



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS

sid.inpe.br/mtc-m21d/2024/03.20.19.58-TDI

DIAMOND-LIKE-CARBON COMO SUPERFÍCIE BIOFUNCIONAL EM DISPOSITIVO DE ASSISTÊNCIA CARDIOVASCULAR

Rosa Corrêa Leoncio de Sá

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores, orientada pelos Drs. Vladimir Jesus Trava-Airoldi, João Roberto Moro, e Eduardo Guy Perpétuo Bock, aprovada em 08 de fevereiro de 2024.

URL do documento original:

<<http://urlib.net/8JMKD3MGP3W34T/4AUG7P8>>

INPE
São José dos Campos
2024

PUBLICADO POR:

Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais - INPE
Coordenação de Ensino, Pesquisa e Extensão (COEPE)
Divisão de Biblioteca (DIBIB)
CEP 12.227-010
São José dos Campos - SP - Brasil
Tel.:(012) 3208-6923/7348
E-mail: pubtc@inpe.br

CONSELHO DE EDITORAÇÃO E PRESERVAÇÃO DA PRODUÇÃO INTELLECTUAL DO INPE - CEPPII (PORTARIA Nº 176/2018/SEI-INPE):

Presidente:

Dra. Marley Cavalcante de Lima Moscati - Coordenação-Geral de Ciências da Terra (CGCT)

Membros:

Dra. Ieda Del Arco Sanches - Conselho de Pós-Graduação (CPG)
Dr. Evandro Marconi Rocco - Coordenação-Geral de Engenharia, Tecnologia e Ciência Espaciais (CGCE)
Dr. Rafael Duarte Coelho dos Santos - Coordenação-Geral de Infraestrutura e Pesquisas Aplicadas (CGIP)
Simone Angélica Del Ducca Barbedo - Divisão de Biblioteca (DIBIB)

BIBLIOTECA DIGITAL:

Dr. Gerald Jean Francis Banon
Clayton Martins Pereira - Divisão de Biblioteca (DIBIB)

REVISÃO E NORMALIZAÇÃO DOCUMENTÁRIA:

Simone Angélica Del Ducca Barbedo - Divisão de Biblioteca (DIBIB)
André Luis Dias Fernandes - Divisão de Biblioteca (DIBIB)

EDITORAÇÃO ELETRÔNICA:

Ivone Martins - Divisão de Biblioteca (DIBIB)
André Luis Dias Fernandes - Divisão de Biblioteca (DIBIB)



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS

sid.inpe.br/mtc-m21d/2024/03.20.19.58-TDI

**DIAMOND-LIKE-CARBON COMO SUPERFÍCIE
BIOFUNCIONAL EM DISPOSITIVO DE ASSISTÊNCIA
CARDIOVASCULAR**

Rosa Corrêa Leoncio de Sá

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores, orientada pelos Drs. Vladimir Jesus Trava-Airoldi, João Roberto Moro, e Eduardo Guy Perpétuo Bock, aprovada em 08 de fevereiro de 2024.

URL do documento original:

<<http://urlib.net/8JMKD3MGP3W34T/4AUG7P8>>

INPE
São José dos Campos
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sá, Rosa Corrêa Leoncio de.

Sa11d Diamond-like-carbon como superfície biofuncional em dispositivo de assistência cardiovascular / Rosa Corrêa Leoncio de Sá. – São José dos Campos : INPE, 2024.

xix + 95 p. ; (sid.inpe.br/mtc-m21d/2024/03.20.19.58-TDI)

Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores) – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2024.

Orientadores : Drs. Vladimir Jesus Trava-Airoldi, João Roberto Moro, e Eduardo Guy Perpétuo Bock.

1. Dispositivos de assistência ventricular.
2. Hemocompatibilidade.
3. Biofuncionalização de superfície.
4. Diamond-Like-Carbon.
5. Molhabilidade. I.Título.

CDU 620.1:612.1



Esta obra foi licenciada sob uma Licença [Creative Commons Atribuição-NãoComercial 3.0 Não Adaptada](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/).

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/).



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS

**DEFESA FINAL DE TESE ROSA CORRÊA LEONCIO DE SÁ
REG. 143219/2018, BANCA Nº 008/2024**

No dia 08 de fevereiro de 2024, às 10h00, na sala reuniões do prédio CTE 2 do INPE, o(a) aluno(a) mencionado(a) acima defendeu seu trabalho final (apresentação oral seguida de arguição) perante uma Banca Examinadora, cujos membros estão listados abaixo. O(A) aluno(a) foi **APROVADO(A)** pela Banca Examinadora, por unanimidade, em cumprimento ao requisito exigido para obtenção do Título de Doutor(a) em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores, com a exigência de que o trabalho final a ser publicado deverá incorporar as correções sugeridas pela Banca Examinadora, com revisão pelo(s) orientador(es).

Título: "DIAMOND-LIKE-CARBON COMO SUPERFÍCIE BIOFUNCIONAL EM DISPOSITIVO DE ASSISTÊNCIA CARDIOVASCULAR"

Membros da banca:

Dr. Vladimir Jesus Trava-Airoldi – Orientador e Presidente / INPE

Dr. Eduardo Guy Perpétuo Bock – orientador/ IFSP Campus São Paulo

Dr. João Roberto Moro – orientador / IFSP Campus Bragança Paulista

Dr. Evaldo José Corat – Membro Interno / INPE

Dr. José Roberto Cardoso – Membro Externo / POLI/USP

Dr. Evandro Drigo da Silva Membro Externo / Synthetic Heart Technology (SHT)/ IPEN



Documento assinado eletronicamente por **Vladimir Jesus Trava-Airoldi, Pesquisador Titular**, em 20/02/2024, às 11:18 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Joao Roberto Moro (E), Usuário Externo**, em 20/02/2024, às 12:04 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evandro Drigo da Silva (E), Usuário Externo**, em 20/02/2024, às 13:55 (horário oficial de Brasília), com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

AGRADECIMENTOS

Ao ilustre professor e orientador Dr. Vladimir Jesus Trava-Airoldi do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais pela sua extraordinária orientação e confiança depositada a mim para a realização desta pesquisa.

Aos professores e co-orientadores Dr. Eduardo Guy Perpétuo Bock e Dr. João Roberto Moro do Instituto Federal de São Paulo pela amizade, confiança e oportunidade de aprendizagem e evolução.

Ao professor e diretor do Centro de Engenharia em Assistência Circulatoria do Instituto “Dante Pazzanese” de Cardiologia, Dr. Aron José Pazin de Andrade, pela sua excepcional orientação e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor e coordenador do curso de Engenharia e Tecnologia Espacial / Ciência dos Materiais e Sensores do INPE, Dr. Sergio Mineiro, pelo apoio e incentivo destinados a mim; sem o qual não teria conseguido concretizar este trabalho.

Ao professor Dr. Wilhelm Pfleging do *Karlsruhe Institute of Technology* da Alemanha pela parceria e por dispor de seu laboratório para o desenvolvimento dos resultados preliminares apresentados deste trabalho.

Ao professor Dr. Wagner de Rossi do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares por dispor de seu laboratório *Femtolaser* e permitir o desenvolvimento de novos desafios para micro e nano estruturas em revestimentos de DLC.

À empresa CVD-Vale por dispor do equipamento Laser nanosegundos e ao seu colaborador Dr. Luís Francisco Bonetti pelo auxílio na preparação da superfície na forma de microtextura com boa uniformidade em fio de titânio muito fino, especialmente porque essa tecnologia de preparação de superfície é ainda não ostensiva.

À Dr^a. Talita Sani Taiariol, pelo suporte no desenvolvimento do revestimento em *Diamond-Like-Carbon* realizado no Laboratório da COPDT do INPE. Sem sua colaboração e apoio este trabalho não teria fluído tão bem; muito obrigada!

Ao Laboratório de Materiais do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (Labmat – ITA) por dispor do equipamento goniômetro utilizado para realizar as análises de molhabilidade com água.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (CEP/IDPC) por receber e aprovar o protocolo de avaliação *in vitro* de molhabilidade com sangue humano.

Ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade Vale do Paraíba (IP&D/UNIVAP) por dispor do equipamento goniômetro utilizado para realizar as análises de molhabilidade com sangue.

Ao professor e chefe de Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Dr. Vagner Roberto Antunes, pela colaboração teórica e prática, fundamental para realização do estudo experimental de avaliação *in vivo* apresentada neste trabalho.

Ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (CEUA/USP) pelo apoio e aprovação do protocolo de avaliação *in vivo* desenvolvida e apresentada neste trabalho.

A ilustre professora e coordenadora do Laboratório de Filmes Finos do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, Dr^a. Maria Cecília Salvadori e à especialista em laboratório, Dr^a. Fernanda de Sá Teixeira, por dispor do equipamento Microscópio Eletrônico de Varredura e de suas expertises atribuídas nas avaliações dos resultados de interação *in vivo*.

Aos professores e membros da banca avaliativa, Dr. José Roberto Cardoso da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo e Dr. Guillermo Solórzano da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, por acreditarem nos objetivos neste trabalho, pelo incentivo e suporte ao meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos amigos Dr. Tarcísio Leão, Dr. Péricles Sant'Anna, Dr. Evandro Drigo, Dr. Laís Vernasqui, Cibelle de Rossi e familiares pelo apoio e incentivo.

Agradeço especialmente a minha mamãe, Marta Corrêa Leoncio de Sá, pela força e segurança transmitida ao longo deste período.

Por fim, ao apoio financeiro da agência de fomento Fundação Adib Jatene (FAJ, São Paulo, Brasil), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, BRASIL) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, BRASIL) pelos processos n°00/08231-1 do IFUSP, n°2013/24434-0 do IDPC, n° 2019/18572-7 do INPE e 2019/19894-8 do ICBUSP.

À minha amada mãe, Marta Corrêa Leoncio de Sá, aos meus filhos e *In Memoriam* ao meu pai eterno, Paulo Leoncio de Sá.

RESUMO

As doenças cardiovasculares ainda são a causa líder de mortalidade em todo mundo. A alta reatividade do sangue com qualquer superfície não endotelial é um desafio no desenvolvimento de Dispositivos de Assistência Ventricular de longa duração, geralmente fabricados em titânio grau II médico, que apesar de ser inerte, de baixa densidade e alta resistência mecânica não evita as respostas trombogênicas. A partir da modificação na superfície de titânio com *Laser-Induced Periodic Surface Structure* seguido por revestimento *Diamond-Like-Carbon* (DLC) em diferentes espessuras foi possível personalizar o perfil de molhabilidade, alterando a energia de superfície do titânio, e minimizar os efeitos indesejáveis de interação com sangue. Após estudos preliminares, quatro diferentes superfícies foram desenvolvidas: (I) Titânio puro como Material de Referência (MR), (II) Titânio Texturizado como Superfície de Teste (ST), (III) Titânio Texturizado com DLC 0,3 μm de espessura como ST A e (IV) Texturizado com DLC 2,4 μm de espessura como ST B. A caracterização física e química destas superfícies foi realizada utilizando *Microscopia Eletrônica de Varredura (Field Emission Gun)*, *Energy Dispersive X-Ray (EDX)*, *Espectroscopia de espalhamento Raman* e goniometria. A Avaliação *In Vitro* da Molhabilidade com Sangue Humano provou a reprodutibilidade e estabilidade dos efeitos observados com água. Para atender a norma ISO 10993, implantes em titânio grau médico foram confeccionados e tiveram suas superfícies biofuncionalizadas; quatro grupos foram considerados, um para cada tipo de superfície e um único implante foi posicionado na aorta abdominal de ratos *Wistar*. Os efeitos de interação hemodinâmica foram avaliados sem adição de anticoagulantes e depois de doze semanas, os implantes foram extraídos e submetidos à análise qualitativa por *MEV* em baixo vácuo, 130 Pa, e *EDX*. As regiões que permaneceram em contato com a parede da aorta abdominal apresentaram encapsulamento por tecido endotelial, formação de *pannus*. O revestimento DLC inibiu a adesão de material biológico no implante ST B, ainda que de perfil super-hidrofílico. O DLC também demonstrou prevenir o desgaste abrasivo e a delaminação, comparado ao observado nos implantes ST e ST A. Camadas pseudoneoíntima foram identificadas de forma heterogênea e em maior concentração nas Superfícies de Teste. Para concluir, a superfície do titânio foi melhorada com as microestruturas, mas e principalmente, pelo revestimento DLC; o qual se mostrou capaz de minimizar as respostas negativas da interação *in vivo*; uma vez que não houve óbitos registrados por trombose, acidente vascular ou embolia pulmonar. Novos estudos experimentais considerando diferentes espessuras do DLC podem esclarecer os avanços na minimização de anticoagulantes na assistência ventricular usando bombas de sangue com superfícies biofuncionais.

Palavras-chave: Dispositivos de assistência ventricular. Hemocompatibilidade. Biofuncionalização de superfície. Diamond-Like-Carbon. Molhabilidade.

DIAMOND-LIKE-CARBO AS BIOFUNCTIONAL SURFACE IN CARDIOVASCULAR ASSISTANCE DEVICE

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are still the leading cause of mortality worldwide. The high reactivity of blood with any non-endothelial surface is a challenge in the development of long-lasting Ventricular Assist Devices, generally manufactured from medical grade II titanium, which despite being inert, low density and high mechanical resistance does not prevent thrombogenic responses. By modifying the titanium surface with Laser-Induced Periodic Surface Structure followed by Diamond-Like-Carbon (DLC) coating in different thicknesses, it was possible to customize the wettability profile, changing the surface energy of the titanium, and minimizing undesirable effects. interaction with blood. After preliminary studies, four different surfaces were developed: (I) Pure Titanium as Reference Material (MR), (II) Textured Titanium as Test Surface (ST), (III) Textured Titanium with 0.3 μm thick DLC as STA and (IV) Textured with 2.4 μm thick DLC as STB. The physical and chemical characterization of these surfaces was carried out using Scanning Electron Microscopy (Field Emission Gun), Energy Dispersive X-Ray (EDX), Raman scattering spectroscopy and goniometry. The In Vitro Assessment of Wettability with Human Blood proved the reproducibility and stability of the effects observed with water. To comply with the ISO 10993 standard, medical grade titanium implants were manufactured and their surfaces were biofunctionalized; four groups were considered, one for each type of surface and a single implant was positioned in the abdominal aorta of Wistar rats. The hemodynamic interaction effects were evaluated without the addition of anticoagulants and after twelve weeks, the implants were extracted and subjected to qualitative analysis by SEM at low vacuum, 130 Pa, and EDX. The regions that remained in contact with the wall of the abdominal aorta showed encapsulation by endothelial tissue, formation of pannus. The DLC coating inhibited the adhesion of biological material to the STB implant, despite its superhydrophilic profile. DLC has also been shown to prevent abrasive wear and delamination compared to that seen with ST and STA implants. Pseudoneointima layers were identified heterogeneously and in greater concentration on the Test Surfaces. To conclude, the titanium surface was improved with microstructures, but mainly by the DLC coating; which proved capable of minimizing negative responses from the interaction in vivo; since there were no deaths recorded due to thrombosis, stroke or pulmonary embolism. New experimental studies considering different DLC thicknesses may clarify advances in minimizing anticoagulants in ventricular assistance using blood pumps with biofunctional surfaces.

Keywords: Ventricular assist devices. Hemocompatibility. Surface biofunctionalization. Diamond-Like-Carbon. wettability.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 3.1 - Imagens do abdome total humano exibindo o posicionamento anatômico de um DAV <i>HeartMate II</i> – Thoratec Corp. Pleasanton, EUA.....	15
Figura 3.2 - Imagem fotográfica dos DAV's da empresa Thoratec Corp. Pleasanton, EUA.....	16
Figura 3.3 - Micrografias de superfícies texturizadas do DAV <i>HeartMate®</i>	19
Figura 3.4 - Imagens micrográficas da superfície de titânico e de sua molhabilidade...	22
Figura 3.5 - Imagens micrografias de superfícies submetidas ao estudo de adesão plaquetária.....	24
Figura 3.6 - Ilustração dos efeitos de molhabilidade.....	26
Figura 4.1 - Imagem fotográfica dos discos planos em titânio grau médico II usinados.....	37
Figura 4.2 - Imagens fotográficas do Sistema Laser Femtosegundos do KIT/Alemanha.....	40
Figura 4.3 - Imagem fotográfica da estação de trabalho <i>Femtolaser</i> do PEN.....	41
Figura 4.4 - Imagem fotográfica da estação de trabalho Laser de nanossegundos da CVD-Vale.....	42
Figura 4.5 - Imagem fotográfica do sistema PECVD-DLC do DIMARE/COPDT/INPE.....	43
Figura 5.1 - Imagens microscópicas obtidas por FEG no INPE da superfície desenvolvida no KIT.....	50
Figura 5.2 - Imagens microscópicas obtidas por FEG no INPE da superfície desenvolvida no IPEN.....	52
Figura 5.3 - Imagens microscópicas obtidas por FEG no INPE das duas superfícies desenvolvida na CVD Vale do Brasil.....	53
Figura 5.4 - Imagens microscópicas comparativas obtidas por FEG no INPE.....	54

Figura 5.5 - Imagem fotográfica das diferentes superfícies destacando o contraste tonal.....	56
Figura 5.6 - Imagens microscópicas obtidas por FEG no INPE da Superfície de Teste.....	57
Figura 5.7 - Espectroscopia de espalhamento Raman de DLC.....	57
Figura 5.8 - Imagem fotográfica do efeito super-plasmafóbico na Superfície de Teste..	62
Figura 5.9 - Representação gráfica da análise comparativa das medidas do ângulo de contato entre água e o sangue humano.....	62
Figura 5.10 - Imagem microscópica obtida por FEG no INPE do Implante Superfície de Teste.....	64
Figura 5.11 - Imagens micrográficas obtidas por MEV no IFUSP dos implantes pós-avaliação <i>in vivo</i>	65
Figura 5.12 - Imagens micrográficas obtidas por MEV no IFUSP dos implantes pós-avaliação <i>in vivo</i>	65
Figura 5.13 - Imagens micrográficas obtidas por MEV durante análise EDX da superfície MR/caso	68
Figura 5.14 - Gráfico EDX da superfície MR.....	69
Figura 5.15 - Imagens microscópicas obtidas por MEV no IFUSP da Superfície de Teste B.....	70

LISTA DE TABELAS

	<u>Pág.</u>
Tabela 3.1 Níveis aceitáveis dos elementos químicos constituintes do titânio comercialmente puro.....	18
Tabela 3.2 Descrição das características de Dispositivos de Assistência Ventricular.....	21
Tabela 5.1 Tecnologias de processamento aplicadas e configuração das superfícies.....	51
Tabela 5.2 Medidas de ângulo de contato em ST com DLC em diferentes espessuras.....	55
Tabela 5.3 Quantificação da composição química obtida por EDX-FEG no INPE das superfícies.....	58
Tabela 5.4 Diferença percentual da composição química nas Superfícies de Teste revestidas com DLC.....	59
Tabela 5.5 Medidas do ângulo de contato obtidos no ITA durante análise de molhabilidade com água.....	59
Tabela 5.6 Medidas do ângulo de contato obtidas na UNIVAP em análise de molhabilidade com sangue.....	60
Tabela 5.7 Análise comparativa das medidas do ângulo de contato obtidas em análise molhabilidade na UNIVAP utilizando água e sangue humano.....	61
Tabela 5.8 Especificações técnicas dos implantes desenvolvidos como superfícies biofuncionais.....	63
Tabela 5.9 Resultados semiquantitativos da composição química obtidos por EDX-MEV no IFUSP.....	66
Tabela 5.10 Resultados de análise comparativa da quantificação química antes e pós-avaliação <i>in vivo</i>	67
Tabela 5.11 Comparação das concentrações atômicas registradas nas diferentes regiões da ST B.....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Al	Alumínio
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AVC	Acidente Vascular Cerebral
C	Carbono
C ₂ H ₂	Acetileno
C ₆ H ₆	Benzeno
CELA	Centro de Lasers e Aplicações
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CH ₄	Metano
cm	Centímetro
CNC	<i>Computer Numeric Control</i>
COPDT	Coordenadoria de Pesquisas e Desenvolvimento Tecnológico
DAV	Dispositivo de Assistência Ventricular
DCV	Doenças Cardiovasculares
DIMARE	Diamante e Materiais Relacionados
DLC	<i>Diamond-Like-Carbon</i>
EDX	<i>Energy Dispersive X-Ray Detector</i>
EUA	Estados Unidos da América
eV	Elétrons Volts
F	Fluência
FEG	Filamento Elétron <i>Gun</i>
fs	Femtosegundos
H	Hidrogênio
IC	Insuficiência Cardíaca
IFUSP	Instituto de Física da Universidade de São Paulo
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
IP&D	Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
ITA	Instituto Tecnologia Aeronáutica
KIT	<i>Karlsruhe Institute of Technology</i>
kV	Quilovolts
L/min/m ²	Litros por minutos em metros quadrados
LABAS	Laboratório Associado de Sensores e Materiais
LIPSS	<i>Laser-Induced Periodic Surface Structures</i>
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura

min.	Minutos
mm	Milímetro
MPC	<i>Metacrilóilo Dietil Fosforilcolina</i>
MR	Material de Referência
N	Número de pulso laser
nm	Nanômetro
O	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
PCD	Diamante policristalino
PECVD	<i>Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition</i>
PEO	<i>Plasma Electrolytic Oxidation</i>
PTFE	Politetrafluoretileno
PU	Poliuretano
q	Calor de adsorção
r	Constante dos gases perfeitos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
s	Segundos
Si	Silício
ST	Superfície de Teste
STL	<i>STereoLithography</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Temperatura
t	Tempo
TCA	Tempo de Coagulação Ativada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Ti	Titânio
UNIVAP	Universidade Vale do Paraíba
USP	Universidade de São Paulo
v	Velocidade
XPS	<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Origem e fisiologia do sistema cardiovascular.....	7
3.2 Tecido endotelial como interface natural do sangue	11
3.3 Dispositivos de assistência ventricular como terapia para Insuficiência Cardíaca ..	13
3.4 Titânio e sua biointeratividade	16
3.5 Biofuncionalização de superfícies em dispositivos de assistência ventricular.....	18
3.6 Engenharia de superfície e tecnologia de processos de modificação	24
3.7 Revestimento <i>Diamond-Like-Carbon</i> como superfície dedicada ao sangue.....	32
4. METODOLOGIA.....	36
4.1 Obtenção de amostras em material de referência titânio grau médico	36
4.2. Seleção das características de superfície e processos de modificação	38
4.3. Processos de modificação da superfície de teste	39
4.4 Caracterizações de superfícies	45
4.5 Análise comparativa da molhabilidade entre água e sangue humano	46
4.6 Avaliação <i>in vivo</i> da interação hemodinâmica	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
6. CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO A - CERTIFICADO DE QUALIDADE DE TITÂNIO COMERCIAL PURO.....	86
ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/IDPC.....	87
ANEXO C - CERTIFICADO CEUA/USP.....	93
ANEXO D - RELATÓRIO DE IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL FIO 0,4 MM TITÂNIO.....	94

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morbidade e mortalidade no Brasil e no mundo há muito tempo; são mais de 17,9 milhões mortes por ano, representando 32% de todas as mortes no mundo (HERT, *et al.*, 2021). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2040, o índice destas doenças, infelizmente, tende a aumentar 250% no Brasil (OMS, 2019).

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma DCV caracterizada pela disfunção do músculo cardíaco, resultante de uma “doença primária”, como a hipertensão arterial crônica, infarto agudo do miocárdio ou doença cardíaca isquêmica (ÁLVARO, *et al.*, 2012). Estes eventos em adultos podem ser potencialmente prevenidos com a redução de fatores de risco comportamentais, como o consumo de tabaco, a obesidade, o uso nocivo de álcool e os baixos níveis de hemoglobina (VAN ITERSON *et al.*, 2018; PAPANASTASIOU; GIANNAKOULAS, 2021).

A patogênese desta disfunção depende dos mecanismos adaptativos do sistema cardiovascular, sendo ela, a via final de todas as cardiopatias (TIMERMAN; PEREIRA, 2000). Infelizmente, na maioria das vezes, o transplante cardíaco é a única forma de tratamento para a IC capaz de restabelecer a capacidade de bombeamento do coração e a estabilidade hemodinâmica do organismo humano (ÁLVARO, *et al.*, 2012).

O Brasil é o segundo país do mundo em número de transplantes realizados por ano, sendo mais de 90% pelo Sistema Único de Saúde (SUS) público (OMS, 2019); ainda assim, mais de 30% dos pacientes indicados morrem na fila de espera por um órgão compatível (LEIRNER, *et al.*, 2000).

A implementação de dispositivos médicos cardíacos tornou-se altamente relevante para aumentar a expectativa de vida destes pacientes (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2022). Nos Estados Unidos da América (EUA), a taxa anual de mortalidade de pacientes na fila de espera por um transplante cardíaco diminuiu na última década. O estudo de Johnson mostrou que tal declínio, de 199/1000 pacientes em 1999 para 170/1000 em 2008, foi devido ao aumento da assistência circulatória

mecânica através do implante de Dispositivo de Assistência Ventricular (DAV) como método terapêutico complementar para a IC (JOHNSON, *et al.*, 2010).

Estes dispositivos auxiliam a função de bombeamento do coração, resultando na reversão das alterações adaptativas e conseqüentemente, estabiliza a condição hemodinâmica do sistema cardiovascular e auxilia a recuperação do paciente (ANDRADE; UTIYAMA, 2020).

A hemólise e a resposta trombogênica são os dois principais desafios no desenvolvimento de um DAV de destino totalmente implantável, e os fatores influenciadores estão diretamente relacionados aos fenômenos de interação que ocorrem durante o desempenho de sua função (BOCK, *et al.*, 2008; SÁ, *et al.*, 2017).

Do ponto de vista hemodinâmico, o alto cisalhamento do fluxo e as áreas de refluxo, estagnação e turbulência geram hemólise; quando os glóbulos vermelhos se decompõem e o nível de hemoglobina livre no plasma sanguíneo excede o limite aceitável. Mais crítica ainda é a alta reatividade do sangue com qualquer superfície não endotelial, o que compromete a hemostasia e esse tipo de intervenção cardiovascular (UEBELHART, *et al.*, 2013; ANDRADE, *et al.*, 2003).

A hemostasia, do grego (*hómois* = semelhante + *stásis* = estabilidade) significa a manutenção das condições apropriadas de funcionamento dos diferentes componentes celulares do organismo. Este depende de interações complexas entre plaquetas, cascata de coagulação, fluxo sanguíneo e cisalhamento, células endoteliais e fibrinólise. A resposta trombogênica é o efeito indesejável da interação com o sangue que ocorre via ativação plaquetária/cascata de coagulação sempre que as plaquetas, constituintes do sangue e responsáveis por garantir a hemostasia do organismo, são ativadas ao entrar em contato com qualquer superfície que difere do tecido endotelial natural.

A formação de trombo como mecanismo de defesa natural é inaceitável em aplicações cardiovasculares, pois podem obstruir o fluxo sanguíneo e causar acidente vascular cerebral e/ou interromper o funcionamento do DAV, levando o paciente ao óbito (ANDRADE, *et al.*, 2003; SÁ, *et al.*, 2017).

O titânio grau médico II, 99% puro, é o biomaterial consagrado na fabricação de implantes dedicados ao sangue devido a sua alta estabilidade química, baixa densidade e alta resistência mecânica. A elevada estabilidade química e resistência mecânica deste

metal estão relacionadas às propriedades do óxido de titânio (TiO₂) que forma-se espontaneamente em toda a superfície de contato com o oxigênio. Esta fina camada cerâmica em titânia apresenta espessura de 2 a 10 nanômetro (nm) na superfície e garante a alta estabilidade química e durabilidade em aplicações severas, mas não impede a resposta trombogênica (GATICA *et al.*, 1993).

O que torna possível a aplicação clínica é a introdução obrigatória da heparina sódica como anticoagulante enquanto o dispositivo atua em paralelo com o coração natural. Esse medicamento inibe a resposta trombogênica, mas quando utilizado por longo período e em altas concentrações desencadeia hemorragias, disfunções renais e neurológicas (ÁLVARO, *et al.*, 2012; EXTER, *et al.*, 2020; MARTINS; SILVA, 2012).

O aumento da expectativa e a melhora da qualidade de vida de indivíduos portadores de dispositivos de assistência circulatória podem ser alcançados por minimização da dependência deste fármaco através de biofuncionalização de superfícies que interagem com o sangue.

A norma *International Organization for Standardization (ISO) 10993: Biological evaluation of medical devices* especifica que constituintes de um dispositivo médico implantável que permanecem em contato com sangue circulante por tempo indeterminado devem-se manter estáveis por no mínimo cinco anos. Neste tipo de aplicação, o meio biológico não deve comprometer a biofuncionalidade do implante por ação corrosiva, por exemplo; assim como, o biomaterial não pode gerar estímulo biológico negativo a qualquer sistema do organismo, tais como reações hematológicas e/ou imunológica (ISO, 2022).

A capacidade de um implante promover alterações no metabolismo celular local e sistêmico do organismo é influenciada pela composição química do biomaterial, sua topografia, a geometria e o posicionamento anatômico do implante e ainda, pelas condições clínicas do paciente e do local implantado. Estes resultados de interação são proporcionais aos efeitos decorrentes no implante, os quais que surgem em função do tempo conforme as propriedades dos biomateriais constituintes e condições de trabalho submetido (ANDRADE, *et al.*, 2003; SÁ, *et al.*, 2017).

Atualmente, a Engenharia com o avanço da tecnologia viabiliza a manipulação das propriedades dos materiais e de sua superfície de forma personalizada às condições de

interesse e trabalho em que será submetido, independentemente de sua origem ou do processo de fabricação (GARCIA, 2007).

Através da modificação da rugosidade de superfície é possível manipular as propriedades de molhabilidade do material; o efeito *Cassie-Baxter* é caracterizado pela permanência de “bolsas” de ar entre platôs sólidos na superfície e pode ser obtido pela técnica de processamento *Laser-Induced Periodic Surface Structures* (LIPSS), a qual atribui estruturas em micro e nanoescala conforme a periodicidade e o comprimento de onda do laser utilizado. Neste caso, as partículas de água exibem condição super-hidrofóbica sobre a superfície, ou seja, a gota permanece suspensa em interface sólido – ar; quanto maior a porção de ar, maior será o ângulo de contato na interface (MARMUR, 2006).

