401	10.0	68	6.19E+05	4.73E-03	3.63E-07	1.009	513.4	519.5	5.20	5.15
4	20-11-2007	K9.01	0.0419	10.5	40	4.53E+05	4.46E-03	6.19E-07	1.016	585.5	638.4	6.32	5.98
10	16-10-2007	K4.10	0.1001	10.0	570	1.49E+05	2.25E-03	2.57E-06	1.068	440.3	548.3	7.25	5.84
10	29-11-2007	K7.09	0.0999	10.0	87	3.99E+05	2.13E-03	4.05E-07	1.010	552.2	558.7	6.32	5.95
10	30-11-2007	K7.10	0.0998	10.0	14	5.38E+05	1.95E-03	2.07E-07	1.005	569.2	571.9	6.12	5.80
10	30-11-2007	K8.13	0.0998	10.0	-	2.54E+05	2.85E-03	1.23E-06	1.031	624.9	651.6	7.31	6.67
10	04-12-2007	K7.11	0.0997	10.0	17	4.19E+05	1.93E-03	3.35E-07	1.008	670.3	675.0	8.50	7.45
10	05-12-2007	K7.12	0.0999	10.0	16	4.61E+05	2.62E-03	3.73E-07	1.009	719.6	724.1	7.65	7.29
15	21-03-2007	1.18	-	-	-	2.16E+05	2.23E-04	1.48E-07	1.004	546.7	548.7	6.39	6.35
15	21-03-2007	2.05	-	-	-	7.12E+04	1.70E-03	6.72E-06	1.199	497.5	560.4	8.48	6.60
15	16-10-2007	K4.11	0.1500	10.0	360	3.09E+05	4.30E-03	1.18E-06	1.030	737.1	775.0	7.69	7.88
15	17-10-2007	K4.12	0.1496	10.0	320	9.59E+04	2.63E-03	5.15E-06	1.146	704.2	795.3	10.16	8.29
15	22-10-2007	K4.19	0.1501	10.0	325	2.66E+05	2.68E-03	1.07E-06	1.027	771.4	836.5	6.70	6.61
15	23-10-2007	K4.20	0.1498	10.0	790	3.73E+05	2.20E-03	4.75E-07	1.012	617.2	627.5	8.07	6.35
15	10-12-2007	K7.14	0.1505	10.0	30	2.54E+05	1.97E-03	9.00E-07	1.023	576.1	579.1	7.39	5.74

Tabela 22 – Ensaios de adsorção de BSA em TiNbN na QCM.

