



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

**FRANCISCO DE ASSIS SOUSA**

**ANÁLISE DE ADESÃO E CRESCIMENTO BACTERIANO EM SUPERFÍCIES  
MODELO: UMA AVALIAÇÃO EM AMPLA ESCALA DE COMPRIMENTO**

**FORTALEZA**

**2017**

FRANCISCO DE ASSIS SOUSA

ANÁLISE DE ADESÃO E CRESCIMENTO BACTERIANO EM SUPERFÍCIES  
MODELO: UMA AVALIAÇÃO EM AMPLA ESCALA DE COMPRIMENTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Física. Área de concentração: Física da matéria condensada.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S696a Sousa, Francisco de Assis.  
Análise de adesão e crescimento bacteriano em superfícies modelo : uma avaliação em ampla escala de comprimento / Francisco de Assis Sousa. – 2017.  
156 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Física, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.
1. Adesão bacteriana. 2. Topografia. 3. Microscopia Confocal e Microscopia de Força Atômica. 4. Imageamento em campo amplo. 5. Processamento de imagens. I. Título.

CDD 530

---

FRANCISCO DE ASSIS SOUSA

ANÁLISE DE ADESÃO E CRESCIMENTO BACTERIANO EM SUPERFÍCIES  
MODELO: UMA AVALIAÇÃO EM AMPLA ESCALA DE COMPRIMENTO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Física. Área de concentração: Física da Matéria Condensada.

Aprovada em: 31/10/2017

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Amauri Jardim de Paula (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Alexandre Rocha Paschoal  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Ascânio Dias Araújo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

---

Dr. José Valdenir da Silveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC/Sobral)

Aos meus pais, Raimundo e Liduina.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula, por todo o suporte disponibilizado, aprendizado, excepcional orientação e amizade, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Paschoal, Prof. Ascânio, Prof. Bartolomeu e Prof. Valdenir pela disponibilidade e pela colaboração.

À toda equipe do SolBIN, pela amizade e cooperatividade, em especial ao amigo Victor, pela imensa colaboração na realização deste trabalho.

À toda equipe do LaMFA, pela amizade e cooperatividade, em especial ao Prof. Odair pela disponibilização do espaço para realização das atividades de pesquisa.

À equipe responsável pelo AFM da UFC, pelos ensinamentos e disponibilidade do mesmo, em especial ao Prof. Paschoal pelo acompanhamento inicial.

À equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical pelo suporte e presteza na realização dos ensaios microbiológicos, em especial a Dra. Terezinha Feitosa.

À Dr. Cristiane do LNNano pela realização das análises de espectroscopia fotoelétrons por raios X no Centro de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM).

Ao Programa de Pós-Graduação em Física pela oportunidade de aprendizado, em especial ao Prof. Antônio Gomes, pela orientação inicial no doutorado.

Ao Instituto Federal do Rio Grande do Norte, Campus Apodi, pela liberação para capacitação, tornando possível a realização desse trabalho.

À equipe da Central Analítica da UFC pelo auxílio.

À equipe da oficina da Física pelos serviços prestados quando solicitados.

À minha família e amigos, pelo apoio e grande incentivo.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Universidade e todo o corpo docente que participou da minha formação.

“Quando ele descobriu que suas crenças há muito estimadas não concordavam com as observações mais precisas, ele aceitou os fatos desconfortáveis. Ele preferiu a dura verdade às suas ilusões mais caras. Isto, é o coração da ciência” (Carl Sagan sobre Kepler)

## RESUMO

No presente trabalho foi avaliado em ampla escala de comprimento (nanômetro a milímetro) a adesão e crescimento bacteriano sobre substratos de silício (modificados através de corrosão anisotrópica com KOH) usando um método baseado em processamento computacional de imagens. Primeiramente, as topografias das superfícies de Si obtidas foram caracterizadas em função de um conjunto de parâmetros topográficos ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{sk}$ ,  $R_k$ ,  $\zeta$  e  $D$ ). Posteriormente, o imageamento com microscopia ótica confocal de campo amplo (LF-CLSM) foi usado para caracterizar todo o substrato ( $5 \times 5$  mm), após incubação desses em uma suspensão bacteriana de *Staphylococcus aureus*. A análise computacional dessas imagens permitiu comparar quantitativamente a ocupação (em %-área), quantidade de bactérias e aglomerados, e suas distribuições de tamanho. Os resultados mostraram que amostras de baixa rugosidade ( $R_q \sim 32$  nm) apresentam menor quantidade de bactérias aderidas, e menor ocupação de área para o tempo de 3 h de incubação. Por outro lado, menor crescimento bacteriano foi observado para amostras mais rugosas ( $R_q \sim 330$  nm) para o tempo de 5 h de incubação. Nessa amostra houve formação de microestruturas (grandes pirâmides) em sua superfície, como resultado da corrosão anisotrópica com o KOH. Todavia, para tempos maiores de 18 e 26 h foi evidenciado que todas as superfícies em estudo foram incapazes de impedir a formação de biofilmes, resultando em valores médios de ocupação de área próximos de 100 %, avaliados sobre uma área de  $3,6 \times 3,6$  mm. Através de algoritmos desenvolvidos para processar *stacks* das fatias ótica desses biofilmes, foi possível observar que não houve grandes diferenças nas quantidades de biomassas dos mesmos. Os métodos e resultados apresentados auxiliam na compreensão e desenvolvimento de novas estratégias para tratamentos e prevenção de formação de biofilmes. Por fim, a abordagem metodológica apresentada no presente trabalho pode ser utilizada para diversos tipos de bactérias, em diversos tipos de superfícies, com diferentes tipos de topografias e ambientes físico-químicos que possuem importância científica ou tecnológica. Bactérias e biofilmes geram crescente preocupação mundial por ocasionar graves problemas para a saúde humana e para a indústria, principalmente alimentícia. Nesse contexto, o presente trabalho contribui descrevendo o comportamento de bactérias de *S. aureus* em função da topografia de superfícies, descritas com um conjunto de parâmetros dimensionais.

**Palavras-chave:** Adesão bacteriana. Biofilmes. *Staphylococcus aureus*. Microscopia Confocal. Imageamento em campo amplo. Processamento de imagens. Microscopia de Força Atômica. Topografia.



## ABSTRACT

In the present work the adhesion and bacterial growth on silicon substrates (modified through anisotropic corrosion with KOH) were evaluated in a large scale of length (nanometer to millimeter) using a method based on computational processing of images. Firstly, the topographies of the Si surfaces obtained were characterized by a set of topographic parameters ( $R_a, R_q, R_{sk}, R_k, \zeta \in D$ ). Posteriorly, the large-field confocal optical microscopy (LF-CLSM) imaging was used to characterize the whole substrate ( $5 \times 5$  mm) after incubation of these in a bacterial suspension of *Staphylococcus aureus*. The computational analysis of these images allowed to quantitatively compare the occupation (in %-area), amount of bacteria and agglomerates, and their size distributions. The results showed that samples of low roughness ( $R_q \sim 32$  nm) present lower amount of bacteria adhered, and less occupation of area for a 3 h incubation time. On the other hand, lower bacterial growth was observed for more rough sample ( $R_q \sim 330$  nm) for the 5 h incubation time. In this sample, microstructures (large pyramids) were formed on its surface as a result of anisotropic corrosion with KOH. However, for times greater than 18 and 26 h it was evidenced that all surfaces under study were unable to prevent the formation of biofilms, resulting in average values of area occupation close to 100 %, evaluated over an area of  $3,6 \times 3,6$  mm. Through algorithms developed to process stacks of the optical slices of these biofilms, it was possible to observe that there were no great differences in the biomass amounts of the same ones. The methods and results presented help to understand and develop new strategies for treatments and prevention of biofilm formation. Finally, the methodological approach presented in the present work can be used for several types of bacteria, in different types of surfaces, with different types of topographies and physico-chemical environments that have scientific or technological importance. Bacteria and biofilms generate growing worldwide concern for causing serious problems for human health and for the industry, especially food industry. In this context, the present work contributes to describe the behavior of *S. aureus* bacteria as a function of surface topography, described with a set of dimensional parameters.