O grupo Diamante e Materiais Relacionados (DIMARE) do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) desenvolve meios de funcionalizar materiais para inúmeras aplicações através de estudos multidisciplinares e aplicados com o desenvolvimento e aperfeiçoamento de mecanismos de crescimento, com toda as caracterizações necessárias para os estudos de crescimento de nanotubos de carbono, de diamante nano estruturados, bem como de crescimento e/ou revestimentos altamente aderentes de carbono amorfo hidrogenado (a-C:H) ou *Diamond-Like-Carbon* (DLC) em diferentes materiais.

As propriedades do revestimento DLC proporcionam alta resistência mecânica, elevada dureza, baixo coeficiente de atrito, inércia química, característica de isolante elétrico e biocompatibilidade à superfície do substrato, dentre outras características (ROBERTSON, 2002).

A persistência do grupo DIMARE do INPE, auxiliado pelos desenvolvimentos da Empresa CVD Vale, tem levado a soluções de problemas desafiadores com a melhoria do revestimento de DLC e redução de custo para garantir a evolução e aplicabilidade deste revestimento na indústria em geral, e que resultou em vários avanços e conquistas ao longo dos anos (CAPOTE, *et al.*, 2022). Tais como: avanços importantes na aplicação do revestimento DLC em instrumentos, equipamentos e dispositivos médicos, como componentes de centro cirúrgico, próteses odontológicas, ortopédicas e

cardiovasculares. Para cada caso, aplica-se filme DLC específico, capaz de melhorar o desempenho biofuncional e maximizar o tempo de vida útil do produto.

As propriedades do revestimento DLC beneficiam inúmeras aplicações em que se deseja minimizar a interação por contato entre um sólido em meio líquido; inclusive em aplicações cardiovasculares, onde se deseja anular os fenômenos de interação na interface implante e sangue circulante, tais como a agregação plaquetária formadora de trombo. A utilização do revestimento DLC ultrapassa desafios a nível industrial e oferece diversas formas de beneficiar o desenvolvimento de superfícies de contato com sangue. Neste trabalho, uma atenção especial é dada aos revestimentos de DLC, com ênfase para o recobrimento de titânio grau II, onde foi possível obter alta aderência de um revestimento de DLC mais duro, mais denso, e com menor coeficiente de atrito que os revestimentos convencionais descritos na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Utilizar a tecnologia de revestimento *Diamond-Like-Carbon* para biofuncionalizar superfície dedicada ao sangue e minimizar os Fenômenos Indesejáveis de Interação – hemólise e agregação plaquetária – de dispositivos de assistência circulatória mecânica.

2.2 Objetivos específicos

- Definir as características Biofuncionais de interface para minimizar os Fenômenos Indesejáveis de Interação de superfícies dedicadas ao sangue durante prática de assistência circulatória mecânica;
- Selecionar uma ou mais tecnologias de modificação de superfícies reprodutíveis e não contaminantes capazes de manipular o perfil de molhabilidade de titânio grau II – Material de Referência – e definir os parâmetros de cada processo;
- Obter número considerável de Material de Referência (MR) em forma de disco plano com diâmetro de 13 mm por 3 mm de espessura por meio de usinagem convencional;
- Desenvolver as Superfícies de Teste, especialmente de DLC, com diferentes perfis de molhabilidade;
- Realizar caracterização de superfície, antes e após cada processo de modificação;
- Selecionar as Superfícies de Testes promissoras para minimizar os Fenômenos Indesejáveis de Interação destas com o sangue;
- Avaliar de forma comparativa o perfil de molhabilidade entre as superfícies utilizando sangue humano;
- Avaliar de forma comparativa os resultados de interação *in vivo* entre as superfícies e sangue da aorta abdominal, com proposta de aplicabilidade real.

3. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão bibliográfica aborda os principais conceitos, multidisciplinares de experimentos e de fundamentos, considerados para alcançar os objetivos deste trabalho; desde os mecanismos hemorreológicos naturais e submetidos à prática de assistência cardiovascular mecânica prolongada; até os processos tecnológicos de preparação e modificação de superfícies aplicáveis para Biofuncionalizar tais superfícies que interagem com o Sangue e, desta forma minimizar os Fenômenos Indesejáveis provenientes desta Interação.

Assim como qualquer sistema fisiológico do organismo, o Sistema Cardiovascular constitui-se de órgãos, estes de tecidos formados de células. A célula, descoberta em 1663 pelo inglês Robert Hooke, é a menor unidade estrutural básica de um organismo vivo com estrutura e função definida, sendo constituída de material genético, citoplasma e membrana plasmática (KARP, 2009).

São as interações físicas e químicas entre a membrana celular e a matriz extracelular (meio que circunda) que determinam o metabolismo, a diferenciação, o crescimento, a motilidade e a vida útil celular (SOUZA *et al.*, 2006). Através da histologia (do grego: *hydton* = tecido + *logos* = estudos), estuda-se os tecidos do organismo e como se organizam para constituir órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A Bioengenharia contando com toda a tecnologia desenvolvida contribui fortemente como um braço da ciência para desenvolver dispositivos e sistemas de suporte à vida, especialmente os órgãos artificiais.

3.1 Origem e fisiologia do sistema cardiovascular

No início do período gestacional, o embrião retira os nutrientes necessários para sua formação da parede do útero materno; a partir da terceira semana de vida fetal, ele passa a se alimentar através do sangue materno e no final do primeiro mês, o feto já possui um coração elementar que bombeia o sangue para o organismo ainda em formação. Nestas primeiras semanas de gestação, o embrião humano é acompanhado por um saco vitelino com função hematopoiética, isto é, formadora dos elementos do sangue; na parede externa do saco vitelino formam-se pequenas massas celulares que se transformam em agrupamentos sanguíneos, as ilhotas de *Wolff* (SOUZA, *et al.*, 2006).

As células mais internas a essas ilhotas transformam-se em glóbulos vermelhos primitivos; estas células-tronco hematopoiéticas são precursoras das hemácias e das demais células do organismo com alta capacidade de regeneração, de diferenciação e de proliferação. No início do segundo mês gestacional, o sangue fetal já possui hemácias, leucócitos e plaquetas; após o terceiro mês de vida fetal, o sangue é processado no fígado e no baço; na metade do período gestacional, após 20 semanas, o feto produz o sangue a partir da própria medula óssea, processo contínuo durante toda vida extra uterina (SOUZA, *et al.*, 2006).

Durante o desenvolvimento do embrião, todos os tecidos e órgãos originam-se de três tecidos embrionários, os chamados de folhetos germinativos: ectoderma, endoderma e mesoderma; responsáveis por uma linhagem celular especializada, quanto à forma e função, que se organizam em grupos constituidores dos tecidos: epitélio (revestimento de superfícies externas do corpo, de alguns órgãos e de cavidades internas), muscular (constituído por células com propriedades contráteis), nervoso (constitui o cérebro, a medula espinhal e os nervos) e conjuntivo (constitui o ósseo, a cartilagem e o sangue).

O tecido conjuntivo é formado por células, matriz extracelular (substância fundamental) e fibras com função de preenchimento, de sustentação e de transporte de substâncias por todo o organismo. A matriz extracelular é formada de macromoléculas aniônicas (colágeno, fibronectina, laminina, trombospondina, hemonectina, proteoglicanos e ácido hialurônico) e apresenta-se como um complexo viscoso e altamente hidrofílico que preenche os espaços entre as células que a produziu e as fibras. Este arcabouço físico (*scaffold*) promove a sustentação estrutural, a hidratação e o volume do tecido já que algumas das proteínas fibrosas são capazes de se ligar a proteínas receptoras da superfície celular (integrinas), estabelecendo força tênsil e organização à matriz extracelular (SOUZA *et al.*, 2006).

O sangue é um fluido complexo (*não-Newtoniano*), portanto é deformável mediante tensões mecânicas e principalmente por não manter constante sua viscosidade durante todo o escoamento; este produto essencial à vida é considerado um tecido conjuntivo por consistir de uma fase sólida composta por 45% de células (hemácias, leucócitos e plaquetas) em suspensão em outra fase líquida, 55% de plasma sanguíneo, sendo este composto de 90% de água e 10% de proteínas, lipídeos, glicose, ácidos e sais,

vitaminas, minerais, hormônios e enzimas (MARTINS; SILVA, 2012; SOUZA, *et al.* 2006).

As hemácias (glóbulos vermelhos ou eritrócitos) consistem de hemoglobina e globulina e representam 44% da porção sólida do sangue total, sendo espacialmente quantificado em aproximadamente 4,5 a 6,1 milhões em mm^3 por litro de sangue. A hemoglobina consiste de duas partes: (1) porção que contém ferro – grupamento Heme e (2) porção proteica – globina. A globina consiste de quatro cadeias polipeptídicas, cada uma é ligada a um grupo Heme; cada grupo Heme contém um átomo de ferro que se liga com uma molécula de oxigênio. Dessa forma, cada molécula de hemoglobina associa-se com quatro moléculas de oxigênio e assim, desempenha sua principal função: o de transportar oxigênio dos pulmões para os tecidos e remover dióxido de carbono e demais resíduos metabólicos via sistemas de excreção (RAPAPORT, 1990).

A morfologia das hemácias é pequena, circular e sem núcleo, como discos bicôncavos com 7,5 micrômetros de diâmetro; estas células permanecem suspensas em plasma circulante durante o período aproximado de 120 dias, até que sejam destruídas e eliminadas pelo sistema excretor (VERRASTRO, 1996).

Os leucócitos (glóbulos brancos) representam 0,5% do sangue total e são quantificados em aproximadamente 4.000 a 10.000 em mm^3 por litro; este elemento está envolvido no sistema imunológico do organismo por removerem substâncias resultantes da degradação celular; alguns são capazes de migrar através da parede dos capilares para defender os tecidos contra doenças e invasão de agentes ou substâncias patogênicos.

As plaquetas (trombócitos) representam 0,5% do sangue total, são fragmentos celulares fundamentais em processos de hemostasia e de coagulação sanguínea; possuem morfologia estrelada com diâmetro de 2 a 5 μm , mas quando ativadas, apresentam-se com diâmetro de até 1020 μm (SOUZA, *et al.*, 2006).

Já o plasma sanguíneo, em maior proporção no sangue total, é um líquido viscoso que desempenha função importante no equilíbrio da pressão osmótica intravascular, associada aos eletrólitos e a drenagem linfática. Em um litro de sangue há aproximadamente 60 a 80 gramas de proteínas (albumina, globulina e fibrinogênio); a albumina é solúvel em água e apresenta-se em maior concentração, seguida da

globulina, insolúvel em água e solúvel em solução salina, e do fibrinogênio, responsável pelo processo de coagulação (VERRASTRO, 1996).

Todos os órgãos contribuem para a homeostasia do organismo, sendo que esta comunicação é realizada pelo sangue através do sistema cardiovascular. Este processo garante, de forma equilibrada e harmônica, o transporte e/ou reciclagem de oxigênio, de substâncias fundamentais (água, nutrientes e sais minerais) e ainda de elementos e estímulos responsivos (hormônios e sinais metabólicos, térmicos ou de pressão) e espectros de luz por todo o organismo (SOUZA, *et al.*, 2006).

O sistema cardiovascular inclui o sistema venoso e o arterial, e exerce o deslocamento do sangue para todo o organismo por meio da ação mecânica de uma bomba cardíaca, o coração, em um circuito fechado constituído por uma rede tubular de artérias, veias e capilares. Anatomicamente, o músculo cardíaco tem tamanho aproximado ao do punho do indivíduo e se divide em duas bombas pulsáteis distintas constituídas de duas câmaras: um átrio e um ventrículo, que por movimentos rítmicos sistólicos (contração) e diastólicos (relaxamento) direcionam o sangue para os pulmões, entre outros órgãos e tecidos. A histologia do coração consiste de tecido muscular, com propriedades contráteis, revestido por células endoteliais (ÁLVARO, 2012).

O sistema venoso constitui-se de vasos sanguíneos que se ramificam, com aumento proporcional de calibre, a partir dos tecidos periféricos até o coração; o diâmetro médio das veias deste sistema é de 30 mm, com espessura média de parede de 1,5 mm. O sangue não oxigenado é direcionado do ventrículo direito para a veia pulmonar, até a interface alvéolo capilar pulmonar, onde ocorre sua oxigenação e a eliminação de dióxido de carbono (CO₂) para o ar atmosférico; em seguida, o sangue oxigenado é direcionado pela veia pulmonar até o ventrículo esquerdo, que o bombeia para a aorta, iniciando a circulação sistêmica (MARTINS; SILVA, 2012).

O sistema arterial, responsável pela circulação sistêmica, constitui-se de artérias que se ramificam, com redução gradual do diâmetro, a partir do coração até alcançar o nível capilar. Assim, o sangue oxigenado é direcionado através da veia aórtica para os órgãos e tecidos periféricos; ao retornar dos tecidos, via venosa, o sangue conduz o CO₂ e os demais resíduos do metabolismo celular para serem eliminados através da respiração, da urina, do suor e das fezes (MARTINS; SILVA, 2012).

A anatomia da parede arterial constitui-se de três camadas (túnicas): a túnica adventícia, a média e a íntima; as quais são formadas do exterior para o interior do vaso e totalizam espessura média de 1 mm. A túnica externa (adventícia) consiste de tecido conjuntivo, que confere a forma dos vasos sanguíneos com a presença de ramificações nervosas sensitivas; a túnica média consiste de tecido muscular liso e fibras elásticas que possibilitam a distensão da parede arterial pela onda de fluxo sanguíneo resultante da contração e do relaxamento ventricular esquerdo; e a túnica íntima ou interna consiste de uma monocamada de células endoteliais achatadas que reveste a área interna de vasos sanguíneos, o lúmen (do latim *lúmen* = luz), uma região oca por onde o sangue flui (SOBOTTA, 2013).

As artérias de maior calibre, como a aorta, apresentam diâmetro superior a 10 mm e têm elasticidade elevada que suportam alta pressão proporcionada pelo fluxo sanguíneo; as artérias de diâmetro médio, 4 mm, distribuem o sangue aos órgãos em pressão reduzida; e as artérias de baixo calibre, as arteríolas, possuem diâmetro de 0,5 a 1,0 mm e são constituídas por apenas uma ou duas camadas de células musculares que conferem a resistência vascular (MARTINS; SILVA, 2012).

Diferente de todos os vasos sanguíneos, os capilares não possuem camada adventícia ou média, portanto não têm inervação; eles consistem de uma monocamada de células endoteliais com diâmetro aproximado de 5 a 10 μm (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Esta característica permite que os capilares realizem trocas de moléculas gasosas e lipofílicas entre o sangue e os tecidos periféricos através de passagem transmembranar por difusão simples e bidirecional (com dependência de gradientes osmóticos); após esta troca líquida transcapilar, os microvasos aumentam de diâmetro e convergem em veias de baixo calibre, as vênulas. Por fim, as vênulas são vasos coletores, as quais se diferem dos capilares por apresentarem diâmetro aproximado de 30 a 50 μm , fibra nervosa na camada adventícia, fibra muscular lisa na camada média e válvulas na camada íntima (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.2 Tecido endotelial como interface natural do sangue

O termo endotélio, de origem grega (*endon* = interior + *thele* = mamilo) descreve o revestimento interno de todo o sistema circulatório (ÉVORA, 1999). Este tecido é

considerado o maior órgão do organismo por constituir a camada celular interna de todo o sistema circulatório, cardíaco e linfático. Em um adulto, este revestimento totaliza cerca de 600 metros quadrados (m²) com espessura variada; nos capilares e nas veias o diâmetro da célula endotelial apresenta-se menor que 0,1 µm e nas artérias cerca de 1 µm. Devido a sua exposição permanente à absorção e distribuição de tensão de escoamento, seu longo eixo orienta-se na direção do fluxo sanguíneo, fato que contribui com a condição hemorreológica não hemolítica (AIRD, 2007; MARTINS; SILVA, 2012).

Este tecido consiste de uma monocamada de células endoteliais achatadas, as quais se apresentam justapostas com pouca substância extracelular entre elas e alta proporção de enzimas e receptores sob a superfície. Estas espécies enzimáticas e sítios de ligação constituem a interface entre o tecido conjuntivo (sangue) e a parede vascular íntima ou interna; esta superfície de contato com o sangue é composta por colágeno tipo IV, proteoglicanas e as glicoproteínas (laminina e entactina) (AIRD, 2007).

O tecido endotelial atua como uma membrana de revestimento, semipermeável que regula o tráfego de moléculas e as funções de síntese e metabolismo de substâncias vasoativas. Esta atividade bioquímica do endotélio é capaz de estimular o processo angiogênico (formação de novos vasos sanguíneos a partir dos existentes) através da liberação de angiotensina I e II, da inativação da bradicinina, serotonina e noradrenalina, da formação de prostaglandinas, da produção de antígenos e do processo de coagulação através da produção de trombomodulina (KALIL; SANT'ANNA, 2004).

Este tecido também produz e controla os estímulos responsivos provenientes da resposta adaptativa do sangue, hormônios e sinais metabólicos, térmicos ou de pressão, determinantes para o equilíbrio das funções fisiológicas, através da liberação de várias espécies hormonais, moduladores de funções bioquímicas. Conforme as condições hemorreológicas, esta resposta adaptativa se apresenta de forma não trombogênica ou trombogênica, a qual pode resultar no “modelamento” ou “remodelamento” de todo o sistema cardiovascular (UTIYAMA, 2019).

O endotélio como superfície não trombogênica caracteriza-se pela presença de *heparan-sulfato*, uma glicosaminoglicana relacionada à heparina (cofator antitrombina III). Uma lesão no endotélio vascular e/ou as reações bioquímicas com superfícies estranhas

desencadeiam, instantaneamente, uma reação trombogênica; um processo inicial de coagulação sanguínea mediada por vasoconstrição, adesão e ativação das plaquetas e formação de fibrina. A própria célula endotelial produz uma série de substâncias que limitam o tamanho do trombo (fibrinólise) para evitar uma coagulação exagerada, passível de obstruir o vaso sanguíneo e levar o indivíduo ao infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral; das substâncias vasodilatadoras, a prostaglandina I₂ e o Óxido Nítrico (ON) são as principais (COELHO, 2008).

3.3 Dispositivos de assistência ventricular como terapia para Insuficiência Cardíaca

Na disfunção do sistema cardíaco, uma série de mecanismos compensatórios reguladores das condições hemorreológicas são ativados para conservar o volume em circulação, a pressão sanguínea e o débito cardíaco saudável. Em longo prazo, como resposta dos mecanismos adaptativos o coração pode aumentar a sua massa e modificar sua forma, um processo lento de “remodelamento” do miocárdio que ocorre por anos (ABRAHAM, 2007).

Das degenerações e cardiopatias, a Insuficiência Cardíaca (IC) é inespecífica, caracterizada pela incapacidade do sistema cardiovascular em manter a perfusão necessária, de 3 a 8 L/min/m², para atender a demanda dos tecidos. Com o maior esforço físico exercido como resposta adaptativa desta condição de escoamento, o tecido muscular da parede do miocárdio pode aumentar sua massa e perder a função contrátil. O diagnóstico da IC pode ser obtido por avaliação clínica e exames complementares, nos quais o perfil hemodinâmico pode ou não apontar sintomas e sinais de congestão (pulmonar e/ou sistêmica) e/ou de baixo débito, menor que 2 L/min/m² (ÁLVARO, 2012).

Quando o indivíduo apresenta quadro de IC grave por baixo débito, falência ventricular crônica ou “remodelamento ventricular” indica-se como método terapêutico a assistência circulatória mecânica por meio do implante de um Dispositivo de Assistência Ventricular (DAV) específico para o caso clínico. Este dispositivo deve ser capaz de estabilizar as condições hemodinâmicas do paciente conforme os parâmetros de pressão arterial e de frequência cardíaca, dispostos pelo coração natural (UTIYAMA, 2019).

Este método alternativo auxilia na “reversão” das alterações estruturais do músculo cardíaco, resultando na melhora funcional do órgão e de todo o sistema circulatório com consequente aumento da expectativa de vida dos pacientes na fila de espera por um coração compatível; posto que, mediante o transplante, o implante é retirado junto com o coração doente (ANDRADE; UTIYAMA, 2020).

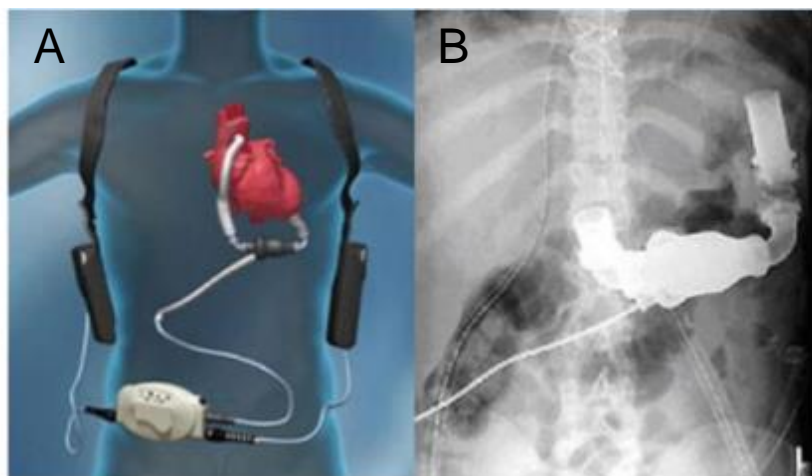
Classifica-se a aplicabilidade de um DAV conforme a necessidade do paciente: em casos de terapia de destino, o paciente que requer de assistência circulatória por tempo indeterminado para sobreviver; em ponte para o transplante, o DAV deve auxiliar o coração debilitado até a consumação do transplante; já em ponte para recuperação, a assistência circulatória é mantida até a recuperação do paciente transplantado ou não (ANDRADE; UTIYAMA, 2020).

O regime de fluxo deste tipo de dispositivo pode ser pulsátil ou contínuo, com os modos de acionamento podendo ser pneumáticos, hidráulicos ou eletromecânicos; e o perfil mecânico de atuação podendo ser do tipo pulsátil, axial ou centrífugo. Quando axial ou centrífugo, o DAV consiste basicamente de um rotor que permanece suspenso e se pulsátil consiste de diafragmas e válvulas (NOSÉ; MOTOMURA, 2003).

De qualquer forma, o DAV deve possuir duas cânulas de acesso, a de entrada para ser conectada ao ventrículo e a de saída para ejeção de sangue à aorta; e para ser biofuncional, deve incluir uma bomba de sangue não hemolítica, que comprove bom desempenho hemodinâmico, em biomaterial não citotóxico, que não degrade e nem deforme durante o tempo de aplicação, um dispositivo avançado de alimentação elétrica e um sistema de controle inteligente com prevenção de falhas (UTIYAMA, 2019).

O posicionamento anatômico de um DAV no organismo pode ser classificado como paracorpóreo, quando permanece ao lado externo do corpo, conectado ao coração por cânulas cardiovasculares de forma transcutânea ou intracorpóreo, implantado na cavidade torácica ou abdominal, abaixo do diafragma. A Figura 3.1 exhibe o posicionamento intracorpóreo do DAV axial *HeartMate II* fabricado pela empresa *Thoratec Corp. Pleasanton*, EUA (GRIFFIN, *et al.*, 2007).

Figura 3.1- Imagens do abdome total humano exibindo o posicionamento anatômico de um DAV HeartMate II – Thoratec Corp. Pleasanton, EUA.



(A) Imagem computacional da disposição do DAV e (B) radiografia do tórax com DAV.

Fonte: Griffin (2007).

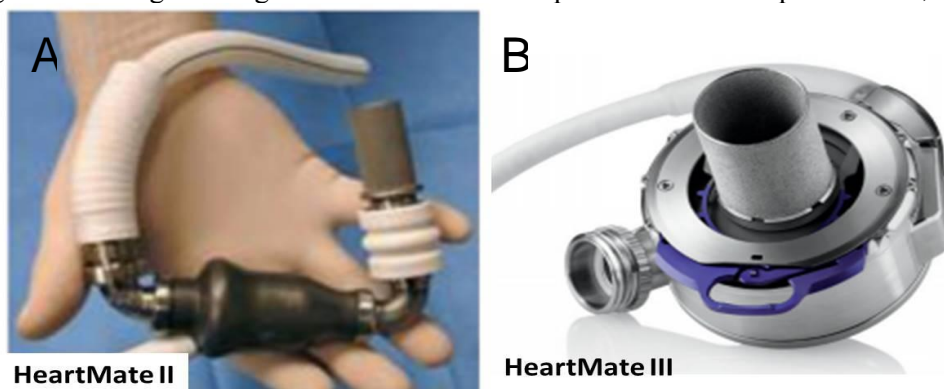
No aspecto histórico, o desenvolvimento de dispositivos de assistência ventricular teve início em 1953 com a primeira máquina para circulação extracorpórea. Os DAV, ainda de primeira geração (Berlim Heart EXCOR, Toratec PVAD), consistiam basicamente, de bombas elétricas ou pneumáticas, muito grandes para uso fora do hospital. A partir da década de 1990, iniciou-se o desenvolvimento dos dispositivos de segunda geração a *HeartMate II*, bombas de fluxo axial e de tamanho reduzido, suficiente para implante intracorpóreo. Em 2008, o FDA aprovou a inclusão deste DAV como uso para ponte para transplante e em 2010 para terapia destino.

Em dispositivos DAVs de destino, o sangue em contato com a superfície não endotelizada pode ser o maior agravante com relação à ativação plaquetária, antes mesmo do alto índice de hemólise. Geralmente, a resposta bioquímica celular, mesmo a materiais não ativos, desencadeia formação e desprendimento de trombos que comprometem a biofuncionalidade do dispositivo e, principalmente, a vida do paciente (BOCK, *et al.*, 2022).

De 2014 a 2016, um estudo clínico chamado MOMENTUM 3 envolvendo 1024 pacientes, comparou dois DAV, o *HeartMate III* (bomba de terceira geração, com bomba de fluxo centrífugo por meio de levitação magnética) *versus* o *HeartMate II* (fluxo axial), conforme mostrado na Figura 3.2. Do total de participantes, 60% receberam o implante como terapia de destino e o *follow-up* de dois anos foi publicado

em março de 2019 no *New England Journal of Medicine*. O objetivo primário considerou a sobrevivência de Acidente Vascular Cerebral (AVC) grave (escala de *Rankin*) e a reoperação para troca de dispositivo por consequente minimização do atrito entre os componentes do sangue, melhoria da estrutura da bomba para reduzir as complicações e aumento da durabilidade; os resultados demonstraram redução em AVC isquêmico e hemorrágico, sangramento gastrointestinal e trombose de bomba utilizando o DAV *Heartmate III*, sendo este aprovado para uso clínico em outubro de 2018 (MEHRA, *et al.*, 2018).

Figura 3.2- Imagem fotográfica dos DAV's da empresa Thoratec Corp. Pleasanton, EUA.



(A) DAV *HeartMate II* e (B) DAV *HeartMate III*.
Fonte: Mehra (2018).

3.4 Titânio e sua biointeratividade

Em 1791, o titânio (Ti) foi descoberto na Inglaterra pelo mineralogista inglês William Justin Gregor ao investigar uma espécie de areia magnética, o mineral ilmenita (FeTiO_3). Em 1795, este metal foi novamente observado pelo químico alemão Heinrich Klaproth, que o identificou como mineral rutilo com 98% de pureza e o denominou de titânio; seu nome associa-se aos primeiros filhos da terra, os Titãs, da mitologia grega (ABURAYA, 2012).

Na natureza, o titânio é o 9º elemento mineral mais abundante por representar 0,6% da crosta terrestre; este metal apresenta-se sempre ligado a outros elementos químicos, como na maioria das rochas ígneas (rochas magmáticas ou eruptivas) e seus derivados. No mundo, a Austrália e a África do Sul são os maiores produtores mundiais de titânio,

responsáveis por 19,4% e 17,3%, respectivamente; o Brasil possui 1%, na qual $\frac{2}{3}$ da extração ocorre no estado da Paraíba.

Inicialmente, o titânio foi aplicado na indústria aeroespacial devido sua alta resistência mecânica, equivalente à do aço, e baixa densidade ($4,54 \text{ g/cm}^3$), 60% da do ferro. Na década de 60, o Ti passou a ser amplamente aplicado na medicina e odontologia devido suas propriedades físico-químicas serem próximas as da platina, porém com custo reduzido. Desde então, este metal é considerado um dos melhores biomateriais metálicos por apresentar alta durabilidade e bom desempenho em condições severas, tais como de tensão mecânica, altas temperaturas, cisalhamento por fluxo, abrasão, atividade biológica, dentre outras passíveis de deformação (BRANEMARK, 1969; ABURAYA, 2012).

Normalmente, como tratamento de superfície aplica-se processos de refusão superficial para elevar o grau de pureza e melhorar algumas das suas propriedades; em casos de análise metalográfica, banhos em ácidos fortes são aplicados para remover óxidos de sua superfície e assim permitir a visualização dos grãos e de seus contornos (COCHRAN, *et al.*, 2002; RUPP, *et al.*, 2004). O processo de polimento – alisamento manual ou mecânico de superfícies com ou sem o auxílio de tecidos, pastas abrasivas, microesferas ou lixas – representa um papel fundamental no tratamento final de superfícies metálicas para implantes por proporcionar Ra específica (GARCIA, 2007).

Atualmente, a *American Society for Testing and Materials* (ASTM) confere doze graus/classe ao titânio, sendo do 1º ao 4º titânio comercialmente puro e de grau médico e os demais, ligas. A diferença entre as diferentes classes do titânio comercialmente puro está relacionada à predominância de elementos químicos constituintes: oxigênio, nitrogênio, hidrogênio e ferro; enquanto as ligas constituem de outros elementos metálicos que atribuem resistência mecânica superior, porém, com redução da estabilidade química devido ao potencial oxidativo dos demais componentes, tais como o molibdênio, vanádio e alumínio (AMERICAN SOCIETY FOR METALS INTERNATIONAL, 1992). A Tabela 3.1 exibe os níveis em porcentagem de massa dos elementos químicos aceitáveis para os diferentes graus de titânio grau médico, comercialmente puro, conforme especificação da ASTM (ASTM F67-13, 1995).

Tabela 3.1- Níveis percentuais aceitáveis dos elementos químicos constituintes do titânio c.p.