Con. (mg/m L)	Data	Cri.	Massa (g)	Vol. (mL)	R _{ar} (Ohm)	μ _f (kg.m ⁻¹ .s ⁻²)	η _f (kg.m ⁻¹ .s ⁻¹)	J'' (m.s ⁻² .kg ⁻¹)	λ	Δm _S (ng.cm ⁻²)	Δm _{SM} (ng.cm ⁻²)	Thickn (nm)	Thickn (nm) (rinsing)
0.05	20-12-2007	K5.09	0.0401	diluiç.	19	5.24E+05	3.37E-03	3.67E-07	1.009	205.7	218.4	2.70	2.59
0.05	21-12-2007	K5.10	0.0401	diluiç.	20	9.37E+05	9.13E-04	3.23E-08	1.001	214.3	214.6	2.05	2.11
0.6	08-11-2007	U2.03	0.0062	10.0	780	1.26E+06	4.83E-03	9.39E-08	1.002	409.3	410.0	3.93	3.80
0.6	12-11-2007	U2.06	0.0059	10.0	850	9.71E+05	6.87E-04	2.26E-08	1.001	312.1	312.4	3.15	2.90
0.6	03-12-2007	K5.01	0.0151	25.0	30	1.20E+06	1.65E-03	3.55E-08	1.001	507.1	508.0	4.54	4.65
0.6	04-12-2007	K5.02	0.0151	25.0	19	8.37E+05	1.68E-03	7.43E-08	1.002	321.5	321.9	2.98	2.93
0.6	05-12-2007	K5.03	0.0397	10.0	18	5.84E+05	2.68E-03	2.39E-07	1.006	522.7	528.8	5.26	5.52
4	02-11-2007	U1.03	0.0404	10.0	1030	1.34E+05	2.19E-03	3.01E-06	1.080	419.5	477.2	5.97	5.54
4	05-11-2007	U1.06	0.0403	10.0	1090	1.12E+06	2.52E-03	6.20E-08	1.002	473.4	473.9	4.64	4.26
4	06-11-2007	U1.08	0.0403	10.0	1200	4.25E+05	2.74E-03	4.53E-07	1.011	451.0	451.7	5.56	4.19
4	09-11-2007	U2.05	0.0402	10.0	710	7.42E+05	2.13E-03	1.19E-07	1.003	483.9	486.5	4.90	4.53
4	12-11-2007	U2.07	0.0404	10.0	-	8.00E+05	3.86E-03	1.84E-07	1.005	628.4	629.5	6.29	5.84
4	13-11-2007	U2.10	0.0401	10.0	730	5.49E+05	2.08E-03	2.12E-07	1.005	461.5	462.7	5.21	4.57
4	18-01-2008	K5.12	0.1003	25.0	27	4.38E+05	1.94E-03	3.09E-07	1.008	495.5	498.5	5.81	5.06
4	19-01-2008	K8.04	0.1003	25.0	54	4.96E+05	4.43E-04	5.60E-08	1.001	598.4	599.3	5.98	5.60
10	11-12-2007	K5.04	0.0996	10.0	33	1.00E+06	1.58E-03	4.91E-08	1.001	427.5	432.3	6.74	5.03
10	12-12-2007	K5.05	0.2506	25.0	24	3.05E+05	1.75E-03	5.67E-07	1.014	738.4	748.6	9.24	9.17
10	14-12-2007	K5.07	0.1005	10.0	21	2.38E+05	2.03E-03	1.04E-06	1.026	557.4	576.3	7.56	6.88
10	14-12-2007	K8.02	0.1005	10.0	25	3.73E+05	1.61E-03	3.53E-07	1.009	698.5	721.1	9.14	10.51
10	17-12-2007	K5.08	0.1004	10.0	25	3.41E+05	1.35E-03	3.55E-07	1.009	471.3	478.9	6.87	6.41
10	06-03-2008	K8.05	0.2504	10.0	19	2.33E+05	1.21E-03	6.79E-07	1.017	610.0	620.6	8.63	8.40
10	01-07-2008	K5.21	0.1001	10.0	15	2.51E+05	2.02E-03	9.38E-07	1.024	624.0	641.1	7.81	7.76
10	01-07-2008	K8.09	0.1001	10.0	20	3.60E+05	1.19E-03	2.83E-07	1.007	533.5	536.7	7.41	6.88
15	30-10-2007	U1.01	0.1504	10.0	920	6.62E+05	1.70E-03	1.20E-07	1.003	664.8	667.1	7.00	6.54
15	30-10-2007	U1.02	0.1497	10.0	980	2.21E+05	1.85E-03	1.10E-06	1.028	724.1	732.9	10.51	8.13
15	05-11-2007	U1.05	0.1498	10.0	1070	2.73E+05	1.47E-03	5.97E-07	1.015	443.3	446.9	6.45	5.26
15	09-11-2007	U2.04	0.1498	10.0	700	1.87E+05	1.61E-03	1.34E-06	1.034	642.7	667.0	9.93	9.35
15	22-02-2008	K5.15	0.1502	10.0	17	1.62E+05	1.59E-03	1.72E-06	1.044	603.5	654.5	9.86	9.69
15	02-07-2008	K5.22	0.1501	10.0	15	3.18E+05	1.41E-03	4.25E-07	1.011	606.9	612.1	7.55	7.07
15	02-07-2008	K8.22	0.1501	10.0	22	2.37E+05	1.19E-03	6.41E-07	1.016	583.5	595.7	9.36	9.03

Tabela 23 – Ensaios de adsorção de BSA em TiCN na QCM.