**Keywords:** Bacterial adhesion. Biofilms. *Staphylococcus aureus*. Confocal Microscopy. Large-field imaging. Image processing. Atomic Force Microscopy. Topography.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– a) Representação da estrutura cristalina do Si (estrutura tipo diamante) e b) Parâmetros de rede do Si .....	28
Figura 2	– Representação do íon ortossilicato .....	29
Figura 3	– a) Corrosão isotrópica e b) anisotrópica atrás de aberturas em um material de mascaramento .....	30
Figura 4	– Diagrama ilustrativo das principais etapas da formação de biofilmes bacterianos .....	36
Figura 5	– As geometrias de superfície ordenadas orientando a aderência bacteriana e seu padrão espacial. a) esquema do arranjo das bactérias em função da geometria da superfície padronizada. b) Imagem de microscopia eletrônica de varredura em corte transversal de bactérias cultivadas em superfícies estruturadas periodicamente. Montagem espontânea da <i>Bacillus subtilis</i> , c) e d), e <i>Escherichia coli</i> , e) e f), cultivadas nestas superfícies. O espaçamento dos pilares é mais largo em c) e e) do que em d) e f) .....	42
Figura 6	– Energia total de interação entre a célula bacteriana e a superfície, em função da força iônica .....	46
Figura 7	– Procedimentos para o cálculo do parâmetro $R_a$ : obtenção (i) da linha média do perfil, (ii) dos módulos dos desvios em relação a linha média e (iii) da altura média dos módulos ( $R_a$ ) .....	51
Figura 8	– Formas de onda com valores $R_a$ iguais .....	52
Figura 9	– Comparação entre $R_q$ e $R_a$ .....	52
Figura 10	– Exemplos de perfis com diferentes assimetrias ( $R_{sk}$ ) e curva de distribuição de altura .....	54
Figura 11	– Exemplos de perfis com diferentes de curtoses ( $R_k$ ) e curva de distribuição de altura .....	55
Figura 12	– ADF .....	57
Figura 13	– Mecanismo da ACF .....	59

Figura 14 – Exemplos de função de autocorrelação .....	60
Figura 15 – Imagem no domínio real (1ª e 3ª coluna) e recíproco (2ª e 4ª coluna) .....	63
Figura 16 – a) Brócolis romanesco e b) sua imagem ampliada .....	66
Figura 17 – Gráfico da PSD .....	68
Figura 18 – Processo da (a) FASA e (b) FACA .....	69
Figura 19 – Gráfico do método FARMS .....	70
Figura 20 – Esquema das etapas de preparação das amostras .....	72
Figura 21 – Arranjo utilizado para corrosão anisotrópica .....	72
Figura 22 – Exemplo de medida realizada para ângulo de contato .....	74
Figura 23 – Esquema da manipulação das micrografias pelo algoritmo no Mathematica para calcular as funções PSD .....	76
Figura 24 – Espectros de absorção e emissão de fluorescência para os fluoróforos SYTO 9 e iodeto de propídio. As curvas pontilhadas na figura representam os espectros de absorbância para o SYTO 9 (azul) e iodeto de propídio (laranja), enquanto as linhas cheias representam os espectros de emissão de fluorescência .....	79
Figura 25 – Da esquerda para a direita: parte ampliada de uma micrografia por LF-CLSM na lente de 50×, sua imagem em escala de cinza e sua imagem binarizada .....	80
Figura 26 – Mesma região ampliada de micrografias por LF-CLSM na lente de 50× (esquerda), lente de 20× (central) e binarização (direita) da imagem central...	81
Figura 27 – Sequência de <i>layers</i> binarizadas .....	83
Figura 28 – Esquema da obtenção da matriz <i>M</i> . Cada <i>layer</i> é representada por uma matriz binarizada e cada linha da matriz <i>M</i> corresponde a um conjunto de valores ao longo das direções em <i>z</i> , tomados de cima para baixo, conforme indicado pelas setas na figura .....	84
Figura 29 – Esquema da aquisição dos <i>steps</i> .....	86

Figura 30 – Esquema para medição do volume e espessura média (quantidade de biomassa) do biofilme .....	87
Figura 31 – Espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS) do substrato bruto (Si F) e atacado (Si60C15F) .....	88
Figura 32 – Imagens para medida de ângulo de contato das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R .....	89
Figura 33 – Micrografias (80 × 80 μm) obtidas por AFM dos substratos: (a) Si F, (b) e (c) Si60C15F, (d) Si70C60F e (e) Si60C15R. (f) perfis das amostras retirados das posições indicadas pelas linhas amarelas .....	89
Figura 34 – Gráficos das funções de distribuição de amplitude das amostras (a) Si F, (b) e (c) Si60C15F, (d) Si70C60F e (e) Si60C15R. Em (f) são mostradas as funções das imagens (b), (c), (d), e (e), nas cores laranja, verde, azul e vermelho, respectivamente .....	92
Figura 35 – a) Micrografia de AFM do Si F com presença de elementos que influenciam na medida da curtose, (b) Micrografia de AFM do Si60C15F e (c) perfis da amostra Si60C15F com (azul) e sem (vermelho) grandes crateras .....	94
Figura 36 – Micrografia de AFM em 3D da amostra (a) Si F (com presença de elementos que influenciam na medida da curtose), (b) Si60C15F (com grandes crateras), (c) Si70C60F (com grandes pirâmides) e (d) Si60C15R .....	95
Figura 37 – Gráficos das ACF das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R .....	95
Figura 38 – Gráficos dos valores calculados para a dimensão fractal através dos algoritmos FACA, FASA, FAPS e FARMS em comparação com os valores teóricos .....	97
Figura 39 – Gráficos da PSD 1D das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R obtidos através do método FACA .....	98
Figura 40 – Gráficos da PSD 1D das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R obtidos através do método FASA .....	99
Figura 41 – Gráficos da PSD 1D das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R obtidos através do método FAPS .....	99

- Figura 42 – Gráficos das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R obtidos através do método FARMS ..... 100
- Figura 43 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 50× (1190 × 1190 μm), para o tempo de 3 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha; c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios ..... 102
- Figura 44 – Plotagem (1190 × 1190 μm) dos centroides de cinco amostras divididos por faixas de tamanho de área. Os números em vermelhos são as quantidades totais de elementos, enquanto os azuis são as médias e os desvios padrões das distâncias médias dos elementos em cada faixa de cada amostra (em μm). As colunas correspondem às amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 103
- Figura 45 – Gráfico de barras do número de bactérias presentes nas amostras para o tempo 3 h e área de ~1,42 mm<sup>2</sup>, onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 104
- Figura 46 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm), para o tempo de 3 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha, e o asterisco (\*) indica diferença estatística entre essas amostras (p < 0,05); c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios ..... 106