Grau do titânio	Nível Máximo de Elementos Químicos				
	Carbono	Ferro	Hidrogênio	Nitrogênio	Oxigênio
I	0,10	0,20	0,0125	0,03	0,18
II	0,10	0,30	0,0125	0,03	0,25
III	0,10	0,30	0,0125	0,05	0,35
IV	0,10	0,50	0,0125	0,05	0,40

Fonte: ASTM F67-13 (1995).

Para ser aplicado na confecção de implantes, o titânio deve seguir as diretrizes das normas internacionais ASTM F67-13: *Standard Specification for Unalloyed Titanium, for Surgical Implant Applications* e ISO 5832-2: *Implants for surgery – Metallic materials – Part 2: Unalloyed titanium*; além de apresentar microestrutura uniforme e tamanho de grão menor ou igual as especificações da ASTM E112-10: *Standard Test Methods for Determining Average Grain Size* (AZEVEDO, 2003).

Estas especificações garantem alta estabilidade química ao titânio comercialmente puro com resposta tecidual positiva uma vez que estimula a proliferação celular em processos de osteointegração, principalmente por sua propriedade piezoelétrica – capacidade de converter tensão mecânica em potencial elétrico – sem provocar reações de hipersensibilidade ou imunológicas (PLACKO *et. al.*, 2000; BRUNSKI *et. al.*, 2000).

Das considerações de interatividade da superfície de TiO₂ com o meio biológico destacam-se a baixa tendência à formação de íons devido a sua baixa solubilidade, a ausência de citotoxicidade do óxido, o ponto isoelétrico (pH 5-6) ser aproximado ao nível fisiológico atribui estabilidade termodinâmica; a baixa condutividade elétrica, além de sua constante dielétrica (85,0 a 25°C) ser próxima ao da água (78,4 a 25°C) (ELIAS, *et al.*, 2001).

3.5 Biofuncionalização de superfícies em dispositivos de assistência ventricular

O incentivo ao desenvolvimento de novos biomateriais e tratamentos de superfície para aplicações em sistemas de assistência circulatória existe desde 1980; Os pesquisadores e fabricantes de Dispositivos de Assistência Ventricular não tinham dúvidas de que os processos de modificação de superfície poderiam minimizar os efeitos trombogênicos

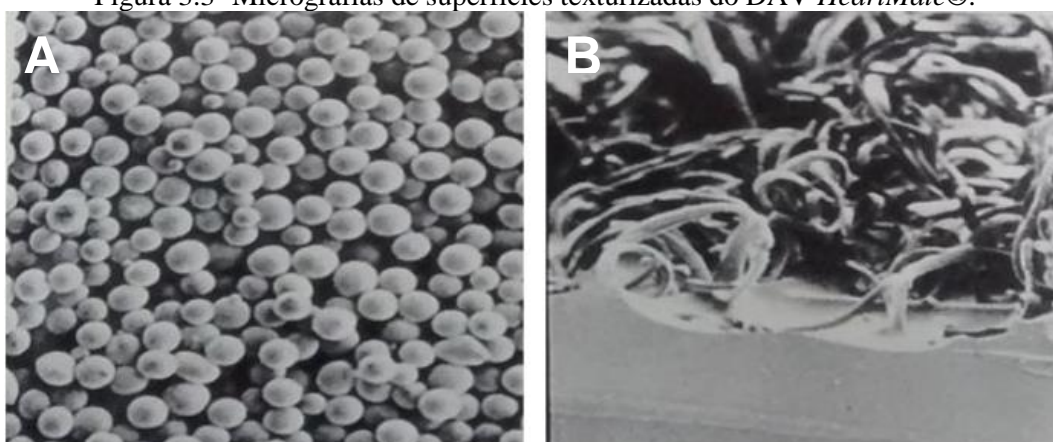
sanguíneos, aumentando a durabilidade de um implante e a expectativa de vida do paciente (SÁ, *et al.*, 2023; BOCK, *et al.*, 2022).

Para atribuir característica biofuncional à superfície de um dispositivo médico implantável é preciso conhecer a anatomia e fisiologia do sistema ou órgão alvo, o metabolismo e meio ambiente das células envolvidas, o tempo de implante e as propriedades mecânicas do implante, assim como as do biomaterial utilizado (GODINHO, *et al.*, 2011).

O primeiro relatório sobre modificação de superfície em DAV foi publicado em 1985; o *HeartMate I* (Thermo Cardiosystems Inc., Woburn, MA), uma bomba pulsátil pneumática de “primeira geração”, recebeu uma superfície dedicada para contato com o sangue e que foi fabricada por sinterização a vácuo de esferas de titânio de 75~100 µm de diâmetro em um substrato de liga de titânio (Ti6Al4V); a parte sinterizada possuía até quatro camadas que seriam suficientes para promover a formação de pseudoneoíntima (OLIN, 2001; DAVID, 2023).

Algumas das superfícies de contato com sangue do dispositivo de assistência ventricular centrífuga *HeartMate II*®, projetado pela *Thoratec Corporation em Pleasanton* – EUA, foram texturizadas para proporcionar, *in vivo*, uma fina camada de células vivas, altamente resistente à formação de trombos; na Figura 3.3 está mostrada a textura realizada no interior das cânulas, que são as microesferas em titânio sinterizadas, e na base da membrana mostra-se os filamentos em poliuretano extrudado (POIRIER, 1995).

Figura 3.3- Micrografias de superfícies texturizadas do DAV *HeartMate*®.



(A) Microesfera em titânio sinterizado (40x) e (B) filamentos em poliuretano (80x).

Fonte: Poirier (1995).

Depois de 17 anos, a eficiência destas modificações nas superfícies do DAV foi comprovada através de avaliações clínicas. Segundo Poirier, devido às características do biofilme formado contendo uma camada neointima contínua e derivado do sangue, bem aderido e rico em colágeno, os pacientes receberam apenas infusão de aspirina e dipiridamol como anticoagulantes (POIRIER, 1995).

Mais de uma década depois, quando os DAVs pulsados foram substituídos por dispositivos de fluxo contínuo, a liga de titânio foi mantida como material de referência. Inicialmente, o DAV de fluxo axial *HeartMate II* (HM II, anteriormente *Thoratec; Abbott, Abbott Park, IL*), utilizava titânio sinterizado em todas as superfícies internas, mas posteriormente o manteve apenas na cânula de entrada (DASSE, *et al.*, 1987).

Em 2011, o DAV *HeartWare* (*HeartWare, Inc., Framingham, MA*) teve sua cânula de entrada polida modificada para incorporar titânio sinterizado em sua seção central. Já a *HeartMate III* manteve o titânio sinterizado nas cânulas, regiões de entrada e saída de sangue (WENXUAN, *et al.*, 2022).

Desta forma, em resumo, diferentes processos de modificação foram testados, como *HeartMate® I* com poliuretano (PU) extrudado, *HeartMate II e III* com microesferas sinterizadas, *Evaheart®* com polímero metacrilóilo dietil fosforilcolina- (MPC-), *Carmeda®* com revestimento de heparina e *VentrAssist®* com Revestimento de *Diamond-Like-Carbon* (DLC) (GOLDSTEIN, *et al.*, 2005; KRISHNAN, 2002). A Tabela 3.2 descreve alguns tipos de DAVs de fluxo contínuo, e suas características.

Tabela 3.2- Descrição das características de Dispositivos de Assistência Ventricular.

DAV	Fabricante	Características	Superfície de contato com Sangue	Ref.
DeBakey®	MicroMed	2ª geração, rotor axial, suspenso por mancais cerâmicos	Titânio polido	GOLDSTEIN, <i>et al.</i> 2005.
EVAHEART®	SunMedical	2ª geração, rotor centrífugo e compacto	Revestimento polimérico (2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)	KIHARA, <i>et al.</i> , 2003.
Heartmate® II	Thoratec	2ª geração, rotor centrífugo e axial	Titânio polido e texturizado com microesferas TiO ₂	GRIFFITH, <i>et al.</i> , 2001.
INCOR®	Berlin Heart	3ª geração, rotor axial, suspenso magneticamente	Revestimento com heparina (Carmeda®)	HETZER, <i>et al.</i> , 2004.
VentrAssist™	Ventracor	3ª geração, rotor centrífugo, suspenso magneticamente	Revestimento em <i>Diamond-Like Carbon</i> (DLC)	MEER, <i>et al.</i> , 2003.

Fonte: Próprio autor.

Uma revisão bibliográfica detalhada realizada recentemente esclarece as terminologias adotadas e citadas por pesquisadores que observaram e estudaram os resultados de interação em estudos clínicos utilizando DAVs (WENXUAN, *et al.*, 2022). Os primeiros relatos de deposição de tecido foram observados com o DAV *HeartMate I*, um “revestimento biológico fino, homogêneo e brilhante cobrindo a superfície de titânio sinterizado” (TEUTEBERG, *et al.*, 2020). Outros pesquisadores descreveram ter observado uma “neoíntima fina e semi-transparente” na superfície sinterizada após 30 dias de implantação e denominaram essas estruturas de “manchas” (ZAPANTA, *et al.*, 2006).

A terminologia “ilhas periódicas de depósitos de tecido proteico” foi frequentemente citada em observações realizadas nas cânulas sinterizadas de entrada e de saída do DAV *Thoratec*, fabricado pela Abbott (DASSE, *et al.*, 1987; GRAHAM, *et al.*, 1990). Outros pesquisadores confirmaram tais observações ao estudarem duas bombas implantadas em pacientes por mais de 100 dias, mas nomearam o achado como “ilhas de colágeno” (FRAZIER, *et al.*, 1993).

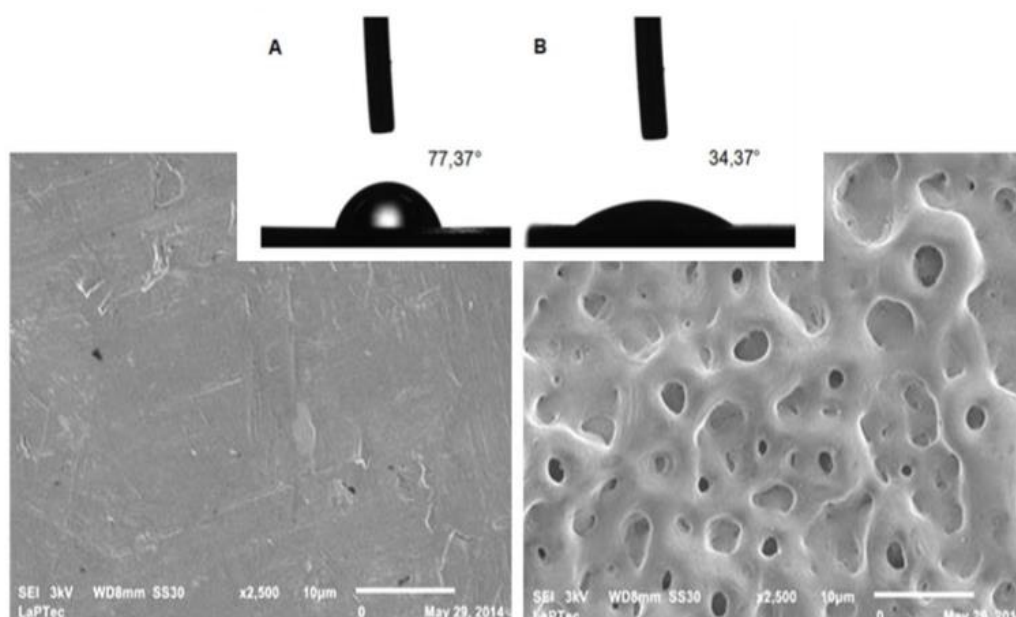
Alguns anos depois, houve relatos de que “ilhas brancas de formato irregular” de 0,1 a 3,0 cm de diâmetro foram encontradas em sete dos onze dispositivos explantados após

24 e 324 dias de implantação, respectivamente. E com base em observações minuciosas concluíram uma alta variação no número de “ilhas” por dispositivo e descreveram que suas localizações eram “aleatórias” e não relacionadas ao campo de fluxo (MEHRA, *et al.*, 2018).

Na literatura constam diversos termos que descrevem a resposta hematológica ao titânio sinterizado, como pseudo-neoíntima, tecido neoíntima e *pannus* de origem endotelial; mas não são precisamente definidos pela verificação histológica. Em geral, os investigadores relatam a presença destas estruturas como uma combinação de células endoteliais, fibroblastos, miofibroblastos, plaquetas, glóbulos vermelhos, macrófagos e matriz extracelular (SIN, *et al.*, 2009).

Em 2017, superfícies em titânio puro foram modificadas por *Plasma Electrolytic Oxidation* (PEO) e os resultados de caracterização físico-química revelaram uma superfície microtexturizada, homogênea e hidrofílica com ângulo de contato (Θ) de 34° , conforme está mostrado na Figura 3.4. Os poros e arcabouços formados apresentaram dimensões proporcionais às células de interesse, com diâmetros que variaram de 5 a 20 μm , sendo que as hemácias e as células endoteliais apresentam diâmetro médio de 7,5 μm ; atribuindo assim, característica de *scaffolds* ao substrato (SÁ, *et al.*, 2017).

Figura 3.4 - Imagens micrográficas da superfície de titânico e de sua molhabilidade.



(A) polido com perfil hidrofílico e (B) texturizada por PEO com perfil super-hidrofílico. Fonte: Sá (2017).

Ensaio com fibroblastos em superfície de titânio modificado por *Laser-Induced Periodic Surface Structures* (LIPSS) verificam a adesão não citotóxica da principal linhagem celular envolvida na cicatrização com função de manter a integridade do tecido conjuntivo por meio da síntese dos componentes da matriz extracelular (BOCK, *et al.*, 2022).

Contudo, estudos clínicos publicados ao longo das décadas sobre Dispositivos de Assistência Ventricular com superfícies texturizadas indicam resultados de interação variáveis e imprevisíveis; o relatório INTERMACS esclareceu a relação entre as propriedades do material e a durabilidade biofuncional dos DAVs e afirmou que as interfaces que não interagem com o sangue apresentam melhores taxas de sobrevivência nas curvas de Kaplan-Meier (TEUTEBERG, *et al.*, 2020).

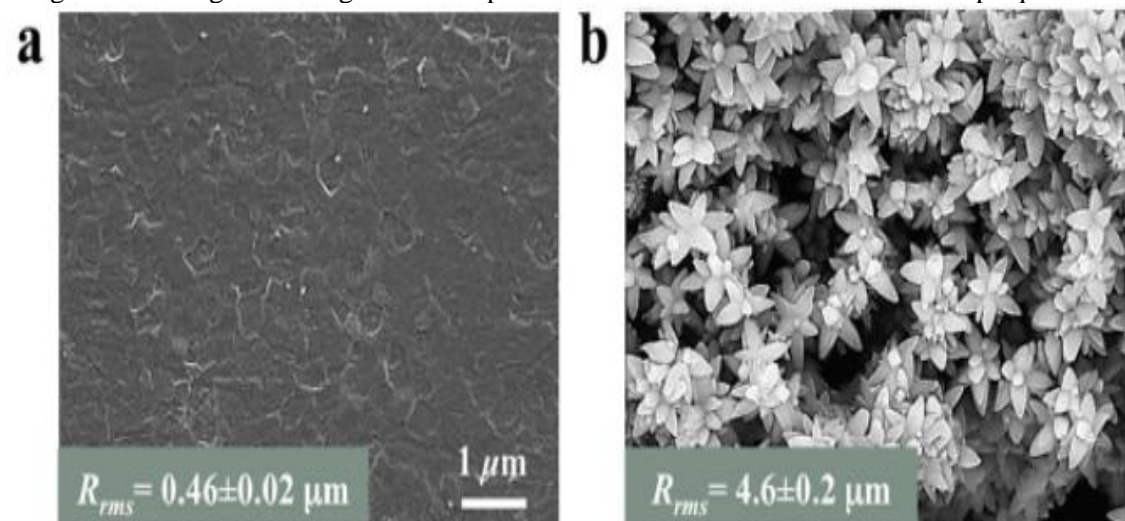
Os processos de polimento sempre preveniram a deposição de material biológico na superfície e manteve a hemostasia junto ao uso de anticoagulantes (ANDRADE; UTIYAMA, 2019; DASSE, *et al.*, 1987). A imobilização com heparina demonstrou eficácia para esse fim, mas sem durabilidade suficiente para aplicações de destino, ou seja, apenas no período operatório e pós-operatório agudo (HETZER, *et al.*, 2004).

A biofuncionalização dessas superfícies avançou a partir da manipulação das características de molhabilidade; que é determinado pela energia de superfície e força coesiva das moléculas/partículas/células envolvidas na porção líquida. Fisicamente, o efeito *Cassie-Baxter* atribui perfil super-hidrofóbico, o oposto do efeito super-hidrofílico, a uma superfície onde, este efeito, garante que forças de ligação entre átomos na interface não ocorram, uma vez que “bolsas” de ar em nível nanométrico, em torno de 50 nm, impedem o espalhamento de água sobre a superfície do sólido. Em condição dinâmica de escoamento este efeito impede que os constituintes do sangue entrem em contato com os átomos presentes na superfície (SÁ, *et al.*, 2023).

A introdução de uma superfície super-hidrofóbica por meio de nanotexturização, seguido ou não de revestimento, pode melhorar a hemocompatibilidade por promover mínima ou quase nula interação na interface e minimizar, conseqüentemente, as doses de anticoagulante conforme o Tempo de Coagulação Ativada (TCA) se estabiliza. Além de diminuir os efeitos causados pelo atrito viscoso na superfície, como desgaste, liberação de partícula e hemólise, etc..

Um estudo comparativo da ativação e adesão plaquetária foi realizado utilizando diferentes superfícies, dentre elas, com efeito super-hidrofóbico. As nanoflores de titânia, exibidas na Figura 3.5, foram fabricadas via síntese hidrotérmica, onde uma folha de titânio foi imersa em fluoreto de hidrogênio, utilizando uma cuba inoxidável revestida de PTFE, a 100 °C por 6 horas. Após a caracterização química por *X-ray Photoelectron Spectroscopy* (XPS) e física por molhabilidade e perfilometria, as amostras foram submetidas a incubação em plasma de sangue humano para determinação da taxa de ativação e adesão plaquetária *in vitro*. Os resultados indicaram que apenas as superfícies em titânia super-hidrofóbica promovem redução significativa da ativação e adesão plaquetária (MOVAFAGHI, *et al.*, 2017).

Figura 3.5- Imagens micrografias de superfícies submetidas ao estudo de adesão plaquetária.



(A) titânia lisa e (B) nanoflores em titânia.
Fonte: Movafagui et al. (2017).

3.6 Engenharia de superfície e tecnologia de processos de modificação

As propriedades de superfície são distintas das de volume, elas abrangem apenas as primeiras 5-10 camadas atômicas. A superfície caracteriza um plano ou uma face externa da matéria, uma fronteira que separa duas fases, sendo uma delas o estado gasoso; a fronteira entre duas fases não gasosas é chamada de interface. Normalmente, os fenômenos decorrentes de interação na interface são diretamente proporcionais ao perfil ou morfologia ou topografia de superfície em todas as escalas, principalmente

micro e nanométrica de ambas as partes que interagem, bem como da composição química (BELL, 1990).

A ciência de superfície abrange os fenômenos físicos e químicos que ocorrem na interface entre as fases em suas primeiras camadas atômicas. A física de superfícies compreende as propriedades naturais da matéria e suas reações atômicas, decorrentes de ações energéticas; e a química de superfície estuda as reações moleculares, suas propriedades e transformações, via sítios de ligação (CALLISTER, 1997).

Quando uma gota está sobreposta a uma camada sólida, é possível observar três fronteiras interfaciais da matéria: líquido – sólido, na fronteira entre a gota e a superfície; líquido – gasoso, no encontro entre a gota e o ar que a envolve; e sólido – gasoso, entre o ar e a superfície. Toda molécula constituinte de um material busca estabilização de energia com as adjacentes; as moléculas posicionadas mais à extremidade buscam essa estabilização em suas fronteiras, formando a tensão superficial (FERREIRA, 2013).

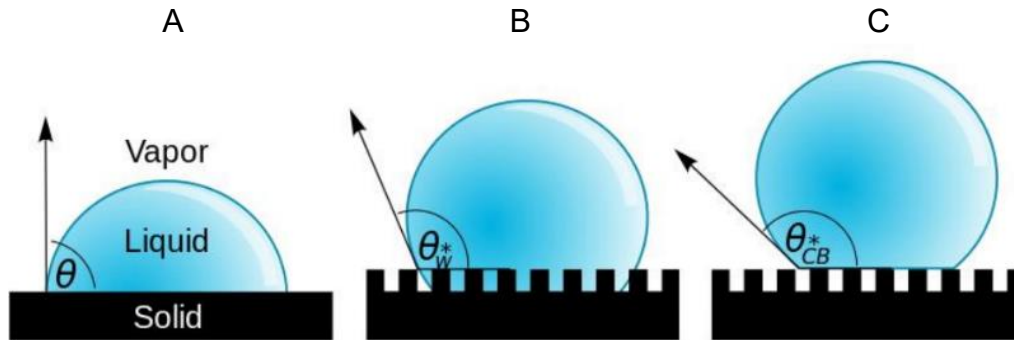
O resultado de interação entre o líquido e a superfície sólida tem influência direta da rugosidade desta; se o líquido preenche os pequenos espaços formados pela rugosidade, o espalhamento da gota d'água é maior, deixando menor o ângulo de contato na interface líquido – sólido. Este efeito caracteriza um perfil hidrofílico (do grego *hidro* = água + *filico* = atração), o qual indica afinidade do material com a água.

A rugosidade em nível nanométrico tende a formar “bolsas” de ar entre platôs sólidos na superfície e impede o espalhamento da gota d'água na porção sólida. Este caracteriza o efeito hidrofóbico (do grego *fóbico* = repulsão), e indica a não afinidade com a água. A eletronegatividade do oxigênio (O) impede que haja interação física com os átomos constituintes das moléculas de hidrogênio (H), as quais possuem maior concentração de moléculas eletropositivas; assim, o ângulo de contato aparente é maior. Quanto maior a carga negativa da superfície, menor será a chance das moléculas de água interagirem com as moléculas da superfície (SHENG, *et al.*, 2007).

Estes efeitos podem ser classificados de forma quantitativa através de medidas do ângulo de contato e qualitativamente por meio de observações do perfil de espalhamento da gota depositada na superfície. Estes efeitos são ilustrados pela Figura 3.6, em que o ângulo de contato menor de 90° caracteriza o efeito hidrofílico de

molhabilidade, o ângulo maior de 90° representa o efeito hidrofóbico, quando menor de 45° , o ângulo apresenta efeito super-hidrofílico e por fim, o ângulo maior de 150° demonstra o efeito super-hidrofóbico.

Figura 3.6 - Ilustração dos efeitos de molhabilidade.



(A) *Young*, (B) *Wenzel* e (C) *Cassie-Baxter*.

Fonte: Sheng et al. (2007).

Existem três modelos que definem cada uma destas possibilidades:

- o modelo de *Young* descreve o efeito de uma gota d'água ao entrar em contato com uma superfície sólida e lisa; a qual pode exibir ângulo de contato de *Young* com caráter de molhabilidade hidrofílico ou hidrofóbico.
- em 1936, *Wenzel* defendeu que a diferença entre as tensões superficiais por unidade de área entre sólido – gás e sólido – líquido determina a velocidade do espalhamento e o formato da gota aparente; neste estado, a gota d'água pode espalha-se totalmente ou parcialmente na superfície e o θ pode diminuir ou aumentar conforme parâmetros de rugosidade em nível micrométrico.
- o modelo *Cassie-Baxter* de 1944, descreve o comportamento de uma gota d'água em uma superfície em condição super-hidrofóbica, onde a gota permanece suspensa na interface sólido – ar, onde quanto maior a porção de ar, maior será o θ na interface.

A partir da ciência e expertises de conceitos fundamentais da engenharia de superfícies, hoje é possível personalizar propriedades e características de diversos materiais para uma determinada aplicação. O controle e aperfeiçoamento dos parâmetros de processo de modificação de superfície têm permitido o estudo e a obtenção de novos materiais

com superfícies e interfaces capazes de promover interações antes consideradas inexistentes.

A manipulação de características de superfície vem sendo realizada por tecnologias que utilizam processos físicos, químicos, eletroquímicos e de plasma atmosférico e de baixa pressão para promover decapagem, polimento, texturização e/ou deposições de filmes, com ou sem implantação de partículas diferentes das que compõem o substrato (SANT'ANA, 2014).

A deposição de espécimes atômicas sobre uma superfície para formação de filmes de revestimento é possível através de processos de acomodação térmica, adsorção, difusão superficial, nucleação de grãos, dentre outros. Em processos que atuam com acomodação térmica, os átomos incidentes precisam perder energia térmica suficiente para ficarem implantados na superfície; a energia térmica, transferida para a rede cristalina, deve ser controlada já que pode alterar as propriedades do material (MORO, 2015).

A adsorção consiste na ligação de moléculas de um meio líquido ou gasoso, as moléculas constituintes das primeiras camadas atômicas de uma superfície sólida (adsorvente); as forças de atração atuantes neste processo podem ser de origem química ou física, sendo que ambas envolvem temperatura, pressão e rugosidade do sólido, especificados durante o processo (ALAN, 2004).

Na adsorção química, as moléculas ou átomos são implantados à superfície do adsorvente através de ligações covalentes (1-10 eV), ou seja, a partir do compartilhamento de elétrons entre átomos. Na adsorção física, as moléculas do adsorvente interagem por forças de *Van der Waals* (0,01 eV), a soma de todas as forças envolvidas, atrativas ou repulsivas, se concentram na superfície (ALAN, 2004; MORO, 2015).

O processo de difusão pode ser definido como um mecanismo de transporte efetivo de massa, em que átomos ou moléculas constituintes de gases e líquidos são transportados para o interior de um material através do movimento de vibração dos mesmos. Independente do estado da matéria, os átomos estão em constante movimento e migram em função do tempo: nos gases, a cinética química é relativamente rápida, já nos

líquidos, o movimento atômico é mais lento e nos sólidos, a cinética de difusão é mínima devido à estabilidade da ligação atômica (CALLISTER, 1997).

A nucleação pode ser classificada como homogênea ou heterogênea, conforme as condições termodinâmicas de processo durante a transformação de fases e da introdução de agentes catalisadores. Considera-se uma nucleação homogênea quando o núcleo do material da nova fase forma-se no interior da fase de origem, sem a interferência de agentes externos; a nucleação heterogênea ocorre quando a partícula da nova fase se forma na superfície de um agente catalisador (SANTOS, 2006).

Quanto à modificação de superfície, de efeito físico e/ou químico, são várias as técnicas utilizadas neste trabalho. Por exemplo, a texturização de superfície é um processo de modificação topográfica que atribui rugosidade superficial em várias escalas; quando realizada de forma controlada, pode promover melhor adesão de partículas depositadas, aprisionamento proposital de células ou ainda, repelência / aversão.

A técnica de jateamento utiliza processos físicos de modificação de superfícies capazes de aumentar a carga elétrica negativa da superfície modificada além da morfologia ou rugosidade. O jateamento com partículas micrométricas combinado ao ataque ácido biofuncionaliza superfícies de implantes metálicos por aumentar a hidrofiliabilidade e favorecer maior adesão de células osteoblastos em processos de osseointegração (LI *et al.*, 2012).

A implantação iônica, outra técnica que pode ser usada para modificar superfícies, também, é um processo físico de texturização com a incorporação de “partículas” a partir da aceleração de átomos e moléculas, sob potenciais de aceleração de dezenas de *quilovolts* (kV), em direção ao material alvo. Dependendo de suas características, a incorporação altera as propriedades do material devido à energia transferida para a rede cristalina; neste processo, nas circunstâncias desejadas, os íons colidem na superfície, de forma elástica, com os núcleos dos átomos do material e inelástica, com os elétrons do meio (TIAN, *et al.*, 2010).

Além dos processos físicos de texturização, existem os que atuam a partir de efeitos regidos pelas leis da química e eletroquímica. A corrosão é um fenômeno transformação destrutiva, que raramente ocorre em materiais não metálicos, em que a matéria retorna a

sua forma original (minério) mediante perda de elétrons, resultando num revestimento de óxido cerâmico.

Geralmente, a corrosão ocorre de forma localizada, que definimos como pontos (*pites*) de corrosão, a partir de inclusões, sítios anódicos, descontinuidades ou deformações (microtrincas); as impurezas intersticiais, o tamanho do grão e os próprios elementos constituintes do contorno de grão, mesmo em mínimas concentrações, também desencadeiam pontos de reações espontâneas (MAREK, 1992; CALLISTER, 1997).

Tal processo pode ocorrer a partir de dois mecanismos: químico, onde ocorrem reações químicas diretas entre o material e o meio corrosivo sem geração de corrente elétrica significativa e, eletroquímico: no qual envolve transferência de elétrons a partir de reações químicas com indução proposital de potencial elétrico numa interface ou eletrólito.

A maioria das técnicas utiliza alta temperatura de processamento, o que degrada a maioria dos revestimentos e gera contaminação com subprodutos de reação; fato que impede a aplicação como produto final. Há processos de modificação de superfícies que utilizam deposição química ou física por tecnologias de plasma para promover a formação de uma camada personalizada e homogênea a partir do próprio material substrato.

Processos de texturização que utilizam laser minimizam as possibilidades de contaminantes por utilizar somente efeitos de luz sobre o material. Os mecanismos de interação entre o feixe laser e a matéria são influenciados por diversos fatores, como as propriedades do substrato, composição e estrutura da superfície, e parâmetros de processo: potência, frequência e largura do pulso laser; a atmosfera e a técnica de resfriamento adotada. A manipulação controlada e aperfeiçoamento dos parâmetros de laser, como fluência (F), número de pulso laser (N) e velocidade de varredura (v), são fundamentais para obter-se a microestrutura desejada (ZHENG, *et al.*, 2015).

Todo material pode absorver luz, mesmo que em comprimentos de ondas diferentes e em pequenas quantidades. Ou seja, esta absorção pode ser uniforme em todo espectro ou seletiva. Quando a densidade de energia do laser é suficientemente alta, o fenômeno de absorção provoca efeitos térmicos (fusão / vaporização) ou atérmicos (ablação a frio) (MELLO, 2018).

O efeito térmico pode promover o processo de refusão superficial de forma simultânea ao processo de texturização; acima da temperatura de fusão, as gotículas do metal na fase líquida vaporizam ao reagir ao pulso laser, forma-se então, os “poços” de fusão. A ablação a laser pode ser um processo atérmico em que as partículas constituintes do material são removidas de sua superfície por irradiação; se este processo é realizado com o substrato imerso em meio líquido, ocorre formação e captura de nanopartículas sem contaminação da superfície, por exemplo, ideal para aplicações biológicas (VIEIRA, 2018). Equipes no Brasil desenvolvem nanopartículas de ouro com tamanho aproximado de 110 nm para aplicações médicas no tratamento de câncer (CORDEIRO, *et al.*, 2019).

O perfil geométrico da cavidade formada pela ação deste tipo de laser condiz com a do feixe focalizado, e não com a do “poço” de fusão que se forma durante a interação utilizando laser de pulsos em nanossegundos (VIEIRA, 2018). O processamento de laser femtosegundos (10^{-15} s) realiza a texturização de superfícies através de "ablação a frio" sem impacto térmico destrutivo (CHICHKOV, 1996).

A profundidade e periodicidade da textura dependem da velocidade de varredura e da fluência do laser; a maior profundidade da textura pode ser obtida utilizando baixa velocidade de varredura ou aplicando altas fluências a laser (ZHENG, *et al.*, 2015). Um estudo realizado pela equipe europeia *Design and Fabrication of Functional Surfaces with Controllable Wettability (FabSurfWAR)* em substrato de aço inoxidável, concluiu que a combinação de alta fluência do laser, $1,7 \text{ J/cm}^2$ e baixa velocidade de varredura, 50 mm/s atribui propriedade hidrofóbica à superfície, com ângulo de contato aproximado de 145° (TA, *et al.*, 2015).

A equipe *FabSurfWAR* desenvolve tecnologias avançadas para gerar superfícies micro e nanoestruturadas de alta precisão e controle, para aplicações específicas. Texturas mais uniformes podem ser obtidas utilizando maior velocidade de varredura, aproximadamente 500 mm/s; nesta faixa, as estruturas periódicas obtidas são de aproximadamente 440 nm e rugosidade superficial reduzida para 35,9 nm. Em baixa velocidade de varredura, aproximadamente 100 mm/s, o processo exibe uma periodicidade na faixa de 220 a 310 nm, com rugosidade média de 50,6 nm (ZHENG, *et al.*, 2015).

Um estudo realizado no *Karlsruhe Institute of Technology* (KIT) da Alemanha comparou diferentes tipos de tecnologias de estruturação e concluiu que a técnica LIPSS utilizando laser femtosegundos se mostrou mais promissora no desenvolvimento de superfícies com propriedades funcionais, aplicáveis à óptica e dispositivos biomédicos e tribológicos (CHICHKOV, 1996).

Como processo de revestimento, o processo *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition* (PECVD) é utilizado para depositar materiais elementares (Al, a-C, c-Si), nitretos (AlN, Si₃N₄) e carbonetos (BCN, SiC) em superfícies sólidas; e pode ser realizado de diferentes formas, conforme a fonte de energia utilizada para ativar as espécies gasosas: à pressão atmosférica, baixa pressão, assistida por laser ou plasma. O método PECVD é o mais indicado para obter revestimentos uniformes, homogêneos e de espessura regular em amostras de geometria complexa, já que o vapor alcança todas as áreas sem necessidade de manipular seu posicionamento durante o processo (OOHIRA, 2009).

A dinâmica do processo é multifatorial e necessita de controle de alguns parâmetros durante sua execução para resultar no revestimento com as características desejadas. As reações ocorrem por meio de uma descarga luminescente de plasma, sustentada por uma fonte de energia elétrica, cuja tensão pode variar desde algumas centenas de Volts até dezenas de *KiloVolts*, no interior da câmara de deposição (OHRING, 2002).

Existem quatro etapas que ocorrem em um processo de deposição por PECVD e elas estão listadas abaixo:

- I. Reações primárias entre elétrons e outras espécies reagentes no plasma. Podem ser formados íons e radicais livres das espécies reativas;
- II. As espécies reativas formadas na etapa I são transportadas até a superfície do substrato, podendo ocorrer também reações elásticas e inelásticas adicionais, como interações entre íon e radical, fóton e molécula, etc.;
- III. Incorporação de íons ao substrato;
- IV. Ancoragem de novas espécies à superfície do filme que já está aderido à superfície do substrato. Pode haver a remissão de espécies não aderentes da superfície à fase gasosa.

Quando as espécies constituintes do meio plasma absorvem as moléculas da superfície, o mesmo é modificado. A espessura do revestimento formado pode ser controlada através do tempo de deposição; para obtenção de espessuras micrométricas, o tempo de deposição deve ser prolongado ou o processo pode ser repetido para que haja sobreposição de camadas, ou seja, formação de multicamadas bem aderidas entre si e a superfície modificada (ROBERTSON, 2002).

Os componentes desse sistema necessitam ser projetados e dimensionados de forma incomum, para garantir eficácia, precisão e alta qualidade do filme formado, especialmente a aderência devido aos riscos de aplicações na área biológica/médica sendo esta uma das especialidades do grupo Diamantes e Materiais Relacionados (DIMARE) do INPE.

3.7 Revestimento *Diamond-Like-Carbon* como superfície dedicada ao sangue

Heisenberg e Chabot, em 1971, desenvolveram os primeiros filmes de carbono tipo diamante (DLC – *Diamond-Like Carbon*) com o uso da técnica de deposição por feixe de íons em temperatura ambiente e sobre um substrato (RAMOS, *et al.*, 2015; ROBERTSON, 2002). Esses revestimentos, mesmo neste estágio inicial de estudos, já apresentavam ótimas propriedades como alta dureza, alto módulo de elasticidade, baixa rugosidade superficial, baixo coeficiente de atrito e boa resistência ao desgaste, fazendo com que fossem utilizados em diversos ramos da indústria, como discos rígidos magnéticos, e evoluindo para peças de motores de automóveis e aviões, próteses e ferramentas médicas e odontológicas, dispositivos microeletromecânicos, como revestimentos protetores sobre materiais poliméricos e de aplicações biomédicas, dentre outros. Uma de suas vantagens é a utilização de pressões e temperaturas baixas para sua obtenção, tendo como principal desvantagem na época, a pobre aderência sobre substratos metálicos (ROBERTSON, 2002; RAMOS, *et al.*, 2015; CAPOTE, *et al.*, 2022).

O filme DLC pode conter um misto de orbitais sp^1 , sp^2 e sp^3 , além de possuir ou não hidrogênio e outros elementos incorporados em sua estrutura. A configuração estrutural deste filme permite que pequenos aglomerados de carbono com hibridização sp^2 sejam interconectados por átomos de carbono com hibridização sp^3 (ROBERTSON, 2002) e é classificado em quatro grupos:

- Carbono amorfo hidrogenado (a-C:H), quando possuem quantidade de ligações sp^3 inferior a 50% e hidrogênio presente em quantidade superior a 20%;
- Carbono amorfo sem hidrogênio em sua estrutura (a-C) 30%;
- Carbono amorfo tetraédrico não hidrogenado (ta-C), quando apresentam elevada porcentagem de hibridizações sp^3 (acima de 70%) e baixa quantidade de hidrogênio;
- Carbono amorfo tetraédrico hidrogenado (ta-C:H), com hidrogênio em sua estrutura acima de 10% e hibridizações sp^3 inferior a 70%.

Hoje, a propriedade alotrópica do carbono proporciona a este material excelente desempenho tribológico, tais como alta dureza, baixo coeficiente de atrito, resistência ao desgaste, dentre outras características, destacam-se a inércia química, transparência óptica, alta condutividade térmica e o principal para o desenvolvimento deste trabalho, excelente biocompatibilidade e hemocompatibilidade (WANG, et al., 2018; DION, *et al.*, 1993).

No Brasil, o grupo DIMARE avançou nos estudos de aperfeiçoamento desta técnica com a introdução de um catodo adicional que exerce a função de confinar íons e elétrons em baixa pressão, em processo de deposição em regime de não colisões entre íons e átomos e moléculas, possibilitando a obtenção de revestimento de DLC com alta aderência e propriedades melhoradas em substratos metálicos, cerâmicos e poliméricos. A automação do sistema de produção foi estabelecida através da correlação entre as dimensões e formas do catodo adicional, atribuindo baixas tensões residuais ao revestimento DLC em escala industrial.

Com o desenvolvimento de um revestimento de DLC a partir da técnica de PECVD modificada com catodo adicional, ou mais bem aprimorada com um sistema de aprisionamento de íons e elétrons, foi possível revestir superfícies de praticamente todos os tipos de materiais. O DLC atribuído as superfícies apresenta propriedades superiores, como maior dureza, mais densidade, menor coeficiente de atrito, independentemente do contra corpo, mais aderente a qualquer tipo de materiais, seja metálico ou não; o processo em baixa temperatura de crescimento promove maior uniformidade de

deposição em três dimensões mesmo em superfícies complexas (BONETTI, 2008; RAMIREZ, *et al.*, 2015; CAPOTE, *et al.*, 2022).

Na medicina, a manipulação de superfícies pode levar ao aprisionamento de qualquer substância que apresente qualquer atividade ou efeito direto no diagnóstico que auxiliem na cura, alívio, tratamento ou prevenção de doenças do organismo humano (ANVISA, RDC nº 96/08).

A incorporação de nanopartículas de prata para atribuir característica bactericida ao DLC, ideal para ambiente cirúrgico hospitalar (MARCIANO, 2008); a ação autolubrificante e biocompatível maximiza a vida útil e o desempenho de próteses ortopédicas; inibir o encapsulamento por tecido endotelial e possível reobstrução da artéria em implantes *Stent* cardiovascular (MALUF, 2019).

A excelente hemocompatibilidade dos revestimentos DLC levou o seu uso em DAVs; em 1998, Yamazaki *et al.* desenvolveram um método de pulverização catódica por feixe de íons de dois estágios para formar um filme DLC em uma superfície de liga de titânio (Ti₆Al₄V) e aplicaram-no às superfícies de contato com o sangue de uma bomba centrífuga *Sun Medical* (*Sun Medical, Suwa City, Nagano, Japão*). Toda a superfície de contato com o sangue de uma bomba de sangue centrífuga compacta foi revestida com DLC para melhorar a compatibilidade com o sangue. As bombas demonstraram excelente hemocompatibilidade em experimentos *in vivo* de longo prazo; elas apresentaram funcionamento contínuo sem problemas durante 6 meses (YAMAZAKI, *et al.*, 1998).

Outros estudos revelaram menor aderência plaquetária em superfícies revestida com DLC, comparado a uma variedade de materiais de interface sanguínea, incluindo liga de Ti, TiC, TiO, diamante policristalino (PCD), politetrafluoretileno expandido (PTFE), etc. A boa hemocompatibilidade dos revestimentos DLC foi atribuída à sua característica hidrofóbica (KRISHNAN, *et al.*, 2002).

Mais tarde, em 2003, as bombas de sangue rotativas implantáveis *VentrAssist*TM foram fabricadas pela Divisão *VentrAssist, Ventracor Ltd.*, Austrália, em liga de titânio tiveram suas superfícies de contato com o sangue revestidas com DLC (MEER, *et al.*, 2003).

Em 2006, superfícies de liga de titânio foram revestidas com DLC e utilizadas nos dispositivos de assistência ventricular centrífugos EVAHEART® (*SunMedical Technology Research Corp.*, Nagano, Japão), os quais demonstraram excelente desempenho após serem implantados em vinte bovinos por períodos de 30 a 196 dias (SNYDER, *et al.*, 2006).

Estudos recentes alcançaram melhora significativa nas propriedades do revestimento DLC consideradas críticas para novas aplicações em dispositivos médicos implantáveis. A incorporação de nitrogênio no DLC foi capaz de melhorar a adesão e proliferação celular sem que houvesse permeação de soluções eletrolíticas, melhorando assim de forma simultânea, a biocompatibilidade e a bioinércia deste revestimento; ideal para fabricação e encapsulamento de dispositivos implantáveis com ausência de resposta imune induzida pelo organismo (LIAO, *et al.*, 2012).

A aplicação do DLC como material de revestimento em dispositivos de contato com sangue exhibe avanço considerável nos últimos anos devido seu comportamento antitrombogênico, o qual inibe a adesão e ativação plaquetária. A dopagem do DLC com boro tem sido estudada para melhorar ainda mais esta propriedade; um experimento de adesão plaquetária *in vitro* demonstrou que estes revestimentos são promissores para aplicações de dispositivos implantáveis que permanecem em contato com sangue (LIZA, *et al.*, 2017). Nanopartículas de diamante também estão sendo frequentemente utilizadas como materiais dopantes em revestimentos DLC para melhorar a resistência à corrosão e a eficiência antibacteriana (GUTIÉRREZ, *et al.*, 2019). Diante destes resultados, estudou-se os efeitos de molhabilidade para aperfeiçoar os resultados de interação em aplicações biomédicas. Devido ao melhor controle destes efeitos, fez-se estudos em superfícies com diferentes rugosidades antes e após a deposição do DLC, dito este DLC de melhores propriedades, conforme descrito a seguir na metodologia dos estudos deste trabalho.

4. METODOLOGIA

O desenvolvimento de produtos para saúde inclui as pesquisas pré-clínicas, as quais antecedem as avaliações clínicas com seres humanos; sendo as avaliações *in vitro* de desempenho e durabilidade, realizadas em bancadas e *in vivo*, com uso de animais. As fases da pesquisa clínica objetivam determinar a eficácia e a segurança dos novos produtos comercializados, de modo que, tragam maiores benefícios e menores riscos, em relação àqueles já existentes no mercado.

Pois bem, como parte do projeto Sistemas Propulsores Eletromagnéticos para Coração Artificial Implantável e Dispositivo de Suporte Circulatório Mecânico, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo desde 2009, este trabalho descreve as pesquisas e os desenvolvimentos de superfícies biofuncionais para minimizar efeitos indesejáveis de interação destas com o sangue durante prática de Assistência Circulatória Mecânica, como fase de avaliação pré-clínica de um Dispositivo de Assistência Ventricular.

A metodologia proposta para o desenvolvimento deste trabalho segue a linha de raciocínio “passo a passo”, a qual realiza progressão de experimentos e aperfeiçoamento do projeto através de resultados preliminares obtidos e interpretados com base em observações práticas, dados bibliográficos e resultados experimentais publicados anteriormente.

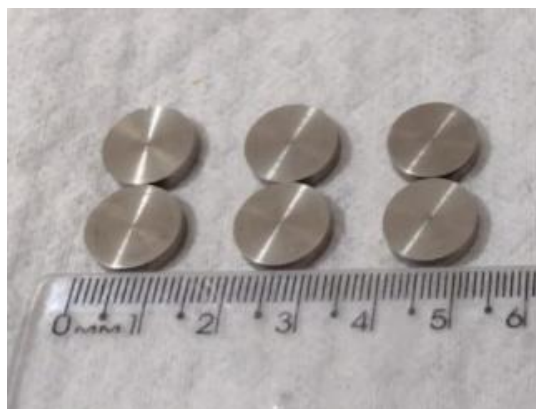
As diretrizes da norma ISO 10993: *Biological evaluation of medical devices* foram consideradas, e conforme estabelecido pela Parte 1: *Evaluation and testing with in a risk management process*, amostras em titânio grau médico II polido foram consideradas Material de Referência (MR) por ser o material consagrado no desenvolvimento de implantes utilizados em assistência circulatória mecânica (ISO, 2022).

4.1 Obtenção de amostras em material de referência titânio grau médico

A matéria prima, barra Ø13mm em titânio grau médico II, 99 % puro, foi adquirida pela *Realum*, Indústria e Comércio de Metais Puros e Ligas LTDA (São Paulo/SP, Brasil); o certificado de qualidade nº 2774 – Anexo. A. Certificado de qualidade de Titânio comercial puro garante sua especificação química.

Amostras em forma de disco plano 3,0 +/-0,1 mm de espessura foram usinadas em torno convencional no Centro de Engenharia em Assistência Circulatória do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (São Paulo/SP, Brasil), conforme as diretrizes da norma ISO 10993-Parte 12, que corresponde ao *Sample preparation and reference materials* (ISO, 2016). Um exemplo destas amostras antes das respectivas preparações de superfície está mostrado na Figura 4.1.

Figura 4.1- Imagem fotográfica dos discos planos em titânio grau médico II usinados.



Fonte: Próprio autor.

As amostras de Material de Referência foram polidas para alcançar rugosidade superficial apropriada e, neste caso foi obtida uma rugosidade de $0,234\mu\text{m}$, que corresponde a uma Ra dentro do intervalo permitidos em aplicações médicas e em dispositivos de assistência ventricular. Esta preparação foi realizada pela empresa LC Laser de Sorocaba, São Paulo, Brasil com auxílio de uma politriz, lixas (360, 400, 600 e 1000) e pasta diamantada de granulometria de 15 e 6 microns.

O processo de limpeza para eliminação de resíduos foi realizado por imersão, 900 segundos em banho de ultrassom com solução composta por 20 gramas de detergente apropriado para limpeza de materiais de laboratório em 1 litro de água deionizada. Após o enxágue e a secagem, as amostras foram colocadas em placa de *Petri* com álcool 70% e deixadas secar ao ar; seguido do acondicionamento em placas estéreis com poços individuais para garantir sua integridade.

4.2. Seleção das características de superfície e processos de modificação

Em primeiro lugar, as características micrográficas capazes de biofuncionalizar superfícies dedicadas ao sangue e as propriedades do Material de Referência, Titânio puro, foram consideradas na seleção dos processos de modificação.

O perfil de *scaffold* hidrofílico, a sua superfície é caracterizada pela disposição homogênea de poros e arcações com dimensão proporcional às das células de interesse, a qual atribuiu condições físicas e químicas para ocorrer o processo de endotelização – processo em que as células hematopoiéticas se aglomeram e permanecem aderidas com garantia de manutenção de seu metabolismo por meio de canais de vascularização para proliferarem; assim como ocorre nas primeiras semanas de vida fetal, até que as primeiras células-tronco se diferenciam em células do tecido endotelial (SOUZA, *et al.*, 2006).

A partir da manipulação do efeito de molhabilidade, este mesmo perfil de superfície pode proporcionar condições para que “bolsas” de ar permaneçam alojadas entre os platôs sólidos da microestrutura e resulte na minimização instantânea dos Fenômenos Indesejáveis de Interação, já que o efeito super-plasmafóbico impede a interação de contato entre o sólido e soluções compostas de H e O. O primeiro passo para a preparação da superfície foi fazer texturizações diversas e observar a molhabilidade antes e após a deposição do filme de DLC. A seguir descreve-se, de forma muito sucinta as três técnicas que melhores resultados apresentaram quanto às texturizações, onde diferentes parâmetros de interação do laser com a superfície foram utilizados. Sendo que apenas um foi de fato escolhido para dar prosseguimentos à preparação da superfície e os respectivos testes biológicos.

Desta forma, três técnicas *Laser Induced Periodic Surface Structures* (LIPSS) foram selecionadas para desenvolver a Superfície de Teste (ST), já que seus parâmetros de processamento são ajustáveis e permitem realizar um planejamento dimensional preciso da nanoestrutura a ser atribuída na superfície.

Na sequência descreve-se a técnica de deposição do filme de DLC, que é a *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition* (PECVD), que foi, desta forma, selecionada como processamento subsequente para personalizar o efeito de molhabilidade das

Superfícies de Teste e aprimorar seu desempenho e durabilidade em um sistema de fluxo de plasma sanguíneo.

Vale ressaltar que para ser aplicável, a técnica não pode alterar as propriedades do material, apenas de sua superfície; ser hemocompatível; comprovar reprodutibilidade e flexibilidade às especificações dimensionais da microestrutura; não resultar em cantos vivos, arestas ou resíduos potencialmente tóxicos; oferecer modificação homogênea em peças com geometria complexa e por fim, espera-se também, que seja relativamente econômica dentro dos padrões de eficácia que se deseja. A seguir descreve-se os processos de modificação de superfícies estudados e por ser uma parte importante do trabalho, descrevem-se alguns passos, que foram os mais importantes até se alcançar resultados esperados para se efetuar a segunda etapa da preparação da superfície. Estes resultados estavam diretamente relacionados ao grau de molhabilidade necessário para dar prosseguimento aos experimentos.

4.3. Processos de modificação da superfície de teste

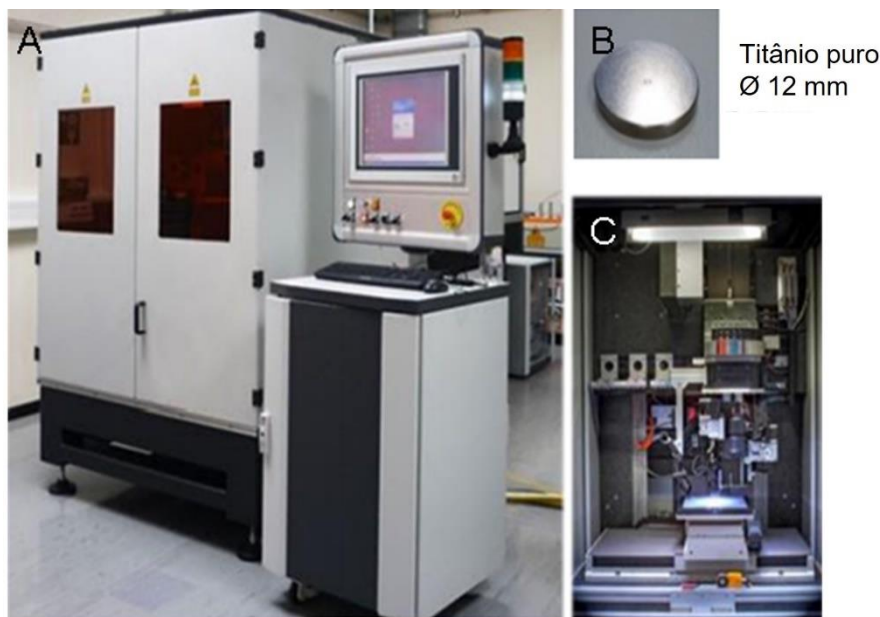
Começando com o processo de texturizações das superfícies, os parâmetros de processo *Laser Induced Periodic Surface Structures* (LIPSS) foram preliminarmente definidos no *Karlsruhe Institute of Technology* (KIT) na Alemanha, a partir da colaboração junto ao Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de São Paulo.

Em 2019, amostras de Material de Referência foram enviadas para o KIT, onde foram texturizadas com ranhuras em nanoescala com Laser *Tangerine, Amplitude Systems, France*, construído em um sistema de microusinagem PS450-TO (*Optec sa*, Bélgica), conforme mostra a Figura 4.2. O propósito foi o de atribuir efeito super-hidrofóbico à superfície. Os mecanismos de formação de estruturas periódicas na superfície utilizando laser ultra-rápido ainda não são totalmente compreendidos, portanto o processamento ocorreu de forma experimental, sob orientação do Dr. Wilhelm Pfleging.

A dinâmica deste processo envolveu o uso de um feixe laser em um sistema de controle de movimento com multi-passo. O feixe laser incide na superfície através de um sistema óptico que direciona e foca adequadamente na superfície de forma uniforme, a qual produz uma pequena região com foco sobre a superfície da amostra a ser processada; a região de foco pode ter diferentes dimensões, a depender do sistema óptico escolhido (ZHENG, *et al.*, 2015).

Alguns testes foram feitos até conseguir uniformizar a texturização. Um arquivo *StereoLithography* (STL) – estereolitografia – foi criado conforme o trajeto e direção em que o feixe laser de alta potência percorreu; O LIPSS foi criado usando um pulso de 400 fs com comprimento de onda do laser de 515 nm e uma lente f-theta com distância focal de 163 mm. O diâmetro do foco do laser foi de 20 μm . O processamento seguiu próximo ao limiar de ablação de energia de titânio com potência média de 80 mW, distância de hachura de 10 μm e velocidade de varredura de 10 mm/s; a interação do laser sobre a superfície seguiu de forma linear inclinada, uma vez que a irradiação com laser femto segundos revela uma periodicidade menor que o comprimento de onda do laser utilizado. Os parâmetros de laser mais variados até se conseguir as melhores condições de texturização foram a fluência, a frequência de pulso de laser e a velocidade de varredura.

Figura 4.2- Imagens fotográficas do Sistema Laser Femtosegundos do KIT/Alemanha.



(A) estação de trabalho, (B) Substrato em titânio e (C) sistema óptico.

Fonte: Próprio autor.

Por outro lado, apesar do intenso estudo não foi possível se obter a molhabilidade e a texturização esperada e/ou necessária para se dar continuidade aos estudos, pois mesmo o filme de DLC já dava características diferentes à superfície, sobre esta texturização, certamente por ser uma texturização muito fina. Mas, devido às recomendações da

literatura vigente, esses estudos continuaram no Brasil, onde esta técnica com características semelhantes foi utilizada, mas com a possibilidade de melhorar a texturização variando-se um pouco mais os parâmetros do Laser.

Portanto, no Brasil, duas principais características foram abordadas, sendo uma muito parecida com a já descrita, mas com texturizações ligeiramente maiores e outra com características bem diferentes, ou seja, com texturizações bem maiores. Assim contou-se com a colaboração do Centro de Lasers e Aplicações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e da Empresa CVD-Vale de São José dos Campos, Brasil, para testes de texturizações menores e maiores, respectivamente.

Na “estação *Femtolaser*” do IPEN, mostrada na Figura 4.3, foi utilizado um gerador de pulsos laser femtossegundos: laser de Ti:Safira modelo “*Element PRO 400*” da *Femtolasers Produktions GmbH*, com energia por pulso de 6 nano Joules e taxa de repetição controlável até 85 MHz. A uma frequência de 10 kHz, foi possível obter um feixe Laser com energia máxima por pulso de 200 micro Joules e com polarização vertical. Nestas condições, as melhores encontradas para este sistema de laser e óptica acoplada, obteve-se uma região focal de 790 nm com um tempo de duração de 10 a 30 femtosegundos.

Figura 4.3- Imagem fotográfica da estação de trabalho *Femtolaser* do IPEN.



(A) Plataforma de trabalho com coordenada 3 eixos e B) Gerador de pulsos laser femtossegundos *Element PRO 400* da *Femtolasers Produktions GmbH*.

Fonte: Próprio autor.

Novamente, apesar das texturizações estarem bem uniformes em dimensões, sua utilização com a deposição do filme de DLC, também, não se configurou uma boa preparação de superfície. Após vários testes, incluindo os testes de molhabilidade com água e plasma sanguíneo, notou-se não uniformidade da energia de superfícies e ainda assim não houve alteração substancial da energia de superfície do DLC sobre a superfície texturizada e não texturizada.

Na Empresa CVD-Vale, as superfícies das amostras MR foram texturizadas utilizando um laser com largura de pulso de nanossegundos da marca *IPG Photonics*, conforme mostra a Figura 4.4, cujas características são: comprimento de onda de 1064 nm, distância focal de 189 mm, diâmetro de feixe de 25 microns e lente Ronar s11024-112-163, potência de 10 W, frequência de pulso 30 KHz e duração de pulso de 250 nanossegundos. As melhores condições de texturizações foram alcançadas com velocidade de varredura de 30 mm/s variando-se a potência de 3 a 6 Watts para as diferentes texturas otimizadas.

Figura 4.4 - Imagem fotográfica da estação de trabalho Laser de nanossegundos da CVD-Vale.

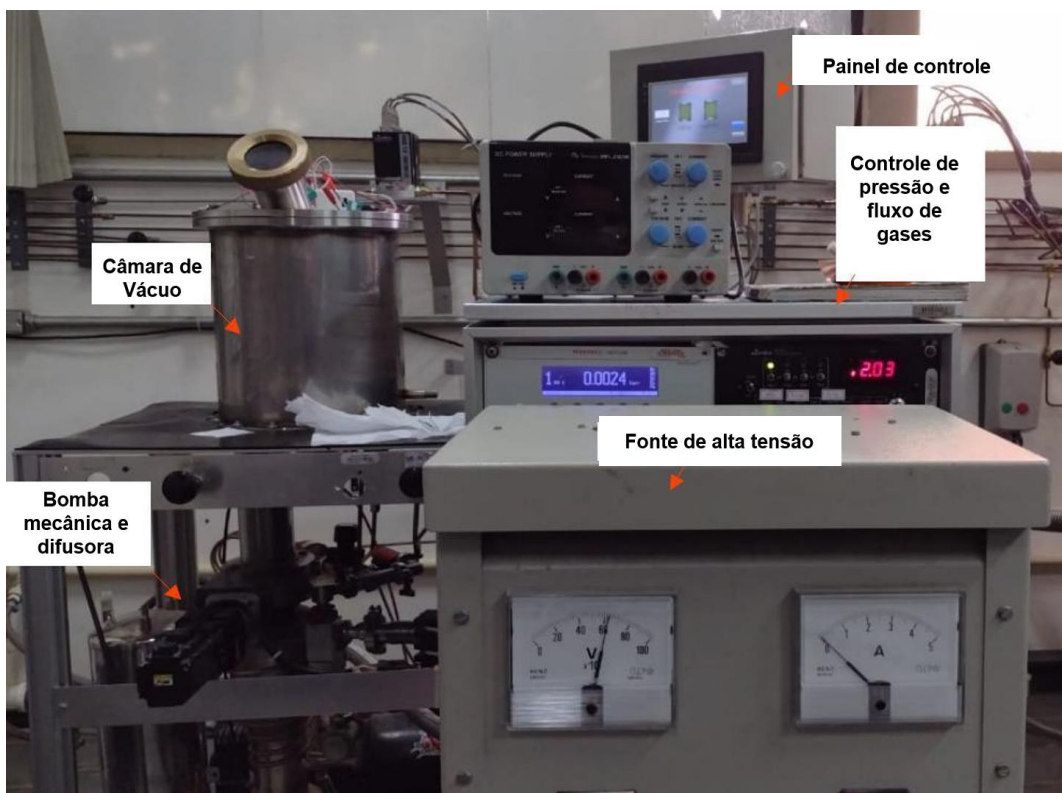


Fonte: Próprio autor.

As amostras MR foram posicionadas numa mesa móvel sob controle de coordenada em três eixos; o sistema *Computer Numeric Control* (CNC) utilizou programação ISO de códigos G para projetar as orientações e garantir a precisão micrométrica à mesa de controle. Os testes de molhabilidade mostraram uniformidade, com diferentes ângulos de contato para as superfícies sem a deposição do filme de DLC após a texturização.

O desenvolvimento das Superfícies de Teste, agora com a deposição do filme de DLC foi conduzido no Laboratório de DLC do DIMARE da Coordenadoria de Pesquisas e Desenvolvimento Tecnológico (COPDT) do INPE. A técnica *Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition* (PECVD) modificada e melhorada com o sistema de confinamento de íons e elétrons foi utilizada para promover um revestimento de DLC de excelente qualidade nas Superfícies de Teste, texturizadas, conforme mostrado na Figura 4.5.

Figura 4.5 - Imagem fotográfica do sistema PECVD-DLC do DIMARE/COPDT/INPE.



Fonte: Próprio autor.

Este sistema de deposição corresponde a uma câmara para alto-vácuo cilíndrica com volume interno de 20 litros, fabricado em aço inoxidável, com uma bomba mecânica de vácuo com capacidade de 8 m³/h que auxilia uma outra bomba de vácuo, uma bomba difusora com capacidade de 130 L/s. Este sistema de bombeamento é necessário para se alcançar baixa pressão, de cerca de 2×10^{-3} Torr à câmara de deposição em regime de operação. O sistema é capaz de manter uma pressão tão baixa quanto 10^{-5} Torr como pressão de fundo. Ao sistema de deposição como um todo, estão, também, acoplados

medidores de pressão parcial tipo Pirani e medidor de pressão absoluta tipo membrana capacitiva. Ainda, para controle da quantidade e controle de proporcionalidade dos gases utilizados, estão acoplados medidores de fluxo para cada um dos componentes gasosos utilizados no processo completo de deposição, como o fluxímetros para o argônio, utilizado para uma pré limpeza e para ignição gasosa do sistema de confinamento de íons e elétrons, para o silano que é utilizado para dar melhor aderência do filme de DLC ao substrato e para o acetileno, que é o gás precursor para a deposição do filme de DLC propriamente dito.

Para abrir a descarga em plasma, independentemente do gás em questão, acoplou-se ainda uma fonte de alta-tensão com controle de tensão pulsada com frequência de pulso de 20 kHz até -1000 V a 50 V e *duty cycle* de até 40%.

A deposição dos filmes de DLC foi efetuada mantendo-se os parâmetros de deposição, mas variando-se apenas o tempo de acordo com a espessura desejada. Para se efetuar a deposição, propriamente dita, inicialmente, introduziu-se o argônio, a um fluxo de 10 sccm para uma pré-limpeza, a uma tensão de polarização de -700V a uma pressão de cerca de 2×10^{-3} Torr por cerca de 30 minutos, em seguida faz-se a diminuição do fluxo de argônio para 1 sccm, mantendo-se o plasma aceso nestas condições e introduz-se o silano com fluxo de 2 sccm, mantendo-se as mesmas condições de descarga, por cerca de mais 30 minutos de filme, apenas a tensão de polarização deve ser aumentada para -800V.

Em seguida, introduz-se o acetileno, hidrocarboneto precursor do crescimento do DLC, a um fluxo de 5 sccm e dá-se o início da retirada do silano, formando assim um gradiente na estrutura do filme de DLC, Si-DLC, mitigando as tensões internas e fazendo um casamento da dureza e da dilatação térmica do substrato metálico para o filme de DLC puro. A taxa de retirada do silano foi de 0,05 sccm por minuto. Zerando-se o fluxo de silano, mantém-se o sistema em condições de crescimento pelo tempo desejado de acordo com a espessura do filme que se deseja. As condições totais neste momento, de crescimento do filme, devem ser mantidas. Nestas condições de crescimento do filme de DLC, pode-se obter uma taxa de crescimento de cerca de 1 micrometro por hora e filmes de até cerca de 3,0 micrômetros de espessura podem ser obtidos.

Primeiramente, apenas uma amostra de silício foi submetida ao processo PECVD por 60 minutos para certificar o controle da espessura do revestimento DLC em função do tempo de deposição, conforme parâmetros estabelecidos na literatura (PILLACA, *et al.*, 2019), comprovando-se uma taxa de crescimento de cerca de 1,0 +/- 0,1 μm por hora. Em seguida, foram propostos quatro diferentes tempos de deposição para revestir as Superfícies de Teste e obter as seguintes espessuras de DLC: 18 minutos para 0,3 μm ; 36 minutos para 0,6 μm ; 72 minutos para 1,2 μm e 144 para 2,4 μm .

4.4 Caracterizações de superfícies

As análises de caracterização física e química foram realizadas “passo a passo”, de acordo com as etapas de desenvolvimento de cada superfície; vale lembrar que as características do titânio polido MR foram consideradas “referência” na avaliação dos resultados.

Para caracterizar o perfil micro e nanográfico das superfícies foi utilizado o Microscópio Eletrônico de Varredura com (MEV – FEG) da marca *Tescan*, modelo Mira 3, disponível no COPDT/INPE. A técnica *Energy Dispersive X-Ray* (EDX) foi, também, utilizada para medir semi-quantitativamente a composição química do filme e verificar se havia alguma impureza incorporada. O *software* MeX foi utilizado para identificar a rugosidade superficial (R_a), a profundidade da textura e espessura do revestimento DLC. O número mínimo de amostras para análises foi de três, suficiente para gerar a média e o desvio padrão amostral necessário para os experimentos.

A avaliação estrutural do revestimento DLC foi obtida via Espectroscopia de Espalhamento *Raman* utilizando um equipamento da marca *Horiba Scientific*, modelo *LabRAM HR Evolution*, disponível no COPDT/INPE. As análises foram conduzidas com laser no espectro do visível com comprimento de onda de 514,5 nm, temperatura de 22 C, pressão atmosférica, e umidade relativa de 25%. Em materiais à base de carbono amorfo, geralmente aparecem duas bandas principais centradas em, aproximadamente 1330 e 1560 cm^{-1} ; no DLC, estas são as denominadas bandas D e G, respectivamente.

O equipamento *Ramé-Hart Automated Tilting Base*, modelo 100-25A, disponível no Laboratório de Materiais do Instituto Tecnológico de Aeronáutica (Labmat – ITA), foi utilizado para determinar o perfil de molhabilidade das superfícies através de análises

do ângulo de contato utilizando o método da gota séssil e água como solução; foram feitas três medidas em cada amostra para gerar a média e o desvio padrão. Esta etapa foi fundamental para selecionar as Superfícies de Teste Derivadas submetidas às Avaliações *In Vitro* com material biológico e *In Vivo*.

4.5 Análise comparativa da molhabilidade entre água e sangue humano

O efeito de molhabilidade ocorre de acordo com as características físicas e químicas da superfície e do fluido que interagem. O método da Gota Séssil consiste no registro do espalhamento de uma gota depositada sobre uma superfície capaz de gerar medidas do ângulo (θ) de contato e classificar o efeito aparente em super-hidrofílico para $\theta < 45^\circ$, hidrofílico para $\theta < 90^\circ$, hidrofóbico $\theta > 90^\circ$ ou super-hidrofóbico $\theta > 150^\circ$ (SHENG, *et al.*, 2007).

Para certificar a reprodutibilidade e estabilidade dos efeitos de molhabilidade observados nas superfícies desenvolvidas, o protocolo de Avaliação da Molhabilidade *In Vitro* de Sangue em Superfícies Biofuncionais foi elaborado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (CEP/IDPC); ver Anexo B. Parecer consubstanciado do CEP IDPC.

Todas as superfícies foram submetidas ao processo de esterilização em autoclave e acondicionadas em embalagens estéreis no Departamento de Cirurgia Experimental do IDPC. Um doador voluntário adulto saudável colaborou para que o sangue fosse coletado no momento de cada análise, mediante aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As superfícies em estudo foram posicionadas em um goniômetro *Newport Kruss DSA100* disponível no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade Vale do Paraíba (IP&D/UNIVAP); a coleta de sangue foi realizada utilizando uma micropipeta automática (*Metrohm*, Brasil) com ponta de 2-4 μL descartável, imediatamente após a micro-incisão em um dos dedos usando uma lanceta descartável de $\varnothing 0,36$ mm (*AccuChek Safe-T-Pro*).

Uma gota de sangue foi depositada em cada superfície e então a medida do ângulo de contato foi registrada; para avaliar a estabilidade da interação em função do tempo,

outra medição foi realizada após intervalo de 5 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes em cada superfície para registro da média e do desvio padrão amostral.

Vale ressaltar que a análise de molhabilidade com água foi refeita utilizando este mesmo equipamento para viabilizar o estudo comparativo com sangue.

4.6 Avaliação *in vivo* da interação hemodinâmica

O protocolo de Avaliação *in vivo* da interação hemodinâmica com as superfícies desenvolvidas para minimizar efeitos indesejáveis em aplicações cardiovasculares foi elaborado e submetido para aprovação ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo (CEUA/USP); ver Anexo C. Certificado CEUA USP.

Rattus norvegicus adultos (linhagem *Wistar*) pesando mais de 300 gramas foram utilizados como modelo de organismo vivo por apresentarem perfil anatômico e fisiológico compatível e suficientes para atender os objetivos deste estudo. A ação metabólica desta espécie é acelerada em relação ao do organismo humano, ou seja, na idade adulta, cada mês do animal equivale aproximadamente 2,5 anos humanos (ANDREOLLO, *et al.*, 2012) e, portanto, doze semanas de avaliação foram consideradas suficientes para atender a especificação da ISO 10993 e RDC n° 751.

A norma ISO 10993 – Avaliação Biológica em Dispositivos Médicos determina que vinte semanas seja o período mínimo de experimentação *in vivo* para obter resultados significativos em estudos da interação biológica com superfícies de materiais sólidos e a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária específica por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 751 de 15 de setembro de 2022 que todos os componentes constituintes de um dispositivo médico implantável Classe IV devem garantir vida útil por no mínimo cinco anos. Assim, quatro grupos, contendo três animais em cada um foram considerados para realização deste estudo experimental, sendo:

Grupo 1: Material de Referência – titânio grau médico II;

Grupo 2: Superfície de Teste – Material de Referência texturizado;

Grupo 3: Superfície de Teste A – Superfície de Teste com revestimento DLC em menor espessura;

Grupo 4: Superfície de Teste B – Superfície de Teste com revestimento DLC em maior espessura.

O perfil geométrico do implante inclui um fio de 0,4 mm de diâmetro por 4 cm de comprimento, em que apenas 4 mm foi considerado a área de superfície útil, a qual permaneceu na região intra-aórtica em contato com fluxo sanguíneo arterial; este biomaterial foi fornecido pela empresa *Realum* Indústria e Comércio de Metais Puros e Liga e a certificação da composição química esta inclusa neste trabalho como Anexo D. Relatório de Identificação do Material.

Para este procedimento invasivo, um cateter *Polyetileno Tubing, INTRAMEDIC*, Clay Adams, EUA foi utilizado para cobrir a área restante do fio em titânio, a fim de auxiliar sua fixação na parede externa da aorta e evitar possível perfuração de tecidos adjacentes.

Cada animal recebeu um único implante, o qual foi posicionado na região intra-aórtica médio-abdominal, para isso, os animais jejuaram por 12 horas como procedimento pré-operatório padrão. O medicamento acepromazina (2,5 mg/kg) foi previamente administrado como tranquilizante e após 30 minutos foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 mg/kg e 20 mg/kg, respectivamente). Em seguida, com a confirmação da ausência do reflexo, cada animal foi posicionado no aparelho estereotáxico em decúbito dorsal sob a anestesia com isoflurano (3% para indução e 2 a 3% para manutenção).

Uma incisão na região central do abdômen foi realizada para exposição da artéria abdominal e posicionamento do implante através de perfuração com interrupção do fluxo sanguíneo; a fixação do implante foi realizada com auxílio de uma tela cirúrgica de polietileno e cola cirúrgica *Liquiband Surgical*.

Uma dose preventiva de antibiótico bactericida, pentabiótico (30.000UI/kg), foi induzida junto com o anti-inflamatório/analgésico, cetoprofeno (2 mg/kg). Vinte e quatro horas pós-cirurgia, os animais foram transferidos para o Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia em caixas com dimensão 41X35X17, separados por grupo; as condições de manutenção consideraram iluminação artificial, ciclo claro/escuro de 12/12 horas com livre acesso a ração e água filtrada.

Na primeira semana pós-cirurgia, os animais foram submetidos a análises de rotina para detectar sinais de doença e infecção, tais como vermelhidão, inchaço e/ou presença de dor; assim como de sofrimento, por perda de peso, vocalização, postura curvada e piloereção. Qualquer eventual óbito dentro do período proposto como possíveis causas de embolia pulmonar e/ou trombose deve ser investigado.

O explante ao final do período proposto foi realizado por meio de uma nova incisão na região central da aorta abdominal, sob a anestesia; quaisquer atritos ou ações mecânicas que comprometessem a integridade do local e da superfície de contato foram evitados. Cada implante foi imediatamente imerso em solução salina (cloreto de sódio 0,9%), imediatamente após sua extração, para garantir a conservação de possível material biológico aderido à superfície, assim como eliminar espécimes suspensas; como as análises investigativas foram realizadas em sequência, não houve necessidade de utilização de solução salina tampão fosfato + formaldeído.

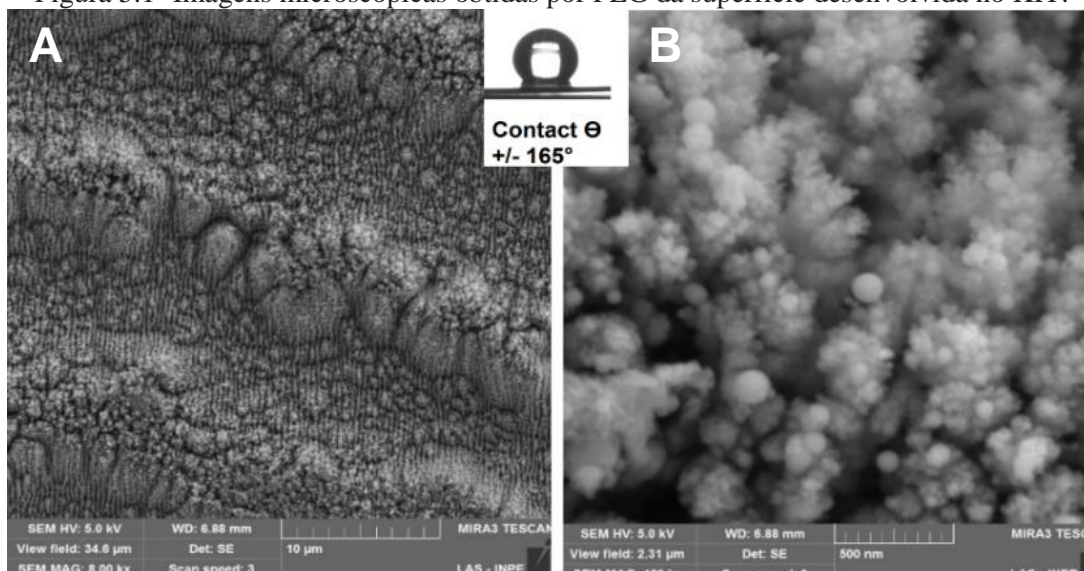
O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) modelo JSM-6460LV (Proc. FAPESP nº00/08231-1) disponível no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IFUSP) dedicado para análises de amostras em vácuo relativamente baixo, foi utilizado para avaliar as superfícies implantadas para não danificar o material biológico aderido e gerar evidências de produtos físicos e químicos, como resultado de interação hemodinâmica. Esta análise foi realizada em baixo vácuo, 130 Pa, suficiente para preservar as estruturas biológicas pretendidas fazendo uso de detectores de elétrons secundários e retroespalhados para auxiliar na diferenciação da composição química entre os implantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como descrito, fez-se três diferentes processos de preparação de superfície para receber o revestimento de DLC. No primeiro caso, que foi o levantamento dos parâmetros de processamento LIPSS utilizados no KIT da Alemanha, onde este estudo demonstrou resultados promissores com uma superfície super-hidrofóbica, emergindo nanoestruturas arredondadas de TiO_2 , que com a deposição de DLC esta estrutura se perde por mais fino que seja o revestimento de DLC.

As análises de caracterização de superfícies em microscópio FEG realizadas no INPE revelaram uma nanoestrutura esférica e homogênea, conforme mostra a Figura 5.1, explicitando duas imagens da superfície desenvolvida, em que os “caminhos” formados pelo laser são de aproximadamente $10\ \mu\text{m}$ de distâncias entre eles e as nanoesferas, com diâmetro menor que $200\ \text{nm}$. Esta figura também mostra a formação de aglomerados sobrepostas e distribuídas de forma regular na superfície. Embora estes aglomerados estejam distribuídos de uma forma até regular, isto pode representar problemas ou riscos com possível descolamento destes, uma vez que são constituídos basicamente de óxido que não necessariamente este bem aderido às superfícies base do substrato de titânio.

Figura 5.1- Imagens microscópicas obtidas por FEG da superfície desenvolvida no KIT.



(A) micrografia à $10\ \mu\text{m}$ e (B) nanografia à $500\ \text{nm}$.

Fonte: Próprio autor.

A análise de molhabilidade realizada no Labmat do ITA revelou um perfil super-hidrofóbico com ângulo de contato médio superior a 150°, como dito. Verificou-se, portanto, que no desenvolvimento das primeiras Superfícies de Teste tenham atendido os primeiros objetivos deste trabalho, principalmente por comprovar reprodutibilidade e ausência de contaminação; novas estruturas precisariam ser estudadas a fim de dar uma melhor compreensão ao efeito das diferentes energias de superfícies associadas à necessidade de se introduzir um revestimento que garanta durabilidade, hemocompatibilidade, etc. às paredes de DAV e, além disso, pudesse dar uma luz quanto aos efeitos de mitigar a necessidade da heparina, etc..

Novas superfícies modificadas com o mesmo o material, o Titânio grau II, puderam ser estudadas, agora em laboratórios no Brasil. Por outro lado, também, estes resultados originários do KIT, em parceria com o IFSP, contribuíram muito na elaboração do desenho metodológico deste trabalho dando um norte aos experimentos mostrados a seguir.

A Tabela 5.1 simplifica o proposto e realizado no desenvolvimento das diferentes superfícies no Brasil, utilizando, também, o Titânio grau médico II, comercialmente puro, como substrato Material de Referência e três diferentes processos de modificação de superfícies.

Tabela 5.1- Tecnologias de processamento aplicadas e configuração das superfícies.

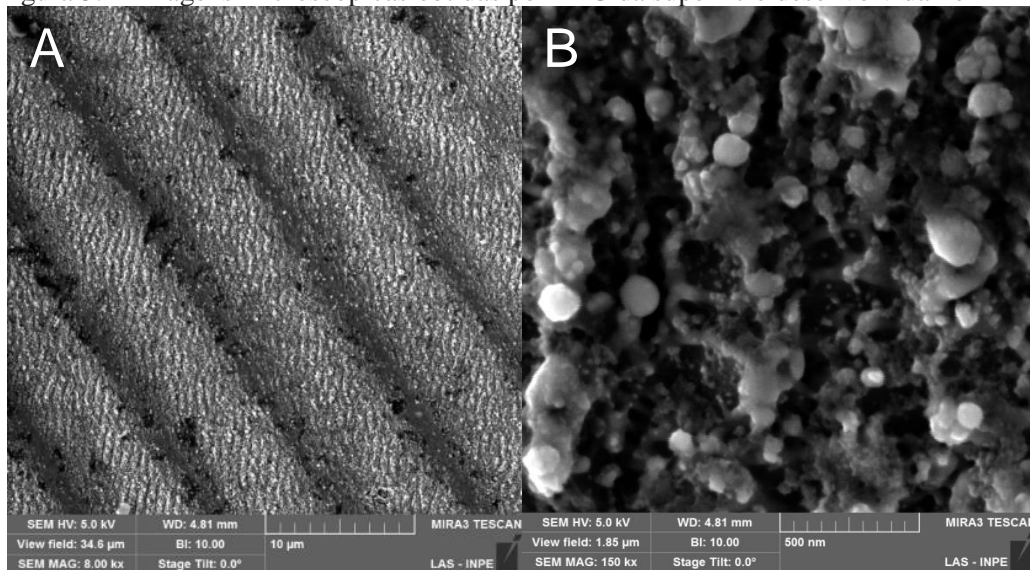
Nomenclatura	Sigla	Processo de Modificação	Característica da Superfície
Material de Referência	MR	Polimento	Liso e homogêneo
Superfície de Teste	ST	LIPSS	Texturizado e homogêneo
Superfície de Teste Derivadas	ST “X”	LIPSS + PECVD-DLC	Texturizado e homogêneo com revestimento DLC em diferentes espessuras

Fonte: Próprio autor.

O processamento LIPSS realizado no Brasil promoveu a ablação da superfície de forma simultânea à sua limpeza. Na estação *Femtolaser* do IPEN, as superfícies desenvolvidas também apresentaram nanoestruturas bem definidas e homogêneas, similar ao obtido na Alemanha, conforme apresenta as imagens de alta resolução exibidas na Figura 5.2. Porém, os “caminhos” formados pelo laser mantiveram uma distância inferior 10 micrômetros com distância entre as sub-estruturas de aproximadamente 2 micrômetros e, novamente mostrando densidade de nanopartículas de oxido de titânio, com dimensões

de cerca de 50 a 200 nanômetros. O efeito de molhabilidade foi avaliado no *Labmat* do ITA e revelou efeito hidrofílico, com ângulo de contato médio de 40,7°. Ou seja, de certa forma, observou-se uma inconsistência de resposta em termos de energia de superfície se comparado com os resultados de energia da superfície produzida em laboratório da Alemanha.

Figura 5.2- Imagens microscópicas obtidas por FEG da superfície desenvolvida no IPEN.



(A) micrografia à 10 μm e (B) nanografia à 500 nm.

Fonte: Próprio autor.

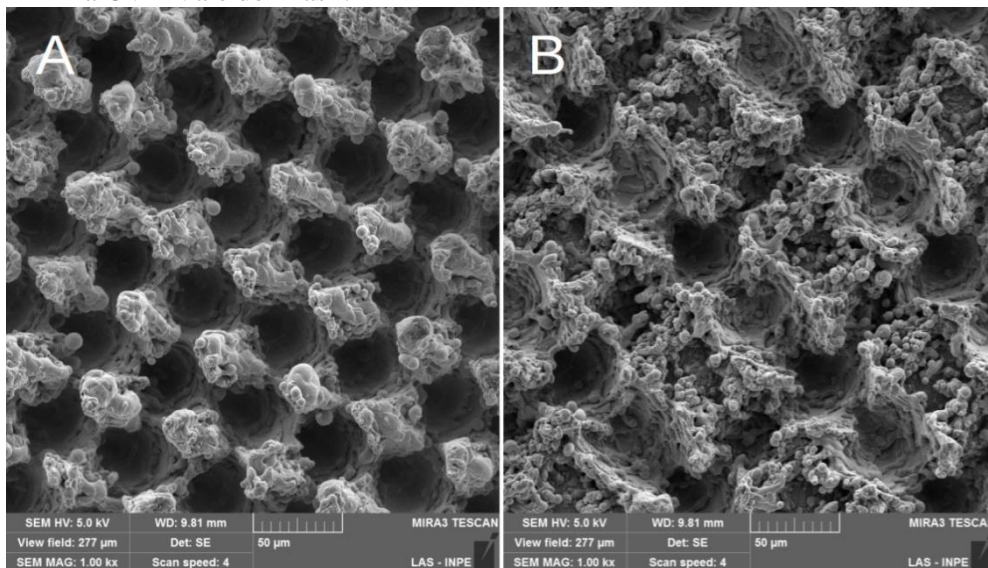
E o que é muito importante de avaliar é que, conforme mostra a Figura 5.2, na imagem de maior resolução, a densidade de nanoestruturas arredondadas de TiO_2 é menor que a densidade encontrada nas amostras tratadas a laser na Alemanha. Como já dito anteriormente, esta é uma dificuldade muito grande em se obter nanoestruturas, por exemplo, de óxidos metálicos e, estas serem altamente aderente ao substrato base metálica.

Justamente neste ponto, que se pensou em produzir uma superfície no referido substrato de Titânio grau II, onde a rugosidade não fosse apenas devido à formação de partículas de óxidos metálicos, e sim que fosse parte integrante da estrutura metálica, mas que a rugosidade pudesse ser avaliada e alterada de acordo com o resultado de energia de superfície antes e após a deposição do revestimento de DLC.

A experiência adquirida na Empresa CVD Vale, com seus desenvolvimentos, apontava para esta nova possibilidade de obtenção de superfície. Portanto, na CVD Vale, o Laser

utilizado foi, também, pulsado com largura de pulso de 250 nanossegundos com frequência de pulso de 30 kHz e a energia usada para se obter os melhores resultados foi de 3 a 6 Watts e os dois parâmetros de processamento aplicados atribuíram característica de *scaffold* à superfície lisa e plana do Material de Referência, ou seja, poros bem definidos com dimensões proporcionais às células de interesse e passível de promover aderência e proliferação celular. Com estes dois conjuntos de parâmetros, selecionou-se as amostras A e B, conforme mostra-se na Figura 5.3, onde exibe as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, FEG no INPE, que embora sejam topograficamente diferentes, apresentaram pequena diferença no perfil de molhabilidade aparente utilizando água, onde observa-se superfícies super-hidrofóbicas, com ângulo de contato médio de 153° para superfície A e de 143° para superfície B.

Figura 5.3- Imagens microscópicas obtidas por FEG no INPE das duas superfícies desenvolvida na CVD Vale do Brasil.



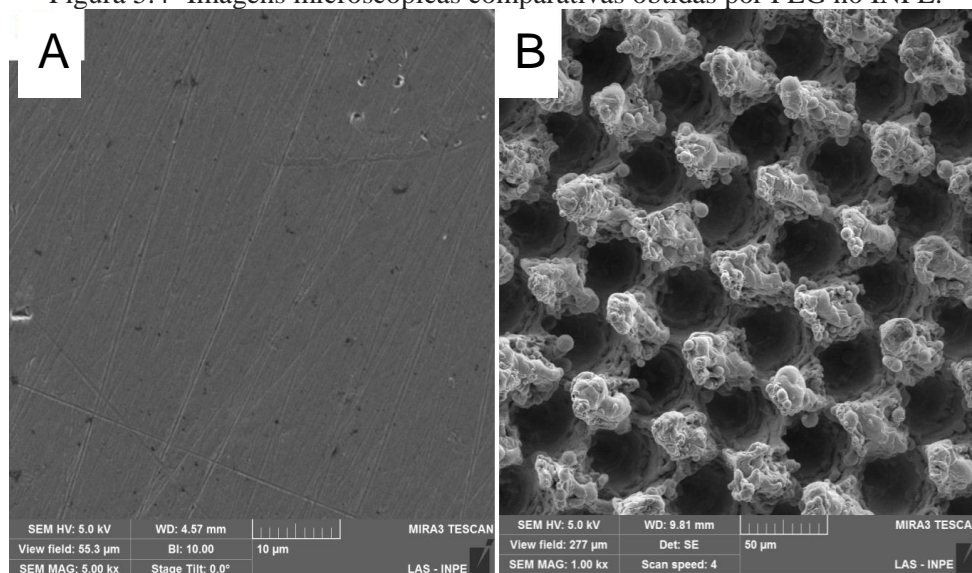
(A) texturização mais fina e (B) texturização mais grossa.
Fonte: Próprio autor.

A superfície A apresentou poros de diâmetro e igual profundidade, distribuídos de maneira homogênea e foi considerada Superfície de Teste (ST) por promover maior aprisionamento de ar nos vales entre platôs, essencial para promoção do efeito *Cassie-Baxter*; e também, característico do *scaffold*, por dispor de pontos de ancoragem com dimensões compatíveis com os constituintes do sangue e células endoteliais. Entende-se, portanto, que embora a rugosidade mostrada seja bem maior que a obtida nos dois

experimentos anteriores de preparação das superfícies a laser, no interior das “cavidades” que caracteriza a rugosidade maior, existem cavidades menores onde se observa uma segunda rugosidade bem menor, mas agora, com estruturas nanométricas e que pertencem à estrutura do material do substrato base, o titânio grau II.

O processo LIPSS da Empresa CVD Vale provou ser reproduzível e algumas amostras de teste super-hidrofóbico foram desenvolvidas com sucesso. Apenas para se ter uma compreensão melhor das diferenças de morfológicas entre uma superfície MR e ST, a Figura 5.4 mostra a superfície como preparada no princípio e após ser submetida ao processo LIPSS.

Figura 5.4- Imagens microscópicas comparativas obtidas por FEG no INPE.



(A) Material de Referência à 10 μm e (B) Superfície de Teste à 50 μm

Fonte: Próprio autor.

Observa-se na Figura 5.4, as rugosidades para as amostras MR e ST são muito diferentes, e justamente a partir desta diferença é que se estabeleceu, então, o principal parâmetro para dar continuidade aos estudos que se seguem neste trabalho que está relacionado com as características do laser utilizado e o processo desenvolvido propriamente dito. A partir deste ponto, estudou-se a deposição de DLC sobre as diferentes superfícies onde estuou-se a variação da energia de superfície, também, após o recobrimento com DLC. Mostra-se a seguir alguns resultados que melhor representam o estado da arte deste trabalho. O processo PECVD modificado com o sistema de confinamento de íons, como dito, foi o utilizado. Diferentes espessuras foram estudadas,

sobre as amostras ST, com deposição bem uniforme e controladas. A espessura de cada deposição foi controlada pelo tempo de deposição. A principal caracterização, que é a molhabilidade relacionada ao ângulo de contato está resumida na Tabela 5.2. As medidas, novamente, foram realizadas no *Labmat* do ITA e revelaram o efeito manipulador promovido através de mínima e máxima espessura do DLC, ou seja, da dependência com a espessura do filme de DLC, como era de se esperar.

Tabela 5.2- Medidas de ângulo de contato em ST com DLC em diferentes espessuras.

Espe ssura DLC (μm)	n°1	n°2	n°3	n°4	n°5	Média	Desvio Padrão
I 0,3	<u>149,0°</u>	<u>153,1°</u>	<u>146,9°</u>	<u>151,5°</u>	<u>151,4°</u>	150,4°	<u>2,4</u>
II 0,6	148,2°	151,1°	144,8°	150,3°	149,6°	148,8°	2,5
III 1,2	148,3°	146,6°	149,3°	151,9°	148,0°	148,8°	2,0
IV 2,4 μm	<u>82,4°</u>	<u>49,1°</u>	<u>25,7°</u>	<u>33,5°</u>	<u>44,8°</u>	47,1°	<u>21,8</u>

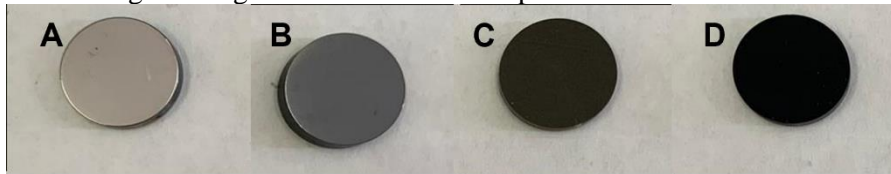
Fonte: Próprio autor.

Uma vez que as características dos filmes de DLC são conhecidas, pois tem sido bastante investigado pela equipe DIMARE do INPE, onde foram feitas, preliminarmente, medidas da dureza que ficou acima de 20 GPa, coeficiente de atrito em cerca de 0,08 e a aderência nas ligas de titânio, que ficou dentro do grau I e III da norma, que é bastante elevada. Desta forma, a análise do ângulo de contato foi fundamental para selecionar as duas Superfícies de Teste Derivadas I e IV, as quais foram submetidas às avaliações *in vitro* com sangue humano e *in vivo* em organismo animal. Como se observa, as medidas do ângulo de contato realizadas com água revelaram efeito de molhabilidade bem diferente entre as superfícies com a menor e maior espessura de revestimento DLC utilizados neste estudo, conforme descritas abaixo.

A superfície em titânio grau médico II, microtexturizada, e com 0,3 μm de espessura do revestimento de DLC (superfície I) apresentou efeito super-hidrofóbico com ângulo de contato médio superior a 150° e foi nomeada Superfície de Teste A, enquanto que a superfície IV com 2,4 μm de espessura de revestimento DLC apresentou efeito hidrofílico, com ângulo de contato médio inferior a 50° e foi nomeada Superfície de Teste B. A Figura 5.5 exibe o contraste de tonalidade entre as superfícies do Material de

Referência, Superfícies de Teste e suas derivadas com revestimento DLC de 2,4 μm e 0,3 μm de espessura.

Figura 5.5- Imagem fotográfica das diferentes superfícies destacando o contraste tonal.

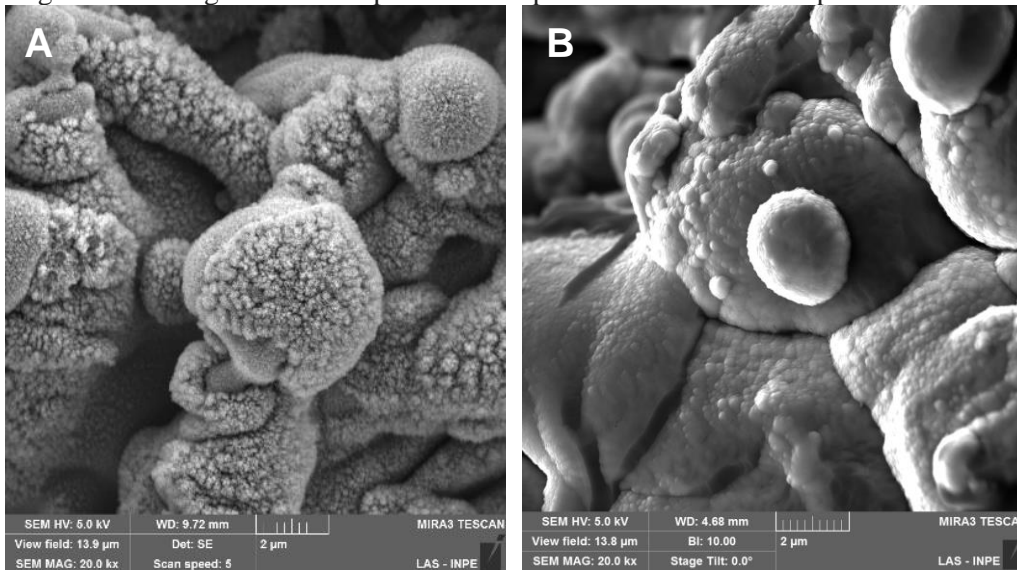


(A) Material de Referência; (B) Superfície de Teste; (C) Superfície de Teste A; (D) Superfície de Teste B.

Fonte: Próprio autor.

A presença de DLC nas ST derivadas foi confirmada a partir das análises MEV-FEG e através de análise de espectroscopia de espalhamento Raman. A Figura 5.6 mostra, para efeito de comparação da Superfície de Teste antes e depois de receber o revestimento DLC, em que a morfologia “*cauliflower*” se apresenta característico do DLC recobrendo a nanoestrutura formada pela ação do feixe laser. Esta estrutura “*cauliflower*” é relativamente diferente dependendo da espessura do filme de DLC. A Figura 5.7 mostra as bandas D, desordem da estrutura, e G que mostra a contribuição gráfica, típicas do modo vibracional característico da estrutura do DLC. Neste caso, pode-se concluir que o filme de DLC é de boa qualidade, visto que a posição das bandas D e G, bem como sua largura e posição confere bem com os resultados já publicados pela equipe DIMARE e pela equipe da empresa CVD Vale que desenvolveram o filme de DLC de melhor qualidade.

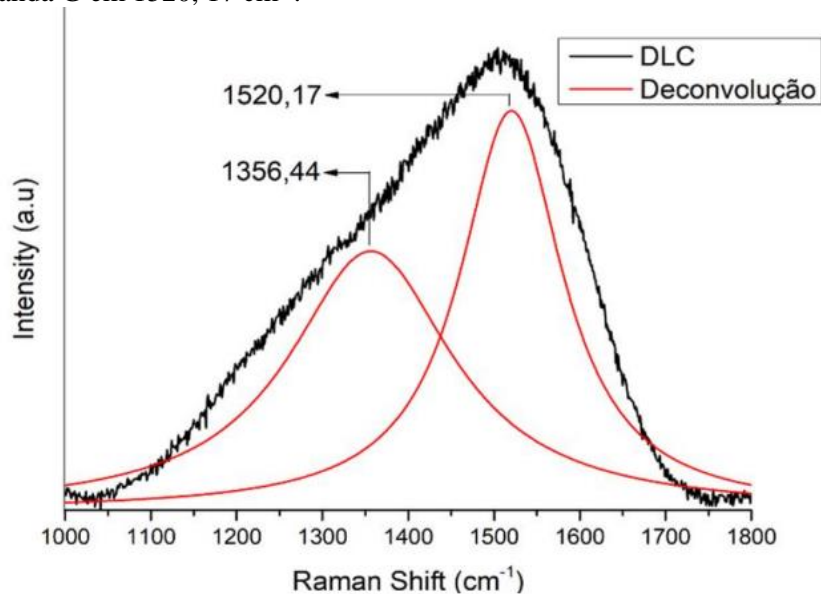
Figura 5.6 - Imagens microscópicas obtidas por FEG no INPE da Superfície de Teste.



(A) sem revestimento de DLC e (B) com DCL 0,3 μm.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.7 - Espectroscopia de espalhamento Raman de DLC. Banda D em 1356,44 cm⁻¹ e a banda G em 1520,17 cm⁻¹.



Fonte: Próprio autor.

O espectro característico mostrado na Figura 5.7, foi o que se observou para os filmes de DLC depositados em todas as condições deste trabalho, incluindo as diferentes espessuras estudadas.

Os resultados quantitativos da composição química obtidos por *Energy Dispersive X-Ray Detector* (EDX) nas diferentes regiões, vales e platôs, de cada superfície são

apresentados na Tabela 5.3. Esta análise mostra, de forma semiquantitativa, a transformação química resultante do processo LIPSS no MR, em que houve pouca diferença na concentração de óxidos nas regiões de vales formados em relação às regiões de platôs das Superfícies de Teste.

Tabela 5.3- Quantificação da composição química obtida por EDX-FEG no INPE das superfícies.

Material de Referência			
	% C	% Ti	% O
	----	99,7	0,1
Superfície de Teste			
	% C	% Ti	% O
platô	----	59,3	40,7
Vale	----	67,7	32,4
Superfície de Teste A			
	% C	% Ti	% O
platô	62,1	29,4	8,5
Vale	44,2	39,8	16,0
Superfície de Teste B			
	% C	% Ti	% O
platô	79,7	16,4	3,9
Vale	89,8	2,4	7,8

Fonte: Próprio autor.

A importância mais significativa desta análise, foi verificar que a quantidade de óxidos formados após o tratamento a laser ainda é relativamente grande, entretanto não interferiu no processo de aderência, uma vez que o material substrato é tratado com descarga em plasma de argônio antes do processo de crescimento do filme de DLC propriamente dito, proporcionando uma boa limpeza final e, naturalmente, a mitigação destes óxidos. Também, a quantidade de óxidos formados no vale e no platô não diferem muito, mesmo porque esses valores podem ser diferentes para diferentes energias do feixe.

Após o crescimento do filme de DLC, a análise apresentada pela Tabela 5.4 mostra a presença forte do filme de carbono, embora tenha sido usado feixe de baixa energia, a espessura do filme de DLC permite que sejam observadas camadas do material de substrato, e mostrando que à medida que o filme de DLC é mais espesso o material de substrato é menos observado.

Tabela 5.4. Diferença percentual da composição química nas Superfícies de Teste revestidas com DLC.

	Regiões	% C	% Ti	% O
Superfície de Teste	Platô	---	59,3	40,7
	Vale	---	67,7	32,4
Superfície de Teste A	Platô	62,1	< 29,9	< 32,2
	Vale	44,2	< 27,9	< 16,4
Superfície de Teste B	Platô	79,7	< 42,9	< 36,8
	Vale	89,8	< 65,3	< 24,7
DIFERENÇA entre STA x STB				
	Platô	< 17,6	13	4,6
	Vale	< 45,6	37,4	8,3

Fonte: Próprio autor.

Um outro parâmetro importante é a rugosidade, visto que este está diretamente relacionado com o ângulo de contato, ou seja, com a energia de superfície. A ferramenta *MeX* do MEV-FEG foi utilizada na identificação dos valores médios de rugosidade e revelou Ra 0,234µm para Material de Referência, Ra 10 µm para ST e Ra 9 µm para as amostras ST A e ST B. O diâmetro dimensional dos “poros”, de 50 µm, apresentou, em média, igual profundidade dos vales.

A Tabela 5.5 apresenta os valores de ângulo de contato obtidos nas avaliações de molhabilidade utilizando água; embora a diferença na concentração química entre as ST e STA sejam altamente relevantes, a concentração do gás oxigênio presente nos vales impediu o espalhamento dos elementos constituintes da água de forma aproximada.

Tabela 5.5. Medidas do ângulo de contato durante análise de molhabilidade com água.

	nº 1	nº 2	nº 3	nº 4	nº 5	Média	Desvio Padrão
Material de Referência	70,3°	69,5°	71,3°	70,8°	67,9°	70,3	1,18°
Superfície de Teste	131,5°	137,8°	127,6°	117,1°	91,5°	127,6	16,3°
Superfície de Teste A	149,5°	153,1°	151,5°	151,4°	150,3°	151,4	1,2°
Superfície de Teste B	82,4°	49,1°	33,5°	44,8°	25,7°	44,8	19,5°

Fonte: Próprio autor.

Esta avaliação foi fundamental para mostrar a reprodutibilidade dos processos de modificação aplicados no desenvolvimento destas superfícies e permitiu dar

continuidade às etapas seguintes, as quais puderam validar a biofuncionalização atribuída às superfícies através de avaliações utilizando material biológico *in natura* e em condições *in vivo*.

A Tabela 5.6 apresenta os valores individuais, médios e de desvio padrão obtidos na análise de molhabilidade utilizando sangue humano, no qual foi considerado um intervalo de cinco minutos para avaliar a estabilidade da gota sobre a superfície em função do tempo.

Tabela 5.6. Medidas do ângulo de contato durante análise de molhabilidade com sangue.

	n°1		n°2		n°3		Média		Desvio Padrão	
	t ₀	+5 min.	t ₀	+5 min.	t ₀	+5 min.	t ₀	+5 min.	t ₀	+5 min.
MR	69,2°	70°	74°	74°	70,2°	71 °	70,2°	71°	2,06°	1,7°
ST	123,1°	180°	160°	110,2°	180°	180°	160°	180°	25,6°	32,9°
STA	170,4°	170,2°	146,9°	146,9°	144,5°	118,8°	157,5°	146,9°	13,0°	21,0°
STB	95,1°	74,8°	61,2°	50,1°	43,1°	31,7°	69,1°	50°	26°	17,7°

Fonte: Próprio autor.

As medidas do ângulo de contato observadas no Material de Referência revelaram que a interação da gota de sangue permaneceu hidrofílica e estável em função do tempo. Na Superfície de Teste, o ângulo de contato ultrapassou 150°, mas com desvio padrão acima do esperado. A análise com a STA revelou ligeira instabilidade do efeito superplasmafóbico em função do tempo e por fim, a STB comprovou o efeito superplasmafílico com diminuição considerável do ângulo de contato.

A Tabela 5.7 foi elaborada para avaliar de forma comparativa os valores de molhabilidade observados utilizando água e sangue humano, assim como a diferença do ângulo de contato do sangue após o período proposto. Vale lembrar que a avaliação com água foi refeita utilizando o mesmo equipamento de goniometria e, portanto, os valores do ângulo de contato são aproximados comparado aos resultados obtidos utilizando o equipamento do ITA.

Tabela 5.7. Análise comparativa das medidas do ângulo de contato obtidas em análise molhabilidade na UNIVAP utilizando água e sangue humano.

	ÂNGULO DE CONTATO			DIFERENÇADO ÂNGULO DE CONTATO	
	Água	Sangue	Sangue após 5 min.	Após 5 min.	Água x Sangue
Material de Referência	70,0°	71,1°	71,7°	0,6°	1,2°
Superfície de Teste	121,1°	154,4°	156,7°	2,3°	33,3°
Superfície de Teste A	151,0°	154,0°	145,3°	8,7°	3,0°
Superfície de Teste B	52,4°	66,5°	52,2°	< 14,3°	14,1°

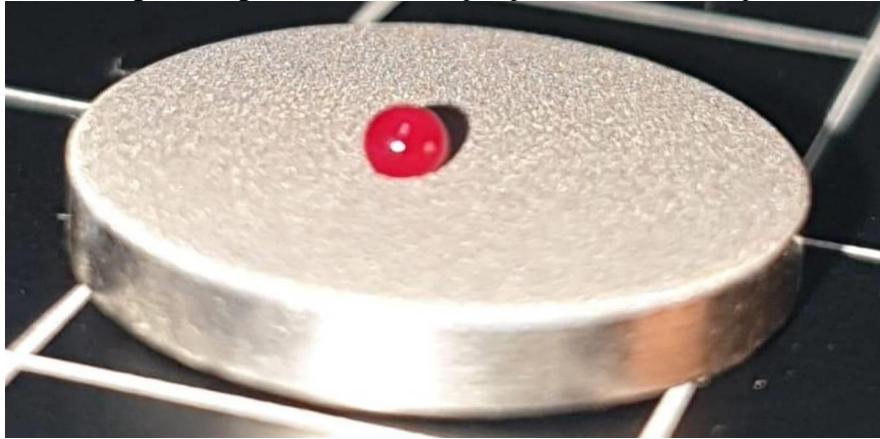
Fonte: Próprio autor.

O perfil de molhabilidade da água observado na superfície MR foi o mesmo obtido com sangue humano, ambos apresentaram ângulo de contato aproximando de 70° com mínima instabilidade em função do tempo. A diferença do ângulo de contato formado pela água sobre a ST foi de 61prox.. 30° maior ao observado com sangue, ou seja, o efeito de molhabilidade se transformou de hidrofóbico para super-hemofóbico com instabilidade irrelevante.

As medidas de ângulo de contato observadas na STA foram relativamente iguais com as duas soluções utilizadas; já a estabilidade da gota de sangue se mostrou menor comparado ao visto com a ST. Por fim, tanto a diferença do ângulo de contato formado pela água e pelo sangue na STB, quanto a estabilidade em função do tempo foram consideráveis por ultrapassarem 10°.

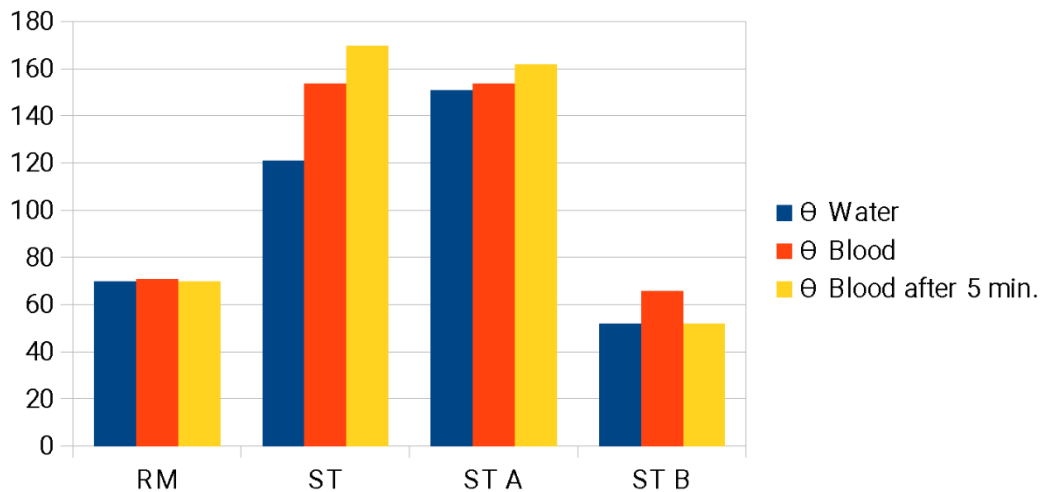
A Figura 5.8 exhibe o efeito super-plasmafóbico observado entre a ST e a gota de sangue humano. Logo abaixo, na Figura 5.9, uma representação gráfica desta análise compara os efeitos de molhabilidade entre a água e o sangue humano nas diferentes superfícies.

Figura 5.8- Imagem fotográfica do efeito super-plasmafóbico na Superfície de Teste.



Fonte: Próprio autor.

Figura 5.9 – Representação gráfica da análise comparativa das medidas do ângulo de contato entre água e o sangue humano.



Fonte: Próprio autor.

Comprovada a reprodutibilidade dos processos de fabricação e também dos efeitos de molhabilidade atribuído às superfícies, as técnicas foram transferidas para implantes. As especificações técnicas destes implantes são apresentadas na Tabela 5.8 e esclarecem as principais diferenças entre as superfícies biofuncionais dos implantes desenvolvidos e submetidas à avaliação *in vivo*.

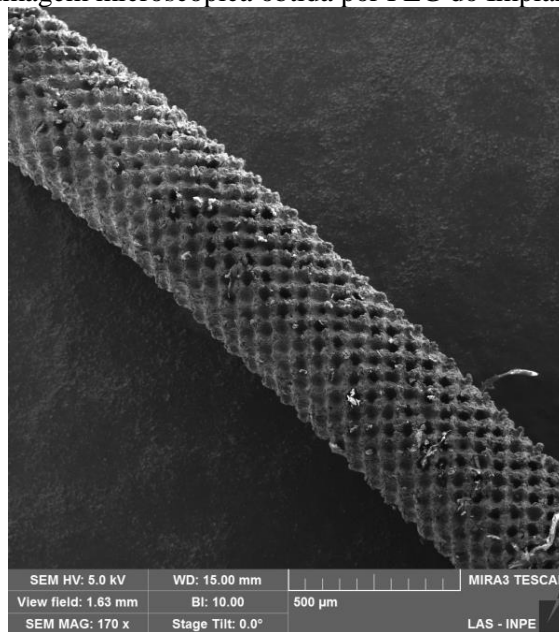
Tabela 5.8 - Especificações técnicas dos implantes desenvolvidos como superfícies biofuncionais.

	Tecnologia de Modificação	Perfil Micrográfico	Rugosidade (μm)	Composição Química (%)	Ângulo de Contato (Sangue)
Material de Referência	Polimento	Liso e homogêneo	0,25	99 TiO ₂	70° Plasmafílico
Superfície de Teste	Laser Nanosegundos	Microtexturizado e homogêneo com poros $\varnothing 50\mu\text{m}$	10	63,5 Ti 36,55 O	Θ 150° Super-plasmafóbico
Superfície de Teste A	Laser Nanosegundos + PECVD-DLC	Microtexturizado e homogêneo com poros $\varnothing 50 \mu\text{m} +$ revestimento DLC 0,3 μm	10	34,6 Ti 12,3 O 53,1 C	Θ 150° Super-plasmafóbico
Superfície de Teste B	Laser Nanosegundos + PECVD-DLC	Microtexturizado e homogêneo com poros $\varnothing 50 \mu\text{m} +$ revestimento DLC 2,4 μm	9	9,4 Ti 5,85 O 84,77 C	Θ 65° Plasmafílico

Fonte: Próprio autor.

A fabricação dos implantes em fio de titânio grau médico II com diâmetro de 0,4 mm foi considerada crítica por conta de sua dimensão reduzida, mas todas as etapas do processo de modificação de superfície foram bem desenvolvidas na CVD Vale e concluídas com sucesso. A microtextura pode ser reproduzida conforme as características do laser utilizado e atribuiu poros de diâmetro e igual profundidade distribuídos de maneira homogênea; a Figura 5.10 exibe o implante desenvolvido, tanto a microtextura como o revestimento se apresentam de forma regular como esperado.

Figura 5.10- Imagem microscópica obtida por FEG do Implante Superfície de Teste.

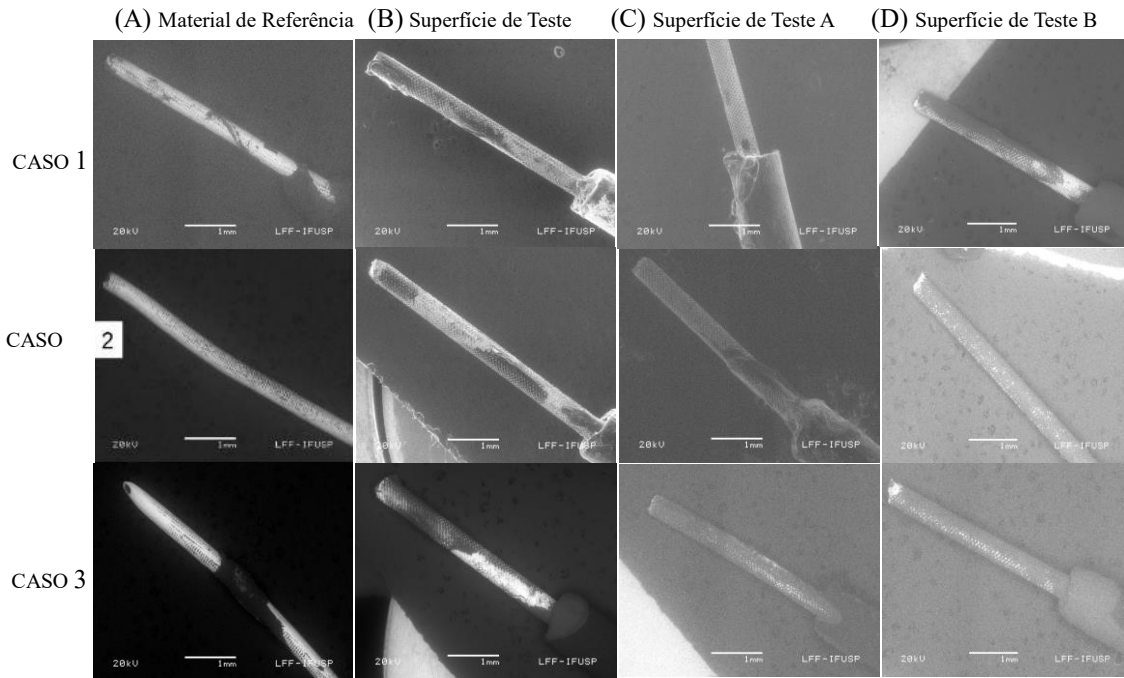


Fonte: Próprio autor.

A técnica cirúrgica e demais configurações dispostas no protocolo de avaliação *in vivo* foram efetivadas e bem-sucedidas, pois permitiram a colocação e fixação dos implantes sem provocar hemorragia e promoveram o bem-estar dos animais no pós-operatório. Os animais permanecem em observação e se recuperaram rapidamente, demonstrando ganho de peso com o passar do tempo, hábitos e condições saudáveis. Não houve registro de invalidez, infecção, *stress*, caso de trombose ou qualquer tipo de intercorrência que interferisse no bem-estar dos animais e conseqüentemente, nos resultados de avaliação *in vivo*.

Ao final do período proposto, doze semanas, o explante foi realizado e cada implante foi imerso em soro fisiológico e encaminhado imediatamente ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo, onde as análises investigativas realizadas por MEV de baixo vácuo revelaram resultados preliminares da interação hemodinâmica de forma qualitativa. A Figura 5.11 exhibe as imagens obtidas em MEV com os detectores de elétrons com 1 mm de resolução, em que as regiões contidas de material biológico puderam ser detectadas melhor devido aos diferentes contrastes entre os elementos químicos e a Figura 5.12 exhibe estas imagens obtidas com 100 µm de resolução.

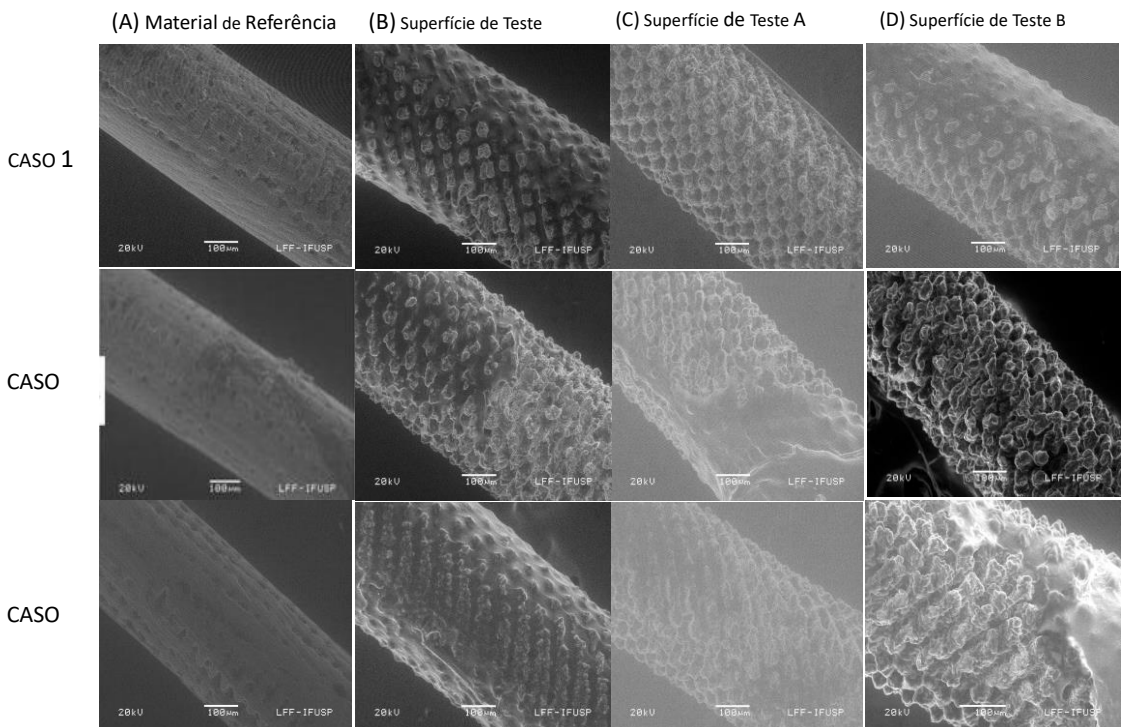
Figura 5.11- Imagens micrográficas obtidas por MEV dos implantes pós-avaliação *in vivo*.



(A) Grupo MR, (B) Grupo ST, (C) Grupo STA e (D) Grupo STB.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.12- Imagens micrográficas obtidas por MEV dos implantes pós-avaliação *in vivo*.



(A) Grupo MR, (B) Grupo ST, (C) Grupo STA e (D) Grupo STB.

Fonte: Próprio autor.

Como análise complementar e não menos importante, a Tabela 5.9 concentra os valores quantitativos da composição química obtidos por EDX durante as análises em MEV em baixa energia com cada implante depois da avaliação *in vivo*. Como o metabolismo, dinâmica bioquímica e fisiológica difere de um organismo para outro, os resultados obtidos em um mesmo grupo variaram um pouco para cada animal; portanto, valores individuais, média e desvio padrão foram gerados e observados com cautela.

Tabela 5.9- Resultados semiquantitativos da composição química obtidos por EDX-MEV.

MATERIAL DE REFERÊNCIA					
<i>% atm.</i>	<i>Caso 1</i>	<i>Caso 2</i>	<i>Caso 3</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Ti</i>	13,1	9	13	11,7	2,3
<i>O</i>	6	7,5	5,1	6,2	1,2
<i>C</i>	72	70	78	73,3	4,2
<i>N</i>	9	13,5	3,5	8,7	5
<i>outros</i>	0	0	0,4	0,1	0,2
SUPERFÍCIE DE TESTE					
<i>% atm.</i>	<i>Caso 1</i>	<i>Caso 2</i>	<i>Caso 3</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Ti</i>	5,7	6,7	4,5	5,6	1,1
<i>O</i>	9,4	10	9	9,5	0,5
<i>C</i>	83,3	82	85,2	83,5	1,6
<i>N</i>	0	0	0	0	0
<i>outros</i>	1,6	1,3	1,3	1,4	0,2
SUPERFÍCIE DE TESTE A					
<i>% atm.</i>	<i>Caso 1</i>	<i>Caso 2</i>	<i>Caso 3</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Ti</i>	3	0,2	2,2	1,8	1,4
<i>O</i>	5,1	6,9	5,3	6	1
<i>C</i>	90	92	91	91	1
<i>N</i>	0	0	0	0	0
<i>outros</i>	2	0,9	1,5	1,5	0,6
SUPERFÍCIE DE TESTE B					
<i>% atm.</i>	<i>Caso 1</i>	<i>Caso 2</i>	<i>Caso 3</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
<i>Ti</i>	0,26	0,4	0,4	0,35	0,1
<i>O</i>	9	3	3,1	5	3,4
<i>C</i>	90	96	86,5	91	5
<i>N</i>	0	0	9,4	3,1	5,4
<i>outros</i>	0,74	0,6	0,7	1	0

Fonte: Próprio autor.

Como resultados de interação para o grupo MR, os valores substanciais permaneceram estáveis; o implante do terceiro animal apresentou maior concentração atômica de carbono comparado aos outros dois animais, com maior desvio padrão para o nitrogênio.

Os implantes ST e STA também apresentaram estabilidade nos resultados com baixos valores de desvio padrão; entretanto, a porcentagem atômica de carbono foi a mesma entre a STA e STB, com maior desvio padrão com o implante STB. O nitrogênio foi detectado apenas nos implantes MR, com exceção do terceiro caso do grupo STB. Tabela 5.10 compara a quantificação química de cada grupo de implantes e exibe a diferença antes e pós-avaliação *in vivo*.

Tabela 5.10- Resultados de análise comparativa da quantificação química antes e pós-avaliação *in vivo*.

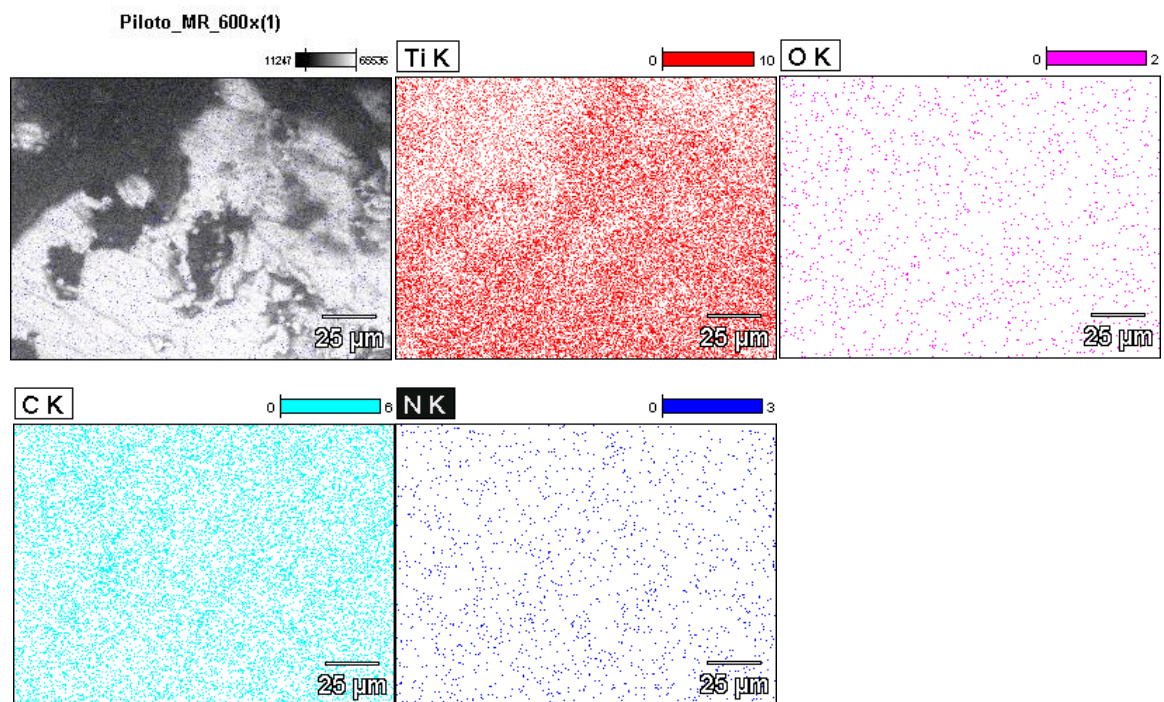
MATERIAL DE REFERÊNCIA			
% atm.	Antes <i>In vivo</i>	Pós-<i>In vivo</i>	Diferença
<i>Ti</i>	99,7	11,7	< 88
<i>O</i>	0,1	6,2	6,1
<i>C</i>	0	73,3	73,3
<i>N</i>	0	8,7	8,7
<i>outros</i>	0	0,1	0,1
SUPERFÍCIE DE TESTE			
% atm.	Antes <i>In vivo</i>	Pós-<i>In vivo</i>	Diferença
<i>Ti</i>	63,5	5,6	< 30,6
<i>O</i>	36,6	9,5	< 27,1
<i>C</i>	0	83,5	83,5
<i>N</i>	0	0	0
<i>outros</i>	0	1,4	1,4
SUPERFÍCIE DE TESTE A			
% atm.	Antes <i>In vivo</i>	Pós-<i>In vivo</i>	Diferença
<i>Ti</i>	34,6	1,8	< 32,8
<i>O</i>	12,3	6	< 6,3
<i>C</i>	53,1	91	37,9
<i>N</i>	0	0	0
<i>outros</i>	0	1,5	1,5
SUPERFÍCIE DE TESTE B			
% atm.	Antes <i>In vivo</i>	Pós-<i>In vivo</i>	Diferença
<i>Ti</i>	9,4	0,35	< 9,1
<i>O</i>	5,9	5	0,9
<i>C</i>	84,8	91	6,2
<i>N</i>	0	3,1	3,1
<i>outros</i>	0	1	1

Fonte: Próprio autor.

O primeiro grupo de implantes Material de Referência apresentou aumento na concentração atômica de carbono de aproximadamente 70%, o que indica a predominância de material biológico; entretanto, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura não evidenciaram nada do gênero nas regiões que permaneceram em contato com o fluxo sanguíneo, apenas no implante do terceiro

animal que houve formação de *pannus* em regiões levemente angulada e que provavelmente deve ter permanecido em contato com a parede interna da aorta abdominal. A Figura 5.13 exibe as imagens obtidas por MEV da superfície MR do caso 1 durante análises EDX, em cada tonificação representa um dos elementos químicos constituintes da mesma região analisada e assim permite avaliar melhor os valores apresentados na Tabela 5.8. A Figura 5.14 apresenta o gráfico EDX obtido nesta análise durante a extração dos dados apresentados.

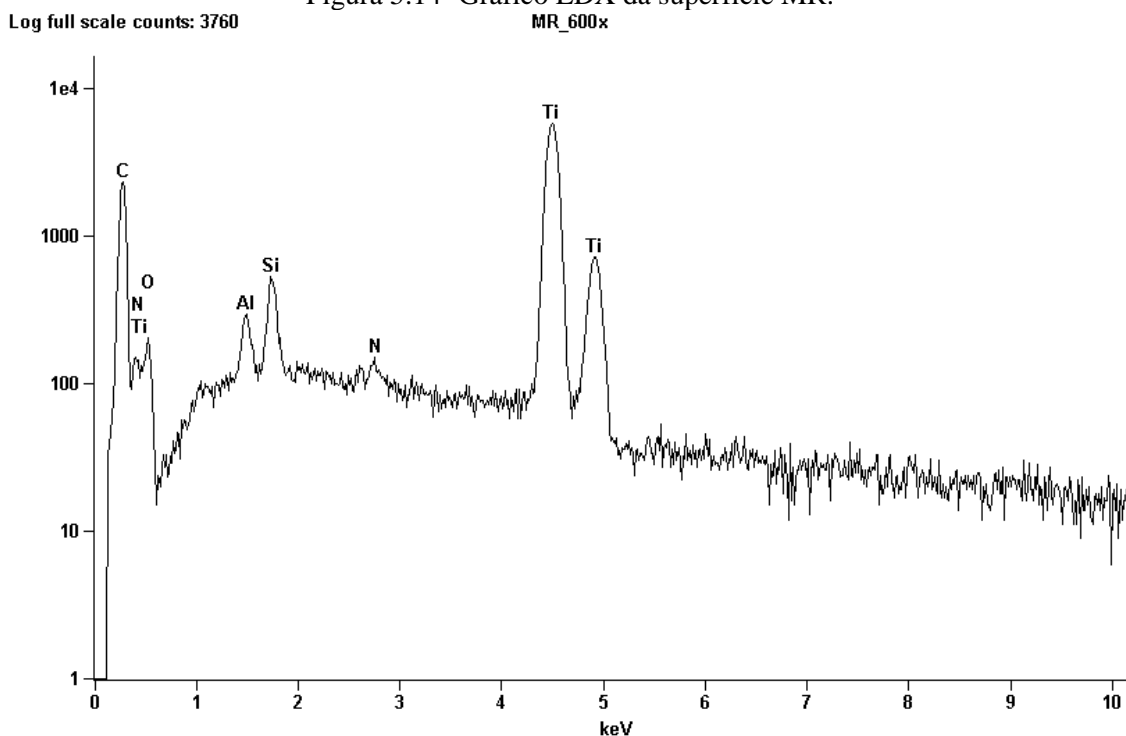
Figura 5.13- Imagens microscópicas obtidas por MEV durante análise EDX da superfície MR/caso 1.



Superfície do MR em diferentes tonificações conforme elementos constituintes: vermelho para titânio, rosa para oxigênio, verde para carbono e azul para nitrogênio.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.14- Gráfico EDX da superfície MR.



Fonte: Próprio autor.

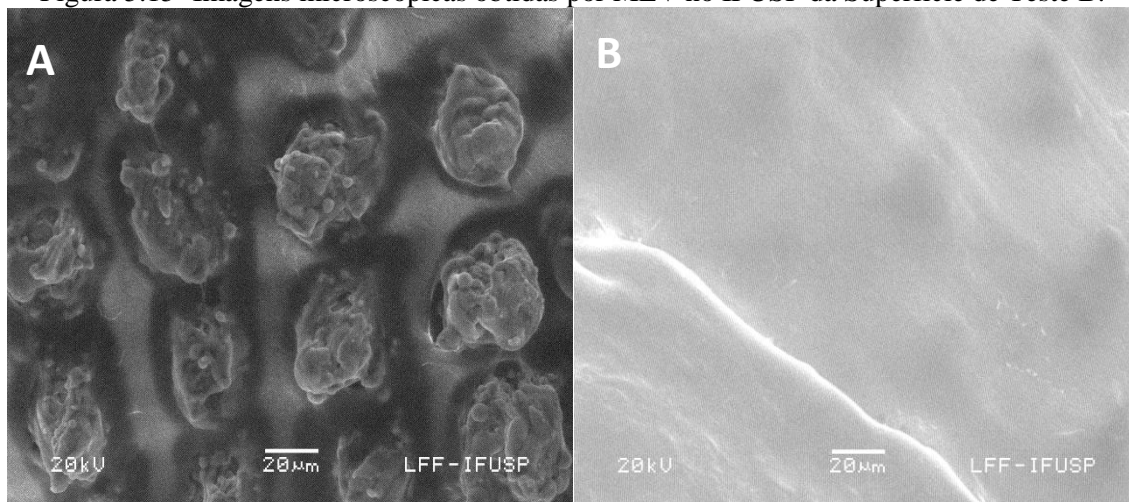
No segundo grupo de animais, implantados com Superfície de Teste, o carbono predominou em mais de 80% e as imagens revelaram a presença de revestimento não homogêneo e aleatório em grande parte da área superficial; este evento foi compatível com o descrito por Menconi, Zapanta e equipe: alta variação no número de “ilhas brancas de formato irregular” com \varnothing 0,1 a 3,0 cm em regiões “aleatórias” e sem relação com o campo de fluxo.

No implante Superfície de Teste A, o aumento de carbono foi de aproximadamente 40%, metade do observado com a Superfície de Teste, entretanto, também não houve revestimento visível, exceto no explante do segundo animal deste grupo, no qual foi registrado uma única e pequena porção de “ilha branca de formato irregular”.

De acordo com os resultados de quantificação química, os implantes Superfície de Teste B foram os que apresentaram menor alteração depois de permanecerem em fluxo sanguíneo arterial, mas com maiores valores de desvio padrão. No implante extraído do caso 1 deste grupo, duas diferentes regiões foram avaliadas por EDX no MEV do IFUSP para estimar a diferença porcentual da concentração atômica dos elementos ali

presente e seguem apresentadas pela Figura 5.15 e pela Tabela 5.11, sendo a A) parcialmente coberta com material biológico e a B) totalmente coberta.

Figura 5.15- Imagens microscópicas obtidas por MEV no IFUSP da Superfície de Teste B.



(A) STB parcialmente revestida com material biológico e (B) STB totalmente revestida com material biológico.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 5.11- Comparação das concentrações atômicas registradas nas diferentes regiões da STB.

<i>% atm.</i>	<i>Região A</i>	<i>Região B</i>	<i>Diferença</i>
<i>Ti</i>	5,2	0,3	< 4,9
<i>O</i>	9,1	9	0,1
<i>C</i>	85	90	< 5
<i>N</i>	0	0	0
<i>outros</i>	0,7	0,7	0

Fonte: Próprio autor.

6. CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

O método desenvolvido para biofuncionalizar titânio como superfície aplicada ao sangue, constituinte de Dispositivos de Assistência Ventricular, demonstrou ter conteúdo científico e que foi explorado, demonstrando ter boa precisão e boa reprodutibilidade, mesmo quando aplicado em peças com dimensões reduzidas, como foi no caso dos implantes em fio de titânio de \varnothing 0,4 mm. Agora, a aplicação em produtos acabados de geometria complexa e em escala industrial requer estudos de viabilidade, alterações no projeto de peças, mas com pouca alteração no processo, podendo avançar para novos métodos de avaliação e estudos clínicos avançados que comprovem a padronização dos processos conforme requisitos do projeto e a efetivação da ação biofuncional atribuída à superfície.

A escolha da tecnologia de processamento Laser nanosegundos, a qual atribuiu dimensão micrométrica à superfície, foi essencial para alcançar os objetivos deste trabalho; os “poros” bem uniformes, de dimensão micrométrica e distribuídos de forma homogênea foram capazes de aprisionar porções de ar suficiente para promover efeito *Cassie-Baxter* como observado nas avaliações de molhabilidade com água e sangue. Isto porque a microestrutura estava, também, em seu interior com rugosidade nanométrica. Esta mesma estrutura de superfície micro e nanométrica também promoveu o efeito inverso, plasmafílico, quando revestida com *Diamond-Like-Carbon* mais espesso e melhorou a estabilidade do efeito plasmafóbico quando recebeu o revestimento DLC em maior espessura, a STB.

Os resultados de avaliação *in vivo* demonstraram que todas as superfícies modificadas, seja ela com e sem o revestimento DLC, não geraram o efeito de hemólise, destruição das células hematológicas por ação mecânica, uma vez que nenhum animal apresentou quadro de insuficiência renal. Este estudo não utilizou heparina como anticoagulante, então houve depósito de material biológico na superfície Material de Referência, mesmo sendo considerado inerte e sem condições físicas propícias para promover ancoramento celular; fato que não garantiu a característica tromboresistente e conseqüentemente induziu aos animais deste grupo a condição de risco eminente, uma vez que a camada biológica formada poderia ter se desprendido durante o período de avaliação.

A microestrutura da Superfície de Teste foi a que mais promoveu o processo de endotelização, ainda que de forma preliminar, os resultados de interação *in vivo* comprovaram a formação de uma camada pseudoneoíntima nestas superfícies até então de efeito superplasmafóbicas com maior efetividade e pelo fato de nenhum animal ter apresentado quadro de trombose ou embolia, pode-se dizer que não houve desprendimento do revestimento biológico formado, ou seja, obteve-se um revestimento trombo resistente, ainda que heterogêneo.

A pseudoneoíntima que se desenvolveu no Material de Referência e na Superfície de Teste foi compatível com o relatado em estudos relacionados: uma microestrutura laminada, fina e transparente composta por colágeno e fibrina; sendo considerado “microtrombo” o revestimento em estágio inicial, infiltrado na superfície implantada composto por eritrócitos, macrófagos, plaquetas, fibrina e fibroblastos. Esse aglomerado de hemácias e demais constituintes do sangue arterial se transformou gradativamente em um revestimento neoíntimo, fibrótica e trombo resistente; o qual apresenta concentração mínima de células inflamatórias e atende à proposta de minimizar as respostas indesejáveis de interação.

O revestimento DLC característico da Superfície de Teste A promoveu o depósito de material biológico, porém em menor intensidade; o efeito plasmafóbico reduziu a deposição de material biológico, mas não demonstrou ser suficiente para impedir que os efeitos imediatos de interação ocorram. As análises EDX demonstraram predominância na porcentagem atômica de carbono pós-interação *in vivo*, antes constituída de dióxido de titânio; portanto, o revestimento DLC em mínima espessura se mostrou de grande importância para casos em que deseja-se a formação de uma camada neoíntima e trombo resistente através de redução gradual de heparina.

Os resultados analíticos obtidos com os implantes Superfície de Teste B pós-avaliação *in vivo*, demonstraram que o revestimento DLC inibe a adesão e proliferação de material biológico ainda que sejam de perfil hidrofílico por também ser composto de carbono em maior concentração.

Conclui-se então que a superfície do titânio foi potencialmente melhorada com a introdução das microestruturas, mas e principalmente, pelo revestimento DLC; o qual atribuiu baixo coeficiente de atrito, aumento da resistência ao desgaste e consequente

alta durabilidade ao efeito biofuncional das superfícies. A alta adesão do filme DLC ao titânio microtexturizado melhora as propriedades mecânicas da superfície, aumentando o limiar de trinca, e também de todo sistema circulatório mecânico por permitir o escoamento de fluxo por muito tempo sem alterações das propriedades hemorreológicas e de seu desempenho hemodinâmico.

Ambas as hipóteses propostas neste trabalho podem minimizar as interações indesejáveis com sangue; conforme a atuação dinâmica de cada componente de um Dispositivo de Assistência Ventricular adota-se o tipo de biofuncionalização ideal para a superfície, por exemplo: para o rotor indica-se uma superfície plasmafóbica pelo fato deste componente permanecer em constante e alta rotação, aproximadamente dois mil rotações por minuto; já para a região interna da bomba de sangue, indica-se uma superfície plasmafílica para que haja o processo de endotelização e conseqüente redução gradual da administração de heparina como anticoagulante. Vale ressaltar que esta definição do produto deve contar com o apoio da equipe médica cirúrgica para que a técnica de assistência circulatória seja melhorada pela função biofuncional das superfícies de contato com o sangue.

Este estudo indicou que superfícies com características da ST A promovem a formação de uma camada neoíntima tromboresistente assim como oferecido pela ST, porém a estabilidade hemocompatível do DLC minimiza a ativação plaquetária e nova formação de trombos caso haja o desprendimento da neoíntima formada na superfície durante o “desmame” da heparina, dando chance ao novo ancoramento celular saudável e melhor aderido. Este é o ponto crítico no desenvolvimento deste projeto, pois a porção de material biológico desprendida deverá ser diluída no fluxo sanguíneo ao longo de seu percurso sem causar complicações de qualquer natureza ao organismo e ao desempenho do implante.

Através da introdução de superfícies características da ST B espera-se promover redução imediata da heparina e melhora significativamente de casos de hemorragias e outras disfunções originárias das condições adaptativas do sistema cardiovascular durante o desempenho da assistência circulatória mecânica.

A quantidade de tecido biológico detectada neste estudo foi muito pequena para prosseguir com a análise tecidual, portanto esta pesquisa poderá ser continuada com a

introdução da tecnologia desenvolvida para biofuncionalizar superfícies de Dispositivos de Assistência Ventricular totalmente implantáveis, de forma capaz de garantir com segurança a análise estatística dos efeitos de interação resultantes.

Para trabalhos futuros, acredita-se que esta deixa boas sugestões de continuidade. Será considerado em primeiro lugar, a realização de estudos futuros e avançados que validem a durabilidade das propriedades biofuncionais atribuídas às superfícies pelo método desenvolvido e apresentado neste trabalho. Logo, estudos serão realizados através da introdução de superfícies microestruturadas e nanoestruturadas de diferentes rugosidades e de diferentes formas de preparação e diferentes espessuras de DLC em Dispositivos de Assistência Ventricular para controlar a taxa de deposição de material biológico proveniente do sangue circulante arterial e desta forma induzir a redução de heparina conforme a necessidade clínica do paciente.

A deposição de DLC em multicamadas dispõe filmes mais espessos, suficiente para ser submetido a um processo de modificação de superfície como substrato; assim duas novas superfícies também serão apresentadas em trabalhos futuros: DLC como substrato liso e homogêneo crescido em superfície de rugosidade baixa e este mesmo microestruturado através da interação de feixe laser com duração de pulsos variáveis desde nano segundos até femtosegundos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURAYA, J.H. **Modificação superficial de titânio para promoção de osteointegração**. 2011. 84 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-29092011-170342/publico/Aburaya.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2023.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Diretoria Colegiada (RDC). **Resolução-RDC Nº 96, de 17 de dezembro de 2008**. Dispõe sobre a propaganda, publicidade, informação e outras práticas cujo objetivo seja a divulgação ou promoção comercial de medicamentos. 2008. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/rdc0096_17_12_2008.html. Acesso em: 22 maio 2021.
- AIRD, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium, structure, function and mechanisms. **Circulation Research**, v. 100, n. 2, p. 158-173, 2007. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.res.0000255691.76142.4a>. Acesso em: 28 jun. 2023.
- ALANAZI, A. et al. Improved blood compatibility of DLC coated polymeric material. **ASAIO Journal**, v. 46, n. 4, p. 440-443, 2000. Disponível em: https://journals.lww.com/asaiojournal/fulltext/2000/07000/improved_blood_compatibility_of_dlc_coated.14.aspx. Acesso em: 28 jun. 2023.
- AVEZUM, A.; MAIA, L. N.; NAKAZONE, M. Cenário das doenças cardiovasculares no mundo moderno. In: TIMERMAN, A.; BERTOLAMI, M.; FERREIRA, J.F. M. (Ed.). **Manual de cardiologia**. São Paulo: Atheneu, 2012. p.1-5.
- AMERICAN HEART ASSOCIATION. **Cardiac implantable electronic device (CIED): infection summit**. 2022. Disponível em: https://www.heart.org/-/media/Files/Professional/Quality-Improvement/National-CIED-Infection-Initiative/AHA_CIED_Report_FINAL.pdf. Acesso em 28 abr. 2023.
- ANDRADE, A. et al. Improvement on the auxiliary total artificial heart (ATAH) left chamber design. **Artificial Organs**, v. 27, n. 5, p. 452-456, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1525-1594.2003.07236.x> Acesso em: 12 ago. 2023.
- ANDRADE, A.J. P.; UTIYAMA, B. Latin American Society for artificial organs, biomaterials, and tissue engineering: update 2020. **Artificial Organs**, v. 44, n.8, p. 771-772, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/aor.13767>. Acesso em: 12 ago. 2023.

ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 25, n. 1, p. 49-51, jan. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abcd/a/hknPvk8CskwMvXf8PR4kghR/?lang=en#>. Acesso em: 12 ago. 2022.

AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE (ANSI). **ASTM F67-13**: standard specification for unalloyed titanium, for surgical implant applications (UNS R50250, UNS R50400, UNS R50550, UNS R50700). Washington, 2017.

AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE (ANSI). **ASTM E112**: standard test methods for determining average grain size. Washington, 2013. 27 p. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/7586101/mod_resource/content/2/E112-12.23606.pdf. Acesso em: 11 maio. 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO 10993 – 1. Avaliação biológica de dispositivos médicos: avaliação e ensaios dentro de um processo de gerenciamento de risco**. Rio de Janeiro: ABNT, 2022. 48 p. Disponível em: https://saturno.crea-rs.org.br/pop/profissional/ABNT_NBR_ISO_10993_1_2022.pdf. Acesso em: 10 jun. 2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO 10993 – 2. Avaliação biológica de dispositivos médicos: requisitos de bem-estar animal**. Rio de Janeiro: ABNT, 2021. 17 p. Disponível em: https://saturno.crea-rs.org.br/pop/profissional/ABNT_NBR_ISO_10993_2_2021.pdf. Acesso em: 10 jun. 2023.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO 10993 – 12. Avaliação biológica de produtos para a saúde: preparação de amostras e materiais de referência**. Rio de Janeiro: ABNT, 2016. 23 p. Disponível em: https://saturno.crea-rs.org.br/pop/profissional/ABNT_NBR_ISO_10993_12_2016.pdf. Acesso em: 10 jun. 2023.

AZEVEDO, C. R. F. Microestrutura do titânio e suas ligas para implantes cirúrgicos. **Metalurgia e Materiais**, p. 445-447, jul. 2003. Disponível em: <http://pmt.usp.br/LCMHC/textos/ABM%20-%20tit%C3%A2nio.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2023.

BELL, T. Surface engineering: past, present and future. **Surface Engineering**, v. 6, n. 1, p. 31-40, 1990. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1179/sur.1990.6.1.31>. Acesso em: 12 jun. 2023.

BOCK, E. et al. New centrifugal blood pump with dual impeller and double pivot bearing system: Wear evaluation in bearing system, performance tests, and preliminary hemolysis tests. **Artificial Organs**, v. 32, n. 4, p. 329-333, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18370949/>. Acesso em: 12 jun. 2023.

- BOCK, E. et al. Laser-Treated surfaces for VADs: from inert titanium to potential biofunctional materials. **BME Frontiers**, v. 2022, p. 1-8, 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10521651/>. Acesso em: 13 jun. 2023.
- BRÅNEMARK, P-I.; ZARB, GA.; ALBREKTSSON, T. **Tissue integrated prosthesis**. Chicago: Quintessence, 1985. 350 p.
- BRUNSKI, J.B.; PULEO, D. A.; NANCI, A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. **International Journal of Oral Maxillofacial Implants**, v. 15, n. 1, p. 15-46, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10697938/>. Acesso em: 14 jun. 2023.
- CALLISTER JUNIOR. W. D. **Materials science and engineering: an introduction**. 4.ed. Estados Unidos: John Wiley and Sons, 1997. 992 p.
- CAPOTE, A. et al. Effect of low-pressure deposition on the mechanical and tribological properties of a-C:H films deposited via modified pulsed-DC PECVD with active screen as an additional cathode. **Surface & Coatings Technology**, v. 445, e128716, 2022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0257897222006375?via%3Dihub>. Acesso em: 14 jun. 2023.
- CORONEL-MENESES, D. et al. Strategies for surface coatings of implantable cardiac medical devices. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1173260>. Acesso em: 20 set. 2023.
- CHICHKOV, B. N. et al. Femtosecond, picosecond and nanosecond laser ablation of solids. **Applied Physics A**. v. 63, p. 109-115. 1996. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01567637>. Acesso em: 15 jun. 2023.
- COCHRAN, D.L. et al. The use of reduced healing times on ITI® implants with sandblasted and acid-etched (SLA) surface: early results from clinical trials on ITI® SLA implants. **Clinical Oral Implant Research**, v.13, n. 2, p. 144-153, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11952734/>. Acesso em: 20 jun. 2023.
- CORDEIRO, T. S. et al. Modifying the second order dispersion of femtosecond laser pulses to crack silver nanoparticles and control their dimensions. **Optics and Laser Technology**, v. 118, n. 2019, p.1-7. 2019. Disponível em: <https://repositorio-api.ipen.br/server/api/core/bitstreams/3be22bd1-4663-46bb-b857-7da4ea912c51/content>. Acesso em: 20 jul. 2023.
- DASSE K.A. et al. Experience clinic with textured blood contact surfaces on ventricular assist devices. **ASAIO Transaction**, v. 33, n. 3, p. 418-425, 1987. Disponível em: https://journals.lww.com/asaiojournal/citation/1987/07000/clinical_experience_with_textured_blood_contacting.67.aspx. Acesso em: 20 jul 2023.

DEARNALEY, G.; ARPS, J. H. Biomedical applications of diamond-like carbon (DLC) coatings: a review. **Surface and Coatings Technology**, v. 200, n. 7, p. 2518–2524, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2005.07.077>. Acesso em: 20 set. 2023.

DE HERT, M.; DETRAUX, J.; VANCAMPFORT, D. The intriguing relationship between coronary heart disease and mental disorders. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 31-40, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6016051/>. Acesso em: 18 jun. 2023.

DION, I. et al. Hemocompatibility of diamond-like carbon coating. **Bio-medical Materials and Engineering**, v. 3, n. 1, p. 51-55, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8490535/>. Acesso em 20 set. 2023.

DONG-CHOON, S.; HO-LUN, K.; XIGENG, M. Surface coatings for ventricular assist devices. **Expert Review of Medical Devices**, v. 6, n. 1, p. 51-60, 2009. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17434440.6.1.51>. Acesso em: 02 ago. 2023.

CERQUEIRA, C. S.; AMBROSIO, A. M.; KIRNER, C. A model based concurrent engineering framework using ISO-19450 standard. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SYSTEMS AND CONCURRENT ENGINEERING FOR SPACE APPLICATIONS, 7., 2016, Madri. **Proceedings...** 2016. Disponível em: <http://urlib.net/8JMKD3MGP3W34P/3N2G48B>. Acesso em: 12 abr. 2017.

ELIAS, C. N.; LIMA, J. H. C. Importância da qualidade da superfície dos implantes osseointegráveis na biofixação. **Revista Brasileira de Implantodontia**, v. 7, n. 1, p. 21-25, 2001.

ÉVORA, P. R. B. Laços históricos entre circulação sanguínea, endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 6, n.3, p. 211-221, 1999. Disponível em: <http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/6-3/004.pdf>. Acesso em: 15 set. 2023.

DEN EXTER, P. L. et al. Anticoagulant treatment and bleeding complications in patients with left ventricular assist devices. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 18, n. 6, p. 363-372, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14779072.2020.1773803>. Acesso em: 20 jun. 2023.

FERREIRA, L.M.V. **Revestimentos hidrofóbicos**. 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2013. Disponível em: https://run.unl.pt/bitstream/10362/11045/1/Ferreira_2013.pdf. Acesso em: 22 fev. 2021.

FRAZIER, O. H. et al. Immunochemical identification of human endothelial cells on the lining of a ventricular assist device. **Texas Heart Institute Journal**, v. 20, n. 2, p. 78-82, 1993. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC325066/pdf/thij00041-0016.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2023.

GARCIA, A. **Solidificação**: fundamentos e aplicações. 2. ed. Campinas: UNICAMP. 2008. 400 p.

GATICA, H. et al. Surface characterization of titanium alloys sterilized for biomedical applications. **Applied Surface Science**, v. 68, n.1, p 107-121, maio 1993. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169433293902206>. Acesso em: 15 jun. 2023.

GODINHO, C. F.; DUARTE, L. **Engenharia de tecido**: estado da arte. Belo Horizonte: CEFET-MG. 2011.

GOLDSTEIN, D. J. et al. Safety and feasibility trial of the MicroMed DeBakey ventricular assist device as a bridge to transplantation. **Journal of The American College of Cardiology**, v. 45, n. 6, p. 962-963, 2005. Disponível em: <https://www.jacc.org/doi/10.1016/j.jacc.2004.12.020>. Acesso em: 15 jun. 2023.

GRAHAM, T. R. et al. Neo-intimal development on textured biomaterial surfaces during clinical use of an implantable left ventricular assist device. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 4, p.182-190. 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/1010-7940\(90\)90002-H](https://doi.org/10.1016/1010-7940(90)90002-H). Acesso em: 20 jun. 2023.

GRIFFIN, B. P.; RIMMERMAN, C. M.; TOPOL, E. J. **The Cleveland Clinic cardiology board review**. 3.ed. Filadelfia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. 809p.

GRIFFITH, B. P. et al. HeartMate II left ventricular assist system: from concept to first clinical use. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 71, n. 3, p. 116-120, 2001. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0003497500026394>. Acesso em: 14 jun. 2023.

GUTIÉRREZ, J. M. B. et al. High antibacterial properties of DLC film doped with nanodiamond. **Surface and Coatings Technology**, v. 375, p. 395- 401. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0257897219307613?via%3Dihub>. Acesso em: 20 ago. 2023.

HETZER, R. et al. First experiences with a novel magnetically suspended axial flow left ventricular assist device. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 25, n. 6, p. 964-967, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/ejcts/article/25/6/964/381777>. Acesso em 18 ago. 2023.

ITERSON, E. H.V. et al. Obesity and hemoglobin content impact peak oxygen uptake in human heart failure. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 25, n. 18, p. 1937–1946, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2047487318802695>. Acesso em: 03 ago. 2023.

JOHNSON, M. R. et al. Heart Transplantation in United States, 1999-2008. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 2, p. 1035-1046, 2010. Disponível em: [https://www.amjtransplant.org/article/S1600-6135\(22\)03781-9/fulltext](https://www.amjtransplant.org/article/S1600-6135(22)03781-9/fulltext). Acesso em: 20 jun. 2023.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. 488 p.

KALIL, R. A. K.; SANT'ANNA R. T. Terapia gênica aplicada às doenças cardiovasculares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v.13, n. 3, p. 1-7, 2004. Disponível em: <http://sociedades.cardiol.br/sbc-rs/revista/2004/03/artigo14.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2023.

KARP, G. **Cell and molecular biology: concepts and experiments**. Nova Jersey: John Wiley and Sons. 2009. 832 p.

KIHARA, S. et al. In vivo evaluation of a MPC polymer coated continuous flow left ventricular assist system. **Artificial Organs**, v. 27, n. 2, p. 188-192, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1525-1594.2003.t01-2-06993.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em 14 jun. 2023.

KRISHNAN, L. et al. Quantitation of platelet adhesion to Ti and DLC-coated Ti in vitro using 125 I-labeled platelets. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 2-6, p. 251-253, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(02\)00029-1](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(02)00029-1). Acesso em: 18 jun. 2023.

LEIRNER, A. A.; MOREIRA, L. F.; STOLF, N. A. G. Assistência circulatória mecânica: aspectos atuais. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 8, n. 3, p. 464-475, 1998.

LI, Y. et al. Effects of hydrofluoric acid and anodized micro and micro/nano surface implants on early osseointegration in rats. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 50, n. 8, p. 779-783, 2012. Disponível em: [https://www.bjoms.com/article/S0266-4356\(11\)00700-5/abstract](https://www.bjoms.com/article/S0266-4356(11)00700-5/abstract). Acesso em 18 jun. 2023.

LIAO, W. H. et al. Current improvement in biocompatibility and bioinertness of diamond-like carbon films with nitrogen doping. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 100, n. 11, p. 3151- 3156. 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.34235>. Acesso em: 18 jun. 2023.

LIZA, S. et al. Deposition of boron doped DLC films on TiNb and characterization of their mechanical properties and blood compatibility. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 18, n. 1, p. 76 – 87, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5256269/pdf/tsta-18-076.pdf>. Acesso em 18 jun. 2023.

MALUF, M. Expandable polyurethane stent valve: results of physical, hydrodynamic and experimental tests. In: EUROSCICON CONGRESS ON HEART DISEASE AND INTERVENTIONAL CARDIOLOGY, 2., 2019, Paris, França. **Proceedings...** França: ESC, 2019. Disponível em: <https://www.primescholars.com/proceedings/expandable-polyurethane-stent-valve-results-of-physical-hydrodynamic-and-experimental-tests-63545.html>. Acesso em: 18 jun. 2023.

MARCIANO, F. R. **Estudo de crescimentos de filmes de DLC com nanopartículas de prata para aplicações espaciais e biomédicas**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores) - Instituto nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2008. Disponível em: <http://mtc-m16b.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/mtc-m17@80/2008/02.12.13.27/doc/publicacao.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2023.

MAREK, M. I. Introduction. In: ASM COMMITTEE (Ed.). **International handbook**. USA: ASM, 1992. p. 16-49. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/5955752/mod_resource/content/1/ASM%20Metals%20HandBook%20Volume%2013%20-%20Corrosion.pdf. Acesso em: 25 ago. 2022.

MARMUR, A. Super-hydrophobicity fundamentals: implications to biofouling prevention. **Biofouling**, v. 22, n. 2, p. 107-115, 2006. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/08927010600562328?needAccess=true>. Acesso em: 20 jun. 2023.

MARTINS e SILVA, J. Conceitos sobre hemoreologia e microcirculação humanas. **Boletim da SPHM**, v. 27, n.1, 2012. Disponível em: <http://www.hemorreologia.com/index.php/pt/boletins/send/133-boletim-n-1-de-2012/670->. Acesso em: 20 jun. 2023.

MEDICINA S/A. **289 mil pessoas morreram de doenças cardiovasculares em 2019**. 25 set. 2019. Disponível em: <https://medicinasa.com.br/doencas-cardiovasculares-2019/>. Acesso em 01 jun. 2021.

MEHRA M.R. et al. Healthcare resource use and cost implications in the MOMENTUM 3 long-term outcome study. **Circulation**, v. 138, n. 18, p. 1923-1934, 2018. Disponível em: https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035722?rfr_da t=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org. Acesso em 20 jun. 2023.

MELLO, C. B. **Introdução a microscopia dos materiais**. São José dos Campos: INPE, 11 Jun. 2018. Notas de aula.

MEER, A. L.V. D. et al. Initial in vivo experience of the ventrassist implantable rotary blood pump in sheep. **Artificial Organs**, v. 27, n. 1, p. 21-26, 2003. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1525-1594.2003.07178.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 20 jun. 2023.

MORO, J. R. **Filmes finos**. São Paulo: IFSP, 20 ago. 2015. Notas de aula.

MOVAFAGHI, S. et al. Hemocompatibility of superhemophobic titania surfaces. **Advanced Healthcare Materials**, v.6, n. 4, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adhm.201600717>. Acesso em: 18 jun. 2023

MYERS, A. L. Thermodynamics of adsorption. In: LETCHER, T. M. (Ed.). **Chemical thermodynamics for industry**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2004. p. 243-253. Disponível em: <https://www.seas.upenn.edu/~amyers/CHAPTER21.pdf>. Acesso em: 22 ago. 2022.

NOSÉ, Y.; MOTOMURA, T. **Cardiac prosthesis: artificial heart and assist circulation – past present and future**. 4.ed. Houston: ICTM Press, 2003. 238 p.

OLIN, C. Titanium in cardiac and cardiovascular applications. In: BRUNETTE, D. M.; TENGVALL, P.; TEXTOR, M.; THOMSEN, P. (Ed.). **Titanium in medicine: material science, surface science, engineering, biological responses and medical applications**. Berlin: Springer, 2001. p. 889–907. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Marcus-Textor/publication/224766482_Surface_composition_and_topography_of_titanium_alloy_implants/links/55d4ddc508ae6788fa35273c/Surface-composition-and-topography-of-titanium-alloy-implants.pdf. Acesso em 20 ago. 2023.

OOHIRA, K. Characteristics and applications of DLC films. **NTN Technical Review**, n. 77, p. 90-95, 2009. Disponível em: https://www.ntnglobal.com/en/products/review/pdf/NTN_TR77_en.pdf. Acesso em: 22 jun. 2022.

PAPANASTASIOU, C. A.; GIANNAKOULAS, G. Overweight and obesity: time to reconsider their role in heart failure. **European Journal of Preventive Cardiology**, v.8, n. 9, p. 946–947, 2021. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2047487320933738>. Acesso em: 22 jun. 2023.

PILLACA, E. J. D. M. DLC deposition inside of a long tube by using the pulsed-DC PECVD process. **Surface & Coatings Technology**, v, 359, p, 55-61, 2019. Disponível em: https://resolver.scholarsportal.info/resolve/02578972/v359icomplete/55_ddioalbutppp.xml. Acesso em: 22 set. 2023.

PLACKO, H. E. et al. Surface characterization of titanium-based implant materials. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 15, n. 3, p. 335-363, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10874800/>. Acesso em: 22 maio. 2023.

POIRIER, V.L. The TCI heart mate blood pump. In: LEWIS, T.; GRAHAM, T. (Ed.). **Mechanical circulatory support**. Londres: Edward Arnold, 1995. p 229–236.

RAMIREZ, M. A. R. et al. An evaluation of the tribological characteristics of DLC films grown on inconel alloy 718 using the active screen plasma technique in a pulsed-DC PECVD system. **Surface & Coatings Technology**, v. 284, p.235-239, 2015.

Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0257897215005411?via%3Dihub>. Acesso em: 12 ago. 2023.

RAPAPORT, S. I. **Hematologia: introdução**. 2.ed. São Paulo: Roca, 1990. 450 p.

ROBERTSON, J. Diamond-like amorphous carbon. **Materials Science and Engineering**, v. 37, n. 2022, p. 129 - 281, 2002. Disponível em:

<https://universalvacuumtech.com/wp-content/uploads/Robertson-Diamond-Like-Amorphous-Carbon.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2023.

RUPP, F. et al. Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. **Biomaterials**, v. 25, n. 7-8, p.1429-1438, 2004.

Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez31.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0142961203006719>. Acesso em: 24 jun. 2023.

SÁ, R. C. L. et al. Study of Diamond-Like-Carbon (DLC) coating in polycarbonate for circulatory assist devices. In: ASAIO ANNUAL CONFERENCE, 62., 2016, San Francisco. **Proceedings...** 2016. Disponível em:

<https://journals.lww.com/asaiojournal/Documents/ASAIO%202016%20Abstracts.pdf>. Acesso em: 18 jul.2019.

SÁ, R. C. L. et al. Biofunctionalization of surfaces to minimize undesirable effects in cardiovascular assistance devices. **Artificial Organs**, v. 48, n. 2, p. 141-149, 2024.

Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/aor.14683>. Acesso em: 20 dez. 2023.

SÁ, R. L. C. et al. Modification surface in medicine: techniques with plasma in implantable centrifugal blood pump. **Sinergia**, v. 18, n. 2, p. 91-94, 2017. Disponível em: <https://ojs.ifsp.edu.br/index.php/sinergia/article/view/35/305>. Acesso em: 20 ago. 2023.

SANT'ANA, P. L. **Plásticos comerciais tratados a plasma para dispositivos ópticos e embalagens alimentícias**. 2014. 109 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista, Sorocaba, 2014. Disponível em:

<https://repositorio.unesp.br/items/5d8461e4-ed7a-44ba-a561-660c9cea2c0f>. Acesso em: 20 jul. 2023.

SANTOS, R. G. **Transformação de fases em materiais metálicos**. Campinas: UNICAMP, 2006. 430 p.

SHENG, Y. J.; JIANG, S.; TSAO, H. K. Effects of geometrical characteristics of surface roughness on droplet wetting. **The Journal of Chemical Physics**, v. 127, n. 23, p. 23-47, 2007. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/5695555_Effects_of_geometrical_characteristics_of_surface_roughness_on_droplet_wetting. Acesso em: 02 ago. 2023.

SILVA, B. U. et al. Apical aortic blood pump pre-clinical assessment for long-term use: durability test and stator topology to reduce wear in the bearing system. **Artificial Organs**, v. 1, p. 1-6, 2019. Disponível em:

<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/10/1121430/apical-aortic-blood-pump-preclinical.pdf>. Acesso em: 02 ago. 2023.

SNYDER, T. A. et al. Preclinical biocompatibility assessment of the EVAHEART ventricular assist device: coating comparison and platelet activation. **Journal of Biomedics Materials Research**, v. 81A, n. 1, p. 85-92, 2006. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.31006>. Acesso em: 20 ago. 2023.

SOBOTTA, J. **Atlas de anatomia humana: órgãos internos**. 23. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SOUZA, M. H.; ELIAS, D. O. **Fundamentos da circulação extracorpórea**. 2. ed. Rio de Janeiro: Alfa Rio, 2006. 828 p.

TA, D. V. et al. Nanosecond laser textured superhydrophobic metallic surfaces and their chemical sensing applications. **Applied Surface Science**, v. 357, Pt. A, p.248-254, 2015. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433215021182>. Acesso em: 10 jun. 2023.

TEUTEBERG, J. et al. The society of thoracic surgeons INTERMACS 2019 annual report: the changing landscape of devices and indications. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 109, n. 3, p. 649-660, 2020. Disponível em:

[https://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975\(20\)30014-X/fulltext](https://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975(20)30014-X/fulltext). Acesso em: 02 ago. 2023.

Yanzhong, T. et al. Direct observations of microstructural evolution in a two-phase Cu-Ag alloy processed by high-pressure torsion. **Scripta Materialia**, v. 63, n. 1, p.65- 68. 2010. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359646210001521>. Acesso em: 01 ago. 2023.

TIMERMAN, A.; PEREIRA, M. P. Tratamento atual da insuficiência cardíaca congestiva. **Revista Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 10, n. 1, p. 65-75, 2000.

UEBELHART, B. et al. Study of a centrifugal blood pump in a mock loop system. **Artificial Organs**, v. 37, n. 11, p. 946–949, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary-wiley.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/aor.12228>. Acesso em: 02 ago. 2023.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T.F.; WENDEL NETO.; S. **Hematologia e hemoterapia**. São Paulo: Atheneu. 1996. 312 p.

VIEIRA, A. **Análise e estudo de parâmetros para texturização a laser com pulsos ultra-curtos para melhoria das propriedades tribológicas de componentes de motor**. 2018. 71 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-09082018-092107/publico/2018VieiraAnalise.pdf>. Acesso em: 03 ago. 2023.

WANG, J. et al. Improving frictional properties of DLC films by surface energy manipulation, **RSC Advances**, n. 8, p. 11388-11398, 2018. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c8ra00580j>. Acesso em: 13 ago. 2023.

WENXUAN, H. et al. Biological response to sintered titanium in the left ventricle Assistive devices: pseudoneointima, neointima, and pannus. **ASAIO Journal**, v. 69, n.1, p. 1-10, jan. 2023. Disponível em: https://journals.lww.com/asaiojournal/fulltext/2023/01000/biological_response_to_sintered_titanium_in_left.3.aspx. Acesso em: 14 set. 2023.

YAMAZAKI, K. et al. An implantable centrifugal blood pump with a recirculating purge system (Cool-Seal System). **Artificial Organs**, v. 22, n. 6, p. 466-474, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9650667/>. Acesso em: 02 ago. 2023.

ZAPANTA, C. M. et al. Microtextured materials for circulatory support devices: preliminary studies. **ASAIO Journal**, v. 52, n. 1, p. 17-23, 2006. Disponível em: https://journals.lww.com/asaiojournal/fulltext/2006/01000/microtextured_materials_for_circulatory_support.4.aspx. Acesso em: 14 jul. 2023.

ZHENG, Y. et al. Formation of nanostructures by femtosecond laser processing. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MANIPULATION, MANUFACTURING AND MEASUREMENT ON THE NANOSCALE, 2016, Changchun. **Proceedings...** 2015. Disponível em: https://warwick.ac.uk/fac/sci/eng/research/grouplist/measurement/fabsurfwar/publications/2015_3m_nano_07425522.pdf. Acesso em: 10 jun. 2023.

ANEXO A - CERTIFICADO DE QUALIDADE DE TITÂNIO COMERCIAL PURO.

realum		CERTIFICADO DA QUALIDADE		No.: 2774								
Cliente: Fundação Adib Jatene		Pedido: 7613		Item: 1								
Liga: Titânio Grau 2 - Astm F67		Produto: BARRA TI F67 GR2 Ø12,70 MM - UNS R50400		Qtde.: 0,85 KG								
Ped Cliente: 183582/1				No. NF: 008282								
ANÁLISE QUÍMICA (%)												
Corrida	Liga	Rastreabilidade	C	Fe	H	N	O	Ti				
H17364	0102	00562	0,006	0,13	0,0017	0,003	0,14	Balanco				
ENSAIOS MECÂNICOS							SEL No.: Origem					
Ensaio:	Dureza	Tração	Escoamento	Alongamento	Redução de Área							
Obtido:	85 HRB	532 MPa	379 MPa	26,0 %	46,0 %							
Ensaio:												
Obtido:												
Tratamento Térmico: <u>Recozido</u>			Transformação Mecânica/Acabamento: <u>Laminado</u>									
Informações Complementares												
Composição química e propriedades mecânicas atendem a norma ASTM F67 - Grau 2 (UNS R50400) 01 Peça: 1.500,00mm												
02/12/2014 Data de Emissão			 Responsável: <u>Ramirio Moreira</u>			REALUM INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE METAIS PUROS E LIGAS LTDA Rua Pires Parente - Cep: 03138-040 - São Paulo - Brasil Site: www.realum.com.br +55(11)2343-2300 FAX: CNPJ: 03.855.623/0001-02 IE: 111.141.604.110			Rev.: 00			

ANEXO B - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/IDPC.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de superfícies biofuncionais para minimizar efeitos de interação hemodinâmica em aplicações cardiovasculares / Avaliação in vitro da molhabilidade do sangue em superfícies biofuncionais.

Pesquisador: ROSA CORREA LEONCIO DE SA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58786722.1.0000.5462

Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.457.853

Apresentação do Projeto:

Nº DO PROTOCOLO DO CEP: 5260/2022

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa"

De acordo com os pesquisadores

"O sangue em contato com qualquer superfície não endotelizada desencadeia a ativação dos fatores de coagulação e proteínas circulantes do sangue, que transformam

Fibrinogênio em fibrina resultante da formação de trombina. A formação e desprendimento de um trombo durante a prática de assistência circulatória mecânica é inadmissível por apresentar alto potencial de embolia, obstrução de fluxo sanguíneo e acidente vascular.

Frente a isto, um biomaterial compatível para assistência circulatória mecânica de longo prazo deve proporcionar integração biológica estável sem comprometer a biofuncionalidade do implante ou qualquer sistema do organismo ou ainda, não interagir, minimizando os efeitos indesejáveis de interação. O Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais e a Empresa CVDVale estudam a modificação superfície em titânio grau médico por meio de texturização a laser nanosegundos seguido de revestimento por deposição de DLC (Diamond Like Carbon). O efeito Cassie-Baxter mostra-se característico nas superfícies que repelem líquidos (superhidrofóbica), já que bolsas de ar formam-se nas micro e

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 8º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br



nanoestruturas presentes na superfície e impedem a interação com o hidrogênio constituinte na porção líquida. Forma-se assim, ângulo de contato entre o líquido e a porção sólida superior a 150° . Conforme a espessura do revestimento de DLC, esta mesma superfície se apresenta no estado de Wenzel, em que o efeito superhidrofílico, com ângulo de contato inferior a 90° , pode ser observado. Este estudo consiste na avaliação in vitro da molhabilidade do sangue em superfícies de titânio grau médico: polido como Material de Referência (MR), com efeito Cassie-Baxter como Amostra de Teste 1 e com perfil de scaffold como AT2 para certificar, por meio de medidas de ângulo de contato, que o efeito Cassie-Baxter permanece aparente na AT1 mesmo utilizando fluidos não newtonianos e biológicos como sangue e que a molhabilidade da AT2 aumenta comparado ao MR. A não interação significativa dos constituintes do sangue com a superfície em estudo pode minimizar os efeitos negativos de interação, como formação de coágulos por exemplo. Para a AT2, a alta molhabilidade da gota de sangue somado ao perfil scaffolds pode contribuir a formação in vivo de uma camada neointima trombo resistente por meio de adesão dos constituintes do sangue circulante em função do tempo capaz de simular o tecido endotelial natural.

"Hipótese: Uma vez que o efeito Cassie-Baxter, característico da AT1, tende a impedir o contato do líquido com a superfície, espera-se que o ângulo de contato com sangue seja superior a 150° ; demonstrando assim, sua utilidade com fluidos não newtonianos e biológicos.

Para a AT2, espera-se que haja o espalhamento da gota de sangue e formação de ângulo de contato inferior a 90° ; esta característica, somada ao perfil scaffolds pode contribuir para que, in vivo, uma camada neointima trombo resistente se forme na superfície por meio de adesão dos constituintes do sangue circulante em função do tempo capaz de simular o tecido endotelial natural."

"Metodologia: Amostras em Titânio grau médico serão usinadas em forma de discos planos de aproximadamente 15 milímetros de diâmetro e polidas para que alcancem rugosidade superficial inferior a 50 nanômetros.

Seis destas amostras terão sua superfície modificada por meio do equipamento de Laser Nanosegundos pela Empresa CLOROVALE de São José dos Campos conforme parâmetros pré-estabelecidos; o recartilho irá atribuir a superfície poros de 50 microns de diâmetro e igual profundidade, distribuídos de forma homogênea.

Em seguida, serão submetidas ao processo de deposição química a vapor no Laboratório de

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 8º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br



INSTITUTO DANTE
PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



Continuação do Parecer: 5.457.853

Materiais e Sensores (LAS) do INPE para serem revestidas com DLC, Diamond Like Carbon; duas diferentes espessuras deste filme serão consideradas: 0,5 μm para AT1 e 2 μm para AT2. Esta pequena diferença na espessura atribui efeitos inversos de molhabilidade, superhidrofóbica para AT1 e superhidrofílica para AT2.

As amostras serão submetidas ao processo de esterilização por autoclavagem no Departamento de Cirurgia Experimental do IDPC, embaladas em embalagem estéril. No dia do procedimento experimental, um doador voluntário adulto e saudável deverá comparecer ao local para que seu sangue seja coletado no instante da realização de cada análise.

Primeiro, a amostra estéril será devidamente posicionada no equipamento de análise Goniométrico RaméHart, 100-00 e seus parâmetros de registro previamente ajustados.

No segundo momento, ocorrerá a coleta de sangue humano por meio de uma micropipeta automática (Metrohm Brasil) com ponteira 2-4 μL descartável, imediatamente depois de realizada a microincisão na extremidade de um dos dedos da mão utilizando uma lanceta descartável \varnothing 0,36mm (Accu-Chek Safe-TPro). A região será desinfetada com álcool 70%; nesta etapa, todos os cuidados serão tomados para garantir a integridade do campo estéril e o bem-estar do doador; ainda que seja um procedimento não invasivo.

Logo em seguida, a gota de sangue será depositada sobre cada superfície por meio de uma micropipeta e então, as medidas de ângulo de contato serão registradas pelo software do equipamento goniômetro. Todos os itens descartáveis serão destinados ao caixa coletora de perfurocortantes DESCARPACK. Não haverá necessidade de descarte de material biológico.

Este procedimento se repetirá a cada análise; três medidas em cada superfície serão consideradas para obtenção dos valores de média e desvio padrão, totalizando nove medições isoladas.

Uma vez que o efeito Cassie-Baxter, característico da AT1, tende a impedir o contato do líquido com a superfície, espera-se que o ângulo de contato

com sangue seja superior a 150°; demonstrando assim, sua utilidade com fluídos não newtonianos e biológicos.

Para a AT2, espera-se que haja o espalhamento da gota de sangue e formação de ângulo de contato inferior a 90°; esta característica, somada ao perfil scaffolds pode contribuir para que, in vivo, uma camada neointima trombo resistente se forme na superfície por meio de adesão dos constituintes do sangue circulante em função do tempo capaz de simular o tecido endotelial natural."

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 8º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br

Página 03 de 06



INSTITUTO DANTE
PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



Continuação do Parecer: 5.457.853

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com os pesquisadores:

"Certificar de que processos de modificação de superfície no material de implante, titânio grau médico, podem minimizar os efeitos indesejáveis de interação hemodinâmica e assim, contribuir com o aumento da expectativa e melhora na qualidade de vida de pacientes submetidos a Assistência Circulatória Mecânica."

"Objetivo Secundário: Avaliar in vitro a molhabilidade do sangue em superfícies de Titânio grau médico: polido como Material de Referência (MR), com o efeito CassieBaxter como Amostra de Teste (AT) 1 e com o perfil de scaffolds como AT2. Certificar, por meio de medidas de ângulo de contato, que o efeito Cassie-Baxter permanece aparente na AT1 mesmo utilizando fluidos não newtonianos e biológicos como sangue e que a molhabilidade da AT2 aumenta comparado ao MR."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os participantes "Os riscos envolvidos ao participante de pesquisa são mínimos, sendo: os fatores de deslocamento por via terrestre até o local onde será realizada a coleta de sangue e a dor temporária provocada pela microincisão;

Dos possíveis benefícios adquiridos e atribuídos decorrentes da participação na pesquisa, destaca-se: a contribuição ao conhecimento científico e desenvolvimento tecnológico mediante estudo dos resultados obtidos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma resposta de pendência

Instituição Participante: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

Instituição coparticipante: INSTITUTO DE PESQUISAS ESPACIAIS

Nº de participantes: 1 (coleta de sangue)

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo de Conclusões ou Pendências.

Recomendações:

Vide campo de Conclusões ou Pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-Quanto a pendência- Detalhar no documento TCLE e também nas informações básicas da pesquisa os riscos envolvidos ao participante de pesquisa, mesmo que mínimos, além dos

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 8º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br

Página 04 de 06



possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa.(Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.b).

Os pesquisadores descreveram os riscos e possíveis benefícios.(PENDÊNCIA ATENDIDA)

-Quanto a pendência acrescentar no TCLE garantia do ressarcimento e como serão cobertas as despesas tida pelo participante. Os pesquisadores se responsabilizaram pelas despesas de transporte e de alimentação do participante da pesquisa da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.g) (PENDÊNCIA ATENDIDA)

-Quanto a pendência referente ao TCLE que deverá ser elaborado em duas VIAS, e assinadas ao final pelo participante. Os pesquisadores acrescentaram a informação sobre a elaboração do documento em duas vias. (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d)(PENDÊNCIA ATENDIDA)

-Quanto a pendência referente a adequar a linguagem do TCLE deixando mais clara, objetiva e de fácil entendimento para o participante, também foi resolvida com linguagem mais acessível e clara (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.23)(PENDÊNCIA ATENDIDA)

- A pendência referente a detalhar os custos previstos para a pesquisa no orçamento também foi resolvida com detalhamento dos custos.(PENDÊNCIA ATENDIDA)

Assim não observa-se óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e suas complementares após análise das pendências em ad referendum manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1942999.pdf	06/06/2022 11:36:22		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CARTA_RESPOSTA_TCLE.pdf	06/06/2022 11:34:42	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Carta_Resposta_Projeto_de_Pesquisa.pdf	06/06/2022 11:32:26	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Orçamento.pdf	06/06/2022 11:28:58	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	16/05/2022	ROSA CORREA	Aceito

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 8º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br

Continuação do Parecer: 5.457.853

Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	16:29:54	LEONCIO DE SA	Aceito
Outros	Relacao_de_docs.pdf	10/05/2022 11:46:43	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito
Outros	Declaracao_LEI.pdf	10/05/2022 11:39:26	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito
Outros	Manuseio_Mat_Bio.pdf	10/05/2022 11:36:31	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito
Outros	CADASTRO_DE_PESQUISA.pdf	10/05/2022 11:33:51	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	10/05/2022 11:32:28	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	SETOR.pdf	06/05/2022 12:29:15	ROSA CORREA LEONCIO DE SA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 09 de Junho de 2022

**Assinado por:
Pedro Silvio Farsky
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 8º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br

ANEXO C - CERTIFICADO CEUA/USP



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação in vivo da interação hemodinâmica em superfícies biofuncionais para minimizar efeitos indesejáveis em aplicações cardiovasculares", protocolada sob o CEUA nº 3658240622, sob a responsabilidade de **Vagner Roberto Antunes e equipe; Rosa Corrêa Leoncio de Sá** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 19/08/2022.

We certify that the proposal "In vivo evaluation of hemodynamic interaction on biofunctional surfaces to minimize undesirable effects in cardiovascular applications", utilizing 30 Heterogenics rats (30 males), protocol number CEUA 3658240622, under the responsibility of **Vagner Roberto Antunes and team; Rosa Corrêa Leoncio de Sá** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/19/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **6 meses**

Depto/Setor: **Fisiologia E Biofísica**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **300 a 500 g**

Linhagem: **Rattus norvegicus / Wistar**

N amostral: 30

São Paulo, 19 de agosto de 2022

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

ANEXO D - RELATÓRIO DE IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL FIO 0,4 MM TITÂNIO



Rua Pires Pimentel, 442 - Vila Prudente, São Paulo- SP, CEP:03138-040

RELATÓRIO DE PMI (Positive Material Identification)

Data do teste: 22/12/2022

Nº 01647

Cliente: Estoque

Ref. cliente: Fio - Ø0,40 mm - TIGR2

Referência : 0106-01647

Equipamento Utilizado: Espectrômetro Portátil

Marca: Termo Fisher Scientific

Modelo : Niton XL-2 (R-210)

1- Objetivo:

Realizar identificação do corpo de prova por meio de espectrometria por fluorescência de Raio x , com espectrômetro portátil.

2- Resultados:

Análise # 1261

Apontamento por aproximação: TI GR2

Elemento	%
Ti	98,41
Fe*	0,748
Ni*	0,393
Cu*	0,076
Zn*	0,017

* - Residual do equipamento

Procedimentos utilizados: Preparação da amostra e método de ensaio conforme IT-07.41- Espectrometria por Fluorescência de Raios-X - PMI (Niton XL-2, R-210) (Rev00).

Não é possível medir o teor de H, C, Na, S, He, N, Mg, Cl, Li, O, Al, Ar, Sc, Be, F, Si, K, B, Ne, P e Ca pelo método aplicado.

Anexo 1: Fotografia da análise no equipamento:



Responsável pela análise:
Rosemeire C.S. Romera
Téc. Metalurgia