Con. (mg/m L)	Data	Cri.	Massa (g)	Vol. (mL)	R _{ar} (Ohm)	μ_t (kg.m ⁻¹ .s ⁻²)	η_t (kg.m ⁻¹ .s ⁻¹)	J'' (m.s ² .kg ⁻¹)	λ	$\overline{\Delta m_S}$ (ng.cm ⁻²)	$\overline{\Delta m_{SM}}$ (ng.cm ⁻²)	Thickn · (nm)	Thickn · (nm) (rinsing)
0.05	28-05-2008	K2.01	0.0051	diluiç.	19	4.38E+05	2.69E-03	4.20E-07	1.010	178.7	225.0	1.68	1.65
0.05	29-05-2008	K1.11	0.0051	diluiç.	20	2.06E+05	2.70E-03	1.70E-06	1.044	237.3	251.8	2.71	2.90
0.05	02-06-2008	K1.12	0.0050	diluiç.	21	4.91E+05	3.07E-03	3.81E-07	1.010	228.1	228.9	2.86	2.68
0.05	26-06-2008	K2.11	0.0200	diluiç.	23	6.01E+05	3.59E-04	3.09E-08	1.001	163.6	163.8	1.54	1.53
0.6	27-05-2008	K1.09	0.0401	diluiç.	20	1.13E+06	3.40E-04	8.30E-09	1.000	271.1	271.2	2.40	2.26
0.6	03-06-2008	K2.03	0.0059	10.0	20	5.71E+05	2.13E-03	2.01E-07	1.005	424.9	426.8	4.85	3.55
0.6	04-06-2008	K3.11	0.0300	50.0	19	3.52E+05	3.45E-04	8.62E-08	1.002	498.3	499.5	4.41	4.28
0.6	04-06-2008	K1.15	0.0300	50.0	20	7.03E+05	1.93E-04	1.21E-08	1.000	383.3	383.8	3.83	3.67
0.6	27-06-2008	K3.21	0.0302	50.0	24	6.25E+05	2.42E-03	1.90E-07	1.005	479.5	482.4	6.08	6.01
0.6	28-06-2008	K2.12	0.0302	50.0	20	4.31E+05	2.80E-03	4.50E-07	1.011	307.5	309.5	3.72	3.26
0.6	28-06-2008	K3.22	0.0302	50.0	22	5.03E+05	1.01E-03	1.24E-07	1.003	475.8	477.2	5.13	4.94
4	24-05-2008	K1.07	0.1001	diluiç.	23	7.84E+04	2.72E-03	6.36E-06	1.186	346.4	418.1	4.80	4.03
4	07-06-2008	K2.06	0.2000	50.0	19	5.96E+05	9.64E-04	8.41E-08	1.002	456.8	457.6	4.20	3.71
4	07-06-2008	K3.14	0.2000	50.0	18	4.28E+05	1.25E-03	2.11E-07	1.005	540.0	540.2	5.78	5.37
4	24-06-2008	K3.17	0.2002	50.0	20	2.03E+05	1.40E-03	1.01E-06	1.026	433.7	436.2	7.85	5.42
10	21-05-2008	K3.04	0.2503	25.0	20	3.09E+05	1.30E-03	4.15E-07	1.010	563.9	566.0	6.67	5.29
10	23-05-2008	K1.06	0.1001	10.0	20	4.71E+05	8.98E-04	1.26E-07	1.003	501.8	503.2	5.13	5.00
10	25-06-2008	K2.10	0.4998	50.0	21	1.90E+05	1.48E-03	1.20E-06	1.031	521.5	533.5	6.64	5.86
10	25-06-2008	K3.19	0.4998	50.0	26	4.64E+05	1.56E-03	2.23E-07	1.006	580.1	625.7	6.41	6.19
15	30-05-2008	K2.02	-	-	19	4.78E+05	6.85E-03	7.78E-07	1.020	766.9	800.2	7.28	7.74
15	05-06-2008	K3.12	0.3750	25.0	19	3.56E+05	7.03E-04	1.72E-07	1.004	568.1	570.4	6.42	6.12
15	05-06-2008	K2.04	0.3750	25.0	21	3.48E+05	1.08E-03	2.75E-07	1.007	573.8	574.7	7.65	6.99
15	06-06-2008	K3.13	0.3750	25.0	18	1.72E+05	9.58E-05	1.00E-07	1.002	590.0	590.9	6.63	5.89
15	06-06-2008	K2.05	0.3750	25.0	19	4.18E+05	1.30E-03	2.29E-07	1.006	632.9	636.2	7.85	7.65

Tabela 24 – Ensaios de adsorção de NaHA em TiNbN na QCM.