- Figura 47 – Plotagem ( $3600 \times 3600 \mu\text{m}$ ) dos centroides de cinco amostras divididos por faixas de tamanho de área. Os números em vermelhos são as quantidades totais de elementos, enquanto os azuis são as médias e os desvios padrões das distâncias médias dos elementos em cada faixa de cada amostra (em  $\mu\text{m}$ ). As colunas correspondem às amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 107
- Figura 48 – Gráfico de barras do número de bactérias presentes nas amostras para o tempo 3 h e área de  $\sim 13 \text{ mm}^2$ , onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 108
- Figura 49 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento  $50\times$  ( $1190 \times 1190 \mu\text{m}$ ), para o tempo de 5 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos quatro amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha; c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios ..... 109
- Figura 50 – Plotagem ( $1190 \times 1190 \mu\text{m}$ ) dos centroides de quatro amostras divididos por faixas de tamanho de área. Os números em vermelhos são as quantidades totais de elementos, enquanto os azuis são as médias e os desvios padrões das distâncias médias dos elementos em cada faixa de cada amostra (em  $\mu\text{m}$ ). As colunas correspondem às amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 110
- Figura 51 – Gráfico de barras do número de bactérias presentes nas amostras para o tempo 5 h e área de  $\sim 1,42 \text{ mm}^2$ , onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 111

- Figura 52 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm), para o tempo de 5 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos quatro amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha. c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios ..... 112
- Figura 53 – Plotagem (3600 × 3600 μm) dos centroides de quatro amostras divididos por faixas de tamanho de área. Os números em vermelhos são as quantidades totais de elementos, enquanto os azuis são as médias e os desvios padrões das distâncias médias dos elementos em cada faixa de cada amostra (em μm). As colunas correspondem às amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 113
- Figura 54 – Gráfico de barras do número de bactérias presentes nas amostras para o tempo 5 h e área de ~13 μm<sup>2</sup>, onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 114
- Figura 55 – a) parte de uma micrografia por LF-CLSM de um biofilme, b) região ampliada referente ao retângulo vermelho e c) binarização dessa região correspondente em escala de cinza. As barras de escala brancas em a) e b) representam 100 μm ..... 115
- Figura 56 – a) Exemplo de micrografias por LF-CLSM dos biofilmes sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm), para o tempo de 18 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha ..... 115
- Figura 57 – Gráfico de barras da estimativa da quantidade de biomassa presentes nas amostras para o tempo 18 h, onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente ..... 116

Figura 58 – Exemplos de superfície resultante do processamento dos <i>stacks</i> das amostras a) Si F, b) Si60C15F, c) Si70C15F e d) Si60C15R para o tempo de 18 h .....	117
Figura 59 – Exemplos de biofilmes em 3D resultantes do processamento dos <i>stacks</i> das amostras a) Si F, b) Si60C15F, c) Si70C15F e d) Si60C15R para o tempo de 18 h .....	118
Figura 60 – a) Exemplo de micrografias por LF-CLSM dos biofilmes sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm), para o tempo de 26 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha .....	119
Figura 61 – Gráfico de barras da estimativa da quantidade de biomassa presentes nas amostras para o tempo 26h, onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente .....	120
Figura 62 – Exemplos de superfície resultante do processamento dos <i>stacks</i> das amostras a) Si F, b) Si60C15F, c) Si70C15F e d) Si60C15R para o tempo de 26 h .....	121
Figura 63 – Exemplos de biofilmes em 3D resultantes do processamento dos <i>stacks</i> das amostras a) Si F, b) Si60C15F, c) Si70C15F e d) Si60C15R para o tempo de 26 h .....	122
Figura 64 – Exemplo da formação de cristal de sal sobre a superfície de silício (Si70C60F) sob uma visão a) superior e b) inclinada .....	122
Figura 65 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 50× (1190 × 1190 μm), para o tempo de 95 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha; c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios .....	123



Figura 66 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm), para o tempo de 95 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha, e o asterisco (\*) indica diferença estatística entre essas amostras ( $p < 0,05$ ); c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios ..... 124

Figura 67 – Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm) para todos os tempos em estudo ..... 125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Propriedades físicas e químicas do silício .....	29
Tabela 2	– Propriedades gerais das soluções de corrosão anisotrópica .....	31
Tabela 3	– Fatores que influenciam a adesão bacteriana e colonização de superfícies .....	38
Tabela 4	– Nomenclatura das amostras utilizadas com suas respectivas descrições de ataque .....	72
Tabela 5	– Medidas de ângulos de contato para água destilada nas amostras de silício ....	89
Tabela 6	– Valores dos parâmetros de superfície das amostras de silício com diferentes topografias e seus desvios padrões .....	91
Tabela 7	– Valores das dimensões fractais calculados pelos algoritmos no Mathematica	96
Tabela 8	– Valores calculados da dimensão fractal (D) para as amostras de silício pelos métodos FACA, FASA, FAPS e FARMS .....	101
Tabela 9	– Valores médios e seus desvios padrões dos parâmetros das superfícies dos biofilmes formados sobre as amostras de silício com diferentes topografias para o tempo de 18 h .....	117
Tabela 10	– Valores médios e seus desvios padrões dos parâmetros das superfícies dos biofilmes formados sobre as amostras de silício com diferentes topografias para o tempo de 26 h .....	120
Tabela 11	– Valores médios e seus desvios padrões da ocupação de área dados em porcentagem para todos os tempos em estudo .....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACF	<i>Autocorrelation Funcion</i> (Função de Autocorrelação)
ADF	<i>Amplitude Density Function</i> (Função de Densidade de Amplitude)
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (Microscopia de Força Atômica)
AgNP	Nanopartícula de Prata
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (Microscopia Confocal por Varredura a laser)
DFT	<i>Discrete Fourier Transform</i> (Transformada Discreta de Fourier)
DLVO	Teoria de Deryaguin-Landau-Verwey-Overbeek
EDP	Etileno Diamina
EDS	<i>Energy Dispersive Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Energia Dispersiva)
EPS	<i>Extracellular Polymeric substance</i> (Substância polimérica Extracelular)
FACA	<i>Fractal Analysis by Circular Average</i> (Análise Fractal por Média Circular)
FAPS	<i>Fractal Analysis from Power Spectrum</i> (Análise Fractal por Espectro de Potência)
FARMS	<i>Fractal Analysis by Root Mean Square</i> (Análise Fractal por RMS)
FASA	<i>Fractal Analysis by Sections Average</i> (Análise Fractal por Média de Seções)
FD	<i>Fractal Dimension</i> (Dimensão Fractal)
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i> (Transformada Rápida de Fourier)
FT	<i>Fourier Transform</i> (Transformada de Fourier)
LF-CLSM	<i>Large-Field Confocal Laser Scanning Microscopy</i> (Microscopia Confocal por Varredura a laser em campo amplo)
MEMS	<i>Micro-Electro-Mechanical Systems</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PSD	<i>Power Spectral Density</i> (Densidade Espectral de Potência)
RMS	<i>Root Mean Square</i> (Rugosidade Média Quadrática)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopia Eletrônica de Varredura)
SoIBIN	<i>Solid-Biological Interface Group</i>

TMAH	Tetra-Metil Hidróxido de Amônio
XDLVO	Teoria de Deryaguin-Landau-Verwey-Overbeek estendida
XPS	<i>X-ray Photoemission Spectroscopy</i> (Espectroscopia de fotoelétrons por raios X)

## LISTA DE SÍMBOLOS

Si	Silício
$E_F$	Energia de Fermi
$\gamma_{sb}$	Energia livre da interface sólido-bactéria
$\gamma_{bl}$	Energia livre da interface bactéria-líquido
$\gamma_{sl}$	Energia livre da interface sólido-líquido
$U^{LW}$	Energia de interação Lifshitz-van der Waals
$U^{EL}$	Energia de interação eletrostática
$U^{AB}$	Energia de interação ácido-base de Lewis
$R_a$	Rugosidade média
$R_q$	Rugosidade média quadrática
$l$	Comprimento do perfil
$z$	Altura em relação a linha média (ou plano médio)
$rms$	Rugosidade média quadrática
$n$	Número de pontos (pixels)
$R_{sk}$	Assimetria
$R_k$	Curtose
$p(z)$	Função de densidade de amplitude
$G(\tau)$	Função de autocorrelação
$\tau$	Deslocamento lateral
$\xi$	Comprimento de correlação
$C(q)$	Densidade espectral de potência
$f$	Frequência
$F(u)$	Transformada de Fourier
$q$	Número de onda
$\lambda$	Comprimento de onda
$D$	Dimensão Fractal
$\beta$	Coefficiente angular da reta
$H$	Parâmetro de Hurst
$dZ$	Espessura da fatia ótica
$p$	Passo
$N$	Número de <i>steps</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	26
<b>2.1</b>	<b>Silício</b> .....	26
<b>2.1.1</b>	<i>A química do silício</i> .....	27
<b>2.1.2</b>	<i>Corrosão Anisotrópica do Silício</i> .....	30
<b>2.2</b>	<b>Biofilme</b> .....	33
<b>2.2.1</b>	<i>Adesão bacteriana</i> .....	37
<b>2.3</b>	<b>Rugosidade de superfície</b> .....	48
<b>2.3.1</b>	<i>Rugosidade Média (<math>R_a</math>)</i> .....	49
<b>2.3.2</b>	<i>Rugosidade média quadrática (rms ou <math>R_q</math>)</i> .....	52
<b>2.3.3</b>	<i>Assimetria (<math>R_{sk}</math>)</i> .....	53
<b>2.3.4</b>	<i>Curtose (<math>R_k</math>)</i> .....	54
<b>2.4</b>	<b>Funções para caracterizações de superfícies</b> .....	55
<b>2.4.1</b>	<i>Função de densidade de amplitude (ADF ou <math>p(z)</math>)</i> .....	56
<b>2.4.2</b>	<i>Função de autocorrelação (ACF ou <math>G(\tau)</math>)</i> .....	58
<b>2.4.3</b>	<i>Densidade espectral de potência (PSD ou <math>C(q)</math>)</i> .....	61
<b>2.5</b>	<b>Métodos para análise de fractalidade de superfícies</b> .....	67
<b>2.5.1</b>	<i>Análise fractal por espectro de potência (FAPS)</i> .....	67
<b>2.5.2</b>	<i>Análise fractal por média de seções (FASA)</i> .....	69
<b>2.5.3</b>	<i>Análise fractal por média circular (FACA)</i> .....	69
<b>2.5.4</b>	<i>Análise fractal por RMS (FARMS)</i> .....	70
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	71
<b>3.1</b>	<b>Materiais</b> .....	71
<b>3.2</b>	<b>Preparação dos substratos de silício</b> .....	71
<b>3.3</b>	<b>Caracterização das superfícies com diferentes topografias</b> .....	73
<b>3.3.1</b>	<i>Microscopia de força atômica (AFM)</i> .....	73
<b>3.3.2</b>	<i>Avaliação de ângulos de contato</i> .....	73
<b>3.3.3</b>	<i>Espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS)</i> .....	74
<b>3.3.4</b>	<i>Cálculos de parâmetros da superfície</i> .....	74
<b>3.4</b>	<b>Incubação com suspensão bacteriana</b> .....	77
<b>3.4.1</b>	<i>Avaliação de influência da topografia na adesão bacteriana</i> .....	77

3.5	<b>Análise por microscopia confocal por varredura a laser em campo amplo (LF-CLSM)</b> .....	78
3.6	<b>Processamento das imagens obtidas por LF-CLSM</b> .....	80
3.6.1	<i>Processamento de imagens dos Biofilmes obtidas por CLSM</i> .....	82
4	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	88
4.1	<b>Caracterização das superfícies</b> .....	88
4.1.1	<i>Análise da fractalidade</i> .....	96
4.2	<b>Análise da adesão e crescimento bacteriano sobre as superfícies</b> .....	101
4.2.1	<i>Análise para o tempo de 3 h de incubação</i> .....	101
4.2.2	<i>Análise para o tempo de 5 h de incubação</i> .....	108
4.2.3	<i>Análise para o tempo de 18 h de incubação</i> .....	114
4.2.4	<i>Análise para o tempo de 26 h de incubação</i> .....	118
4.2.5	<i>Análise para o tempo de 95 h de incubação</i> .....	122
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	129
6	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	131
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	132
	<b>APÊNDICE A – ALGORITMOS PARA FUNÇÃO DE CORRELAÇÃO E COMPRIMENTO DE CORRELAÇÃO</b> .....	142
	<b>APÊNDICE B – ALGORITMOS PARA PSD E RMS, E CÁLCULO DA FRACTALIDADE PELOS MÉTODOS FAPS, FASA, FACA E FARMS</b> .....	143
	<b>APÊNDICE C – ALGORITMOS PARA CÁLCULOS DAS IMAGENS DE CLSM</b> .....	150
	<b>APÊNDICE D – ALGORITMOS PARA PROCESSAMENTO DOS STACKS DOS BIOFILMES</b> .....	154

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos que colaborem com o entendimento da adesão e crescimento bacteriano em superfícies tem sido motivo de grande apelo. Em todo o mundo, as bactérias tem sido cada vez mais motivo de grande preocupação. Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou pela primeira vez uma lista com as bactérias antibiótico-resistentes que representam a maior ameaça para a saúde humana. A lista classifica 12 bactérias ou famílias de bactérias, dentre as quais a espécie *Staphylococcus aureus* aparece na quinta colocação, sendo a mesma citada como resistente a meticilina e vancomicina. Os pesquisadores relatam que a lista é um lembrete útil do perigo que as bactérias, que estão se tornando resistentes a antibióticos, representam. Um dado alarmante é que bactérias resistentes a antibióticos matam anualmente cerca de 700 mil pessoas em todo o mundo, e alguns especialistas preveem que este número poderá aumentar para 10 milhões em 2050 se não forem feitos esforços para reduzir a resistência das bactérias aos antibióticos existentes ou para o desenvolvimento de novos antibióticos (O'NEILL, 2014, 2016; WILLYARD, 2017).

Neste contexto, são necessários e de suma importância estudos que visam o desenvolvimento de estratégias para entender/combater os problemas ocasionados pelas bactérias. Dentre essas estratégias estão o desenvolvimento de novos antibióticos, de superfícies antibacterianas ou ainda de superfícies antiaderentes. No desenvolvimento de tais superfícies, o papel da topografia é extremamente importante. Entretanto, seu papel na adesão e crescimento bacteriano ainda não está totalmente claro e apresenta controvérsias. Parte disso se deve a uma caracterização simplista de tais topografias.

Entender como as células e as bactérias se aderem e crescem em superfícies sólidas é uma das propostas de estudo do *Solid-Biological Interface Group* (SolBIN)<sup>1</sup>, um grupo de pesquisa inserido no Departamento de Física da UFC idealizado e coordenado pelo professor Dr. Amauri Jardim de Paula. O SolBIN busca estudar os múltiplos aspectos e fenômenos manifestados na interface entre superfície sólidas e componentes biológicos, através de uma abordagem multidisciplinar. Além da proposta já citada, outras questões de grande relevância para a comunidade científica são exploradas, tais como: (i) como obter colóides estáveis e revestimentos superficiais de nanopartículas inorgânicas que resultam em bioefeitos potencializados? (ii) que interações se manifestam quando nanopartículas encontram fluidos

---

<sup>1</sup> Maiores detalhes sobre o grupo como pesquisadores, colaboradores, infraestrutura, publicações, entre outros, podem ser encontrados no site: [www.solbin.com.br](http://www.solbin.com.br)



biológicos? (iii) como as nanopartículas organizam e agem em sistemas biológicos em grandes escalas de comprimento? O presente trabalho avaliou o processo de adesão e crescimento bacteriano da bactéria *Staphylococcus aureus* em resposta à topografia de superfície modificada em substratos de silício, avaliado em ampla escala de comprimento (de nanômetro a milímetro), com o intuito de contribuir na compreensão de tais processos nas escalas superiores, o que pode favorecer para novas estratégias de prevenção de contaminação por bactérias.

O objetivo geral desse trabalho é o *design* e caracterização precisa de superfícies modelo, com controle da topografia, objetivando entender como a topografia está correlacionada com o processo de adesão e crescimento de biofilmes bacterianos. Para isso, objetiva-se gerar métodos analíticos, matemáticos e computacionais que permitam uma caracterização precisa de superfícies sólidas, bem como a avaliação da quantidade e distribuição das bactérias, aglomerados, colônias e formação de biofilmes sobre superfícies sólidas, em ampla escala de comprimento.

Os objetivos específicos consistem em avaliar e padronizar as melhores condições de ataque da superfície de silício em solução de KOH e controlar o padrão de rugosidade, caracterizar precisamente a superfície em relação a sua topografia através da técnica de microscopia de força atômica (AFM), desenvolver algoritmos para calcular fractalidade e comprimento de correlação das imagens das superfícies obtidas por AFM, verificar a adesão e crescimento bacteriano em superfícies de silício com diferentes topografias através da técnica de microscopia ótica confocal em ampla escala (LF-CLSM), desenvolver algoritmos para processar as imagens em ampla escala obtidas por LF-CLSM e analisar a quantidade, distribuição e distância média de bactérias, aglomerados, colônias e biofilmes, bem como a ocupação de área total das superfícies, e por fim, desenvolver algoritmos para processar os *stacks* obtidos por CLSM e analisar a quantidade de biomassa e volume de biofilmes.

No capítulo 2 deste trabalho é feita uma revisão bibliográfica onde inicialmente é apresentado um breve histórico do elemento silício: descobrimento, obtenção, importância, utilizações, química, propriedades e seu processo de corrosão anisotrópica. Em seguida, é feita uma descrição a respeito dos biofilmes: o que são, primeiros relatos, etapas de formação, vantagens para as bactérias presentes nos biofilmes, problemas ocasionados por biofilmes indesejáveis e estratégias para a redução ou eliminação da formação dos mesmos. Além disso, é discutido o processo de adesão bacteriana, bem como sua dependência em termos de fatores ambientais, biológicos e relacionados à superfície, onde é destacada a influência da rugosidade superficial no processo de adesão. Essa rugosidade superficial é discutida em maiores detalhes, sendo apresentada as definições de alguns parâmetros utilizados para sua caracterização

(rugosidade média, rugosidade média quadrática, assimetria e curtose), bem como a utilização de algumas “curvas” (funções) que podem ser usadas para auxiliar nessa caracterização. Por fim, são descritos métodos para análise de fractalidade das superfícies.

O capítulo 3 consiste dos materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho. Inicialmente, são descritos os processos de limpeza e ataques das amostras de silício com KOH em condições controladas para obtenção de diferentes topografias de superfícies. Também é descrita a caracterização das amostras, juntamente com os principais parâmetros de operação para cada técnica utilizada. Em seguida, é descrita a obtenção dos parâmetros de superfície, sendo abordados os algoritmos desenvolvidos e explicadas as principais partes e os processamentos de imagem. Posteriormente, é relatada a forma de incubação das amostras de silício com suspensão bacteriana para avaliar a influência da topografia na adesão e crescimento bacteriano, seguida pela descrição da aquisição de imagens e *stacks* obtidos com microscopia confocal. Por fim, é abordado o processamento dessas imagens e *stacks* através dos algoritmos desenvolvidos para avaliação dos efeitos da topografia na adesão e crescimento bacteriano e formação de biofilmes.

No capítulo 4 são apresentados os resultados e discussões do presente trabalho. Inicialmente, são mostradas micrografias de AFM das amostras utilizadas, sendo possível observar os efeitos dos ataques sobre as superfícies com KOH nas condições adotadas. Também são apresentados os valores dos parâmetros das superfícies, bem como os gráficos das funções utilizadas para caracterizações das mesmas. Medidas dos ângulos de contato e gráficos de XPS das superfícies também são apresentados. Posteriormente, são mostrados os resultados para os testes dos algoritmos e as análises da fractalidade das superfícies. Por fim, são apresentados os resultados da análise para os diferentes tempos de incubação das amostras em suspensão bacteriana, sendo os resultados obtidos comparados com alguns resultados relatados na literatura.

O capítulo 5 consiste das conclusões desse trabalho, sendo listadas as principais e destacando o potencial da abordagem utilizada, usada em uma ampla escala de comprimento, a qual pode ser empregada para diversos tipos de superfícies com diferentes tipos de topografias e que possuem importância científica ou tecnológica. Por fim, o capítulo 6 apresenta as perspectivas do mesmo, como o uso dessa abordagem utilizada em outras amostras de alto interesse e utilização.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Silício

Um dos elementos mais abundante do universo (perdendo apenas para o hidrogênio, hélio, neônio, oxigênio, nitrogênio e carbono), e o segundo elemento mais abundante da Terra (superado apenas pelo oxigênio), o silício (Si) constitui 25,7% da massa da crosta terrestre e é, sem dúvida, um dos elementos mais estudados e utilizados pelo homem (a areia e argila são os principais componentes do tijolo, conhecido e utilizado há cerca de dez mil anos, bem como do concreto). Entretanto, em sua forma elementar, o silício não ocorre na natureza, sendo encontrado na forma de compostos, como por exemplo, em praticamente todas as rochas, areias, barros e solos. Devido à sua estrutura eletrônica muito peculiar, o silício é de suma importância para a indústria eletrônica. Ele é também bastante utilizado na indústria metalúrgica como agente redutor e na produção de ligas de aços, latões e bronzes. Na forma de sílica (SiO<sub>2</sub>; areia), é empregado na fabricação de materiais refratários. Na fase de quartzo (SiO<sub>2</sub>), o óxido de silício é utilizado na fabricação de vidros especiais, como os boro-silicatos (tipo Pyrex®), bem como em esmaltes, vernizes especiais e cerâmicas variadas. O quartzo tem a propriedade de ser um piezelétrico e por isso é usado na fabricação de radares, relógios entre outros. Os compostos do silício existem em todas as águas naturais, na atmosfera (como poeira), em muitas plantas, em tecidos e fluidos orgânicos de alguns animais, e nos esqueletos, inclusive no humano (DABROWSKI; MUSSING, 2000; PEIXOTO, 2001).

Em 1800 iniciou-se o estudo científico do silício, quando Humphry Davy sugeriu que a sílica era um composto (hoje conhecido como óxido de silício, SiO<sub>2</sub>). O isolamento do elemento Si é usualmente atribuído ao químico sueco Jöns Jacob Berzelius, que em 1824 obteve Si amorfo por aquecimento de potássio com tetraflureto de silício. Em sua forma cristalina, somente foi obtido pela primeira vez em 1854 por Henri Sainte-Claire Deville (DABROWSKI; MUSSING, 2000). No início do século XX o estudo da interação entre a sílica e carbono possibilitou o desenvolvimento do principal processo de obtenção de silício puro empregado até os dias de hoje, que consiste em reagir quartzito com carbono, na forma de carvão, em um forno de arco a 2000 °C, conforme a reação (SAUL, 2004):



A partir de sua obtenção em alta pureza, o silício possibilitou uma revolução na informática e nas telecomunicações, fornecendo o material básico para dispositivos microeletrônicos baratos (DABROWSKI; MUSSING, 2000). Além disso, atualmente, com a

forte tendência de substituição de energia de origem fóssil por fontes de energia renovável tendo como principal objetivo a redução do impacto ambiental (redução da emissão de CO<sub>2</sub>, relacionado com o aquecimento global e mudanças climáticas), o silício vem sendo consagrado como o material utilizado na produção de células solares, aproveitando a energia solar e convertendo em energia elétrica através do efeito fotovoltaico nessas células (MORI et al., 2007).

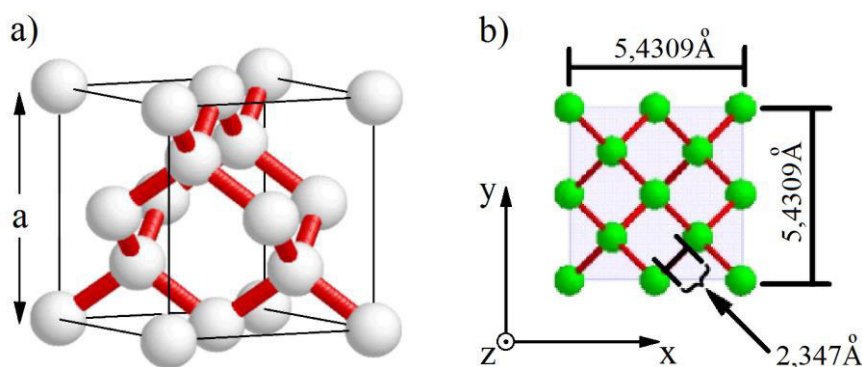
No universo de aplicações do silício, além das já citadas, substratos de silícios, dopados ou não dopados, são utilizados com diversas finalidades em diferentes áreas em função de sua homogeneidade estrutural e morfológica, baixa condutividade elétrica e também por serem substancialmente inertes, servindo como “substratos” em inúmeros experimentos. Em alguns casos esses substratos podem ser utilizados sem tratamento algum, podendo, por exemplo, servir como modelo para estudo de nanorecobrimentos de nanopartículas (SOUSA et al., 2017). Em outros, os tratamentos não só são necessários, como também objeto de estudos a fim de verificar respostas específicas, como por exemplo, estudos de adesão e crescimento de células diretamente sobre o substrato modificado (SCHEUERMAN et al., 1998; GENTILE et al., 2010, 2013), ou servindo de base estruturada para deposição de filmes nos quais são avaliados crescimento e adesão celulares sobre os mesmos (WHITEHEAD et al., 2005; HOU et al., 2011). Substratos de silícios podem ainda ser funcionalizados através de um processo chamado silanização, no qual usam-se organossilanos, como por exemplo, o 3-aminopropiltrimetoxilano (APTMS - NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Si(OCH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) ou o 3-aminopropiltriethoxilano (APTES - NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>), com a finalidade de conjugar ou imobilizar compostos ou grupos quimicamente ativos, viabilizando a obtenção de sensores, catalisadores, dispositivos de energia solar e dispositivos eletrônicos (HOWARTER; YOUNGBLOOD, 2006; ANDRESA, 2007; DEMIREL et al., 2007; CHAUHAN et al., 2008; PASTERNAK et al., 2008; ACRES et al., 2012; JAKŠA et al., 2014; NORONHA et al., 2017).

### ***2.1.1 A química do silício***

Em seu estado livre, o silício (Si) é um sólido cinza-escuro, duro, de brilho metálico e estrutura cristalina semelhante à do diamante, conforme podemos observar na Figura 1. Apesar de seu brilho metálico ele é um mau condutor de eletricidade à temperatura ambiente, embora seja um semicondutor. Essencialmente, a química do Si tem similaridade com a do carbono, nos quais os quatro elétrons de seus orbitais de valência (3s<sup>2</sup>3p<sup>2</sup> para o Si) permitem a hibridação (do tipo sp<sup>3</sup>) e formação de ligações de caráter covalente. Apesar de formar binários

como o hidrogênio (os silanos:  $\text{Si}_2\text{H}_6$ ,  $\text{SiH}_4$ , etc.) e com os halogênios (por exemplo, o tetracloreto de silício ( $\text{SiCl}_4$ )), esses compostos tendem a se converter em dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) na presença de ar. A química de seus oxicompostos, o dióxido de silício e os silicatos, representam, sem dúvida, a maior parte da química do Si (RUSSEL, 1994). Na Tabela 1 podemos ver os valores das principais propriedades físicas e químicas do Si.

Figura 1 - a) Representação da estrutura cristalina do Si (estrutura tipo diamante) e b) Parâmetros de rede do Si



Fonte: Júnior (2008).

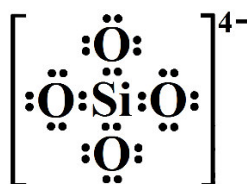
Na tabela periódica encontramos o silício no grupo IVA, o mesmo grupo do carbono, justificando algumas propriedades químicas semelhantes às do carbono: relativamente inerte à temperatura ambiente, e experimenta com o aquecimento um notável aumento de sua reatividade com os halogênios (flúor, cloro, bromo e iodo) e com certos metais. Três isótopos do silício são conhecidos e encontrados na natureza, o silício 28, que constitui 92,2% do elemento encontrado na natureza, o silício 29 (4,7%) e o silício 30 (3,1%) (MORI et al., 2007). Assim como o carbono, o silício pode formar quatro ligações, de caráter covalente, estáveis, com ele mesmo e com outros elementos, além de formar compostos estáveis tetra, penta e hexacoordenados com N, C e O (RAMPELOTTO, 2012). Porém, ao contrário do carbono o silício não forma dupla ligação com o oxigênio. Em vez disso, muitos compostos de silício e oxigênio apresentam hibridação  $sp^3$  dos elétrons de valência do Si, com ligações tetraédricas dos quatro átomos de oxigênio que rodeiam cada átomo de silício. A mais simples dessas estruturas é a do íon ortossilicato,  $\text{SiO}_4^{4-}$  (ver Figura 2) (RUSSEL, 1994).

Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas do silício

Propriedade	Valor	Observação
<b>Peso atômico</b>	28.0855 g	
<b>Isótopos</b>	28 – 92,23% 29 – 4,67% 30 – 3,10%	
<b>Número atômico</b>	14	
<b>Distribuição eletrônica</b>	$1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^2$	
<b>Raio atômico</b>	177 pm	Ligação covalente
<b>Raio iônico</b>	40 pm	
<b>Densidade</b>	2,33 g/cm <sup>3</sup>	Sólido
<b>Densidade atômica</b>	$4,995 \times 10^{22} / \text{cm}^3$	
<b>Densidade de átomos superficiais</b>	(100) $6,78 \times 10^{14} / \text{cm}^3$ (110) $9,59 \times 10^{14} / \text{cm}^3$ (111) $7,83 \times 10^{14} / \text{cm}^3$	
<b>Número de átomos por célula unitária</b>	8	
<b>Estrutura cristalina</b>	Diamante	
<b>Constante de rede cristalina</b>	5,431 Å	
<b>Comprimento da ligação</b>	2,35 Å	
<b>Condutividade térmica</b>	1,412 W/cm.K	Sólido
<b>Calor específico</b>	0,70 J/g.K	
<b>Capacidade térmica molar</b>	20,00 J/mol.K	
<b>Ponto de fusão</b>	1683 K	
<b>Ponto de ebulição</b>	2628 K	
<b>Temperatura crítica</b>	5159 K	

Fonte: Saul (2004).

Figura 2 – Representação do íon ortossilicato



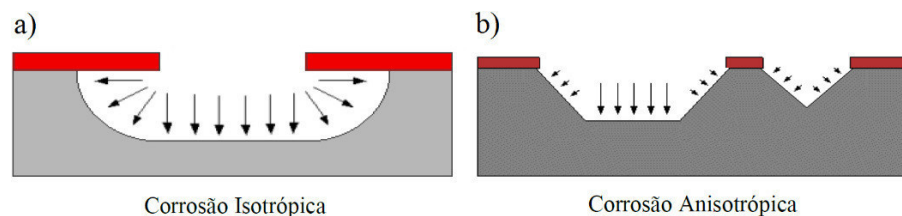
Fonte: Russel (1994).

De modo geral o silício é muito inerte, não sendo atacado pelos ácidos comuns. Porém uma mistura de ácido nítrico com ácido fluorídrico consegue dissolvê-lo. Também pode ser dissolvido em altos pHs e não entra em combustão na atmosfera (a reação  $\text{Si} + \text{O}_2 \rightarrow \text{SiO}_2$  só ocorre acima de  $900\text{ }^\circ\text{C}$ ), entretanto, na presença de flúor o silício é inflamável, e produz óxido (MORI et al., 2007). A princípio o silício pode sofrer processo de corrosão anisotrópica através de todos os hidróxidos alcalinos, dentre eles os mais empregados são o NaOH e o KOH, por sua facilidade de obtenção, baixo custo e reduzida toxicidade (SAUL, 2004). Neste presente trabalho utilizou-se o hidróxido de potássio (KOH) para modificação de sua topografia.

### 2.1.2 Corrosão Anisotrópica do Silício

A corrosão na superfície do silício pode ser anisotrópica ou isotrópica (ver Figura 3), as quais podem ser realizadas por processos a seco (em plasma) ou em processos úmidos (em solventes). Em uma corrosão isotrópica úmida o silício é corroído na mesma velocidade em todas as direções (Figura 3a). O mesmo não ocorre em uma corrosão anisotrópica úmida, na qual a taxa de corrosão depende da direção (Figura 3b), ou seja, a dissolução dos cristais tem taxas diferentes, associadas às diferentes direções cristalográficas do Si (JÚNIOR, 2008). A corrosão anisotrópica úmida do silício é uma técnica de suma importância para fabricação e desenvolvimento de sistemas micro-eleto-mecânicos, os chamados MEMS (*micro-electro-mechanical systems*), uma vez que permite uma precisão tridimensional e fabricação de estruturas auto-sustentadas que ficam suspensas no ar e que são aplicadas na fabricação de sensores, atuadores e microssistemas (JÚNIOR, 2008; SILVA, 2008)

Figura 3 – a) Corrosão isotrópica e b) anisotrópica atrás de aberturas em um material de mascaramento



Fonte: Júnior (2008).

A anisotropia em uma corrosão úmida é observada quando são utilizadas soluções alcalinas como KOH, NaOH, e LiOH, e também o CsOH e NH<sub>4</sub>OH, sendo que as soluções de hidróxido de potássio (KOH) são as mais utilizadas em diversas concentrações e temperatura

(SEIDEL et al., 1990a; ZUBEL; BARYCKA, 1998; POWELL; HARRISON, 2001; SAUL, 2004). Um dos primeiros estudos a mencionar o uso de solução a base de KOH foi publicado na década de 70 por Bean (1978). Posteriormente na década de 90 o trabalho de Seidel *et al.* (1990a) desenvolveu um dos mais completos estudos sobre anisotropia e taxas de corrosão em função da concentração e da temperatura da solução. Estes resultados obtidos são citados mundialmente, tornando este artigo uma das principais referências quando se fala em corrosão anisotrópica de silício (SAUL, 2004). Outras soluções podem ser utilizadas para o processo de corrosão anisotrópica, sendo que essas soluções apresentam vantagens e desvantagens específicas. Dentre as mais conhecidas estão soluções à base de Etileno Diamina (EDP), de Tetra-Metil Hidróxido de Amônio (TMAH) e à base de Hidrazina. Soluções de EDP são muito tóxicas (trata-se de um produto carcinogênico), e possuem custo elevado. A Hidrazina, assim como as soluções de EDP, tem seu uso restrito pois, além de ser muito tóxica, é um composto explosivo (trata-se de um oxidante muito poderoso, comumente empregado como combustível líquido de foguetes), e assim exigindo muito cuidado no manuseio. Já o composto TMAH é bastante usado (é um dos compostos presentes nas soluções de revelação de fotoresiste empregados no processo de litografia), mas apresenta baixa taxa de corrosão, baixo grau de anisotropia, e gera superfícies com qualidade insatisfatória em muitos casos, além de um custo elevado (SAUL, 2004; SILVA, 2008). A Tabela 2 mostra a comparação de algumas propriedades de soluções que podem ser utilizadas para corrosão anisotrópica do silício.

Tabela 2 - Propriedades gerais das soluções de corrosão anisotrópica

Propriedades	Hidrazina	EDP	KOH	TMAH
<b>Anisotropia</b>	Baixo	Médio	Alto	Baixo
<b>Seletividade para SiO<sub>2</sub></b>	Alta	Alta	Alta	Alta
<b>Seletividade para Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub></b>	Alta	Alta	Altíssima	Alta
<b>Qualidade de corrosão</b>	Média	Boa	Boa	Média
<b>Taxa de corrosão</b>	Alta	Baixa	Alta	Baixa
<b>Compatibilidade CMOS</b>	Não	Sim	Não	Sim
<b>Ataque ao Al</b>	Médio	Baixo	Alto	Baixo
<b>Custo</b>	Médio	Alto	Baixo	Alto
<b>Toxicidade</b>	Alta	Alta	Baixa	Alta
<b>Descarte</b>	Difícil	Difícil	Fácil	Fácil

Fonte: Adaptado de Silva (2008).



Não há um modelo bem definido que explique precisamente as taxas de corrosão observadas para o Si. Além disso, há muitos dados conflitantes na literatura. Isto se deve ao fato que há muitos parâmetros em questão, influenciando resultados individuais. Dentre esses parâmetros, além da temperatura e concentração de KOH já citados, podemos citar também: tempo de tratamento, agitação, concentração de dopantes no silício, adição de álcool ou outros agentes orgânicos, defeitos de superfície, pH e influência de cátions. Devido a essa quantidade de parâmetros que influenciam a corrosão, muitos modelos explicando a anisotropia das taxas de corrosão foram propostos (SILVA, 2008).

Segundo Elwenspoek *et al.* (1994), o grau de uniformidade atômica das superfícies é responsável pela anisotropia das taxas de corrosão. Basicamente, os autores dizem que superfícies uniformes (por exemplo a superfície 111) tem a cinética controlada por uma barreira de nucleação que não ocorre nas superfícies não uniformes. Sendo assim, irá ser corroída com uma velocidade muito menor. Já Price (1973) propõe que as taxas de corrosão se correlacionam com a densidade de ligações pendentes nos planos, ou seja, quanto maior o número de ligações pendentes maior a taxa de corrosão. Porém, Kendall (1979) comenta que apenas a densidade de ligações pendentes não explicam a magnitude anisotrópica, as quais não se diferem por um fator maior que 2. O mesmo explica a baixa taxa de corrosão dos planos {111} com base na sua maior velocidade de oxidação, comparada com os outros planos. Considerando que se oxidando mais rapidamente esses planos podem estar mais protegidos contra a corrosão, as taxas de oxidação seguem a razão  $\{111\} > \{110\} > \{100\}$ , e as taxas de corrosão geralmente seguem a ordem inversa. Nos sistemas KOH-H<sub>2</sub>O, geralmente a sequência de corrosão é  $\{110\} > \{100\} > \{111\}$ . Essas três famílias de planos são as mais importantes nas aplicações tecnológicas envolvendo Si (SILVA, 2008).

O modelo de Glembocki e Stahlbush (1985) converge com o modelo de Kendall (1979) e o completa citando que, devido às ligações pendentes paralelas à superfície serem mais fáceis de oxidar do que as ligações em ângulo, as energias de ativação da oxidação da superfície deve aumentar com a seguinte razão:  $\Delta E_{100} > \Delta E_{111} > \Delta E_{311} > \Delta E_{110}$ . Este modelo se baseia na eletronegatividade do grupo hidroxila, e descreve que os grupos OH ligados ao silício na superfície podem deixar o substrato, deixando o silício susceptível à ataques nucleofílicos por outros radicais OH<sup>-</sup> da solução. Esse processo é mais intenso na superfície (100) que tem 2 grupos OH<sup>-</sup> ligados, sendo que a superfície (111) tem apenas 1. A diferença entre a susceptibilidade a esse ataque nucleofílico se manifesta através da energia de ativação, e teria um efeito exponencial nas taxas de corrosão das superfícies (100) e (111) (SILVA, 2008).

Um modelo que merece destaque é o de Seidel *et al.* (1990, 1990a, 1990b) que

converge com o de Glembocki e Stahlbush (1985), e descreve o processo de corrosão anisotrópica baseado na diferença nos níveis de energia para as diferentes orientações do cristal (SILVA, 2008).

## 2.2. Biofilme

De forma geral, as bactérias existem em dois tipos de organização ou estado: (i) planctônico (livres, existente em solução a granel ou sésil, como uma unidade ligada a uma superfície) ou então (ii) dentro dos limites de um biofilme (composto basicamente por células bacterianas e substâncias poliméricas extracelulares (EPS)). Por muito tempo, foi idealizado as bactérias como organismos unicelulares vivendo sozinhos em um meio líquido ou em uma superfície. Entretanto, os biofilmes representam a forma de organização prevalente das bactérias na maioria dos ambientes naturais: estima-se que cerca de 99% das células bacterianas existentes vivem em biofilmes em vários estágios de crescimento. Em 1674 o comerciante Antonie van Leuwenhoek, usando seu microscópio primitivo, porém eficaz, observou pela primeira vez agregados de microrganismos enxameando sobre matéria viva e morta. Posteriormente, descobriu esses microrganismos no tártaro em seus próprios dentes. Tratava-se, portanto, dos primeiros relatos da existência de biofilmes. Entretanto, há evidências de formação de biofilme bacterianos em fósseis de 3 bilhões de anos, o que sugere que tais forma de vida promoviam a sobrevivência nas extremas condições ambientais da Terra primitiva. Com os avanços da tecnologia e das práticas laboratoriais, surgiram descrições mais precisas dos biofilmes, embora ainda nos dias atuais haja ambiguidade, uma vez que as características fundamentais são frequentemente mantidas (RASMUSSEN, 2000; GARRETT et al., 2008; PERCIVAL et al., 2011; DÍAZ et al., 2015; FENG et al., 2015).

De uma forma geral, o biofilme é descrito como um aglomerado de células microbianas que está irreversivelmente associado (não podendo ser removido por enxágue suave) com uma superfície e situando-se em uma matriz essencialmente composta de polissacarídeos. Alguns materiais não-celulares como cristais minerais, partículas de corrosão, partículas de argila e sedimentos ou componentes sanguíneos podem ser encontrados no biofilme, dependendo do ambiente no qual o mesmo se desenvolve. O estado de biofilme também difere das suas contrapartes planctônicas (suspensas livremente) em relação aos genes que são transcritos. A formação dos biofilmes pode ocorrer nos mais variados tipos de superfícies, como em tecidos vivos, dispositivos médicos permanentes, sistemas de encanamento de água ou sistemas aquáticos naturais (DONLAN, 2002).

O crescimento do biofilme é governado por uma série de fatores químicos, físicos e biológicos. O requisito primário para o crescimento do biofilme envolve um substrato. Entretanto, sem água, a motilidade bacteriana e a disponibilidade de nutrientes são reduzidas, e as pressões osmóticas tornam-se menos viáveis para a maioria das bactérias. A adesão (interação atrativa entre uma célula a um substrato) e a coesão (interação atrativa célula-célula) são os mecanismos por trás dessas formas de interação e determinam as propriedades aderentes e coesivas que um biofilme exibirá (GARRETT et al., 2008).

O primeiro passo no desenvolvimento do biofilme sobre superfícies abióticas é o contato inicial entre a bactéria e a superfície. A adesão microbiana inicial desempenha o papel chave na incrustação nessas superfícies e acontece em duas etapas: adesão inicial e posteriormente uma fase de ancoragem (ver, Figura 4). Vale ressaltar que alguns autores incluem ainda uma etapa de condicionamento da superfície anterior a adesão inicial, na qual moléculas orgânicas (principalmente proteínas e polissacarídeos) e inorgânicas ligam-se à superfície, ou por força gravitacional ou por movimento do fluido, modificando sua energia superficial e aumentando as possibilidades de colonização bacteriana. Na fase de adesão inicial, acontece o primeiro