Con. (mg/m L)	Data	Cri.	Massa (g)	Vol. (mL)	R _{ar} (Ohm)	μ_t (kg.m ⁻¹ .s ⁻²)	η_t (kg.m ⁻¹ .s ⁻¹)	J'' (m.s ² .kg ⁻¹)	λ	$\overline{\Delta m_S}$ (ng.cm ⁻²)	$\overline{\Delta m_{SM}}$ (ng.cm ⁻²)	Thickn · (nm)	Thickn · (nm) (rinsing)
1	03-07-2008	K5.23	0.0100	10.0	14	2.47E+05	7.93E-04	4.00E-07	1.010	109.3	111.2	0.79	0.80
1	03-07-2008	K8.11	0.0100	10.0	26	3.10E+05	8.48E-04	2.72E-07	1.007	103.8	104.3	1.27	1.25
1	04-07-2008	K5.24	0.0101	10.0	15	1.08E+05	4.69E-04	1.24E-06	1.031	163.1	169.6	2.36	2.23
1	04-07-2008	K8.12	0.0101	10.0	20	3.23E+05	1.06E-03	3.13E-07	1.008	190.9	202.0	3.08	3.70

Tabela 25 – Ensaios de adsorção de simultânea de BSA e NaHA em TiN na QCM.

Con. (mg/m L)	Data	Cri.	Massa (g)	Vol. (mL)	R _{ar} (Ohm)	μ_t (kg.m ⁻¹ .s ⁻²)	η_t (kg.m ⁻¹ .s ⁻¹)	J'' (m.s ² .kg ⁻¹)	λ	$\overline{\Delta m_S}$ (ng.cm ⁻²)	$\overline{\Delta m_{SM}}$ (ng.cm ⁻²)	Thickn · (nm)	Thickn · (nm) (rinsing)
10+1	07-12-2007	K7.13	0.1+0.01	10.0	35	7.28E+04	1.20E-03	5.58E-06	1.160	-	-	14.12	-
10+1	07-12-2007	K9.04	0.1+0.01	10.0	16	9.98E+04	1.75E-03	4.22E-06	1.116	647.7	727.9	10.33	9.57
10+1	11-12-2007	K7.15	0.1+0.01	10.0	24	6.07E+05	1.65E-03	1.39E-07	1.003	679.2	686.1	6.74	7.67
10+1	27-02-2008	K7.16	0.1+0.01	10.0	-	1.60E+05	1.46E-03	1.64E-06	1.042	-	-	7.10	-
10+1	28-02-2008	K7.17	0.1+0.01	10.0	-	2.72E+05	1.54E-03	6.29E-07	1.016	664.7	691.2	8.03	8.93

7.2. Parâmetros utilizados no software da QCM

Tabela 26 – Parâmetros necessários no software da QCM.

Parâmetro	Valor
f_0 (MHz)	4.95 [†] 5.02 [‡]
ρ_q (g cm ⁻³)	2.648 [52]
μ_q (kg m ⁻¹ s ⁻¹)	2.947·10 ¹⁰ [52]
ρ_l (g cm ⁻³)	1.0043 [3]
η_l (mPa s)	0.91 [3]
ρ_f (g cm ⁻³)	1.15 [175]
μ_f (MPa)	0.2 [175]
η_f (mPa s)	0.0015 [175]
t_f (μm)	0.004
C (fF)	13.6

[†] para cristais KSV

[‡] para cristais USA

7.3. Índices de refração e constantes dielétricas

Tabela 27 – Constantes dielétricas e índices de refração de vários materiais.

Material	n	ε
TiN	1.7 [176]	-3 [93]
Si ₃ N ₄	2.05 [177]	7.5 [177]
BSA	1.57 [72]	2.17 [178]
TiO ₂	2.88 [179]	110 [180]
SiO ₂	1.46 [179]	4.5 [180]
Ar	1.00027 [181]	1.00054 [182]
Água	1.33 [181]	78.4 [183]

7.4. Cálculo de intervalos de confiança

O intervalo de confiança, vulgarmente designado por “erro”, associado ao cálculo de qualquer média foi estimado pelo método de estimativa de intervalos de confiança de média de distribuição normal e variância desconhecida definido por, [184]:

$$\text{erro} = \frac{t_{\beta/2, p-1} \cdot s}{\sqrt{p}} \quad (\text{Equação 46})$$

em que p é o número de elementos da amostra, s é o desvio padrão da amostra, β é o valor obtido pela subtração da confiança (normalizada) à unidade, e $t_{\beta/2, p-1}$ é o ponto de percentagem acumulada $1-\beta/2$ da distribuição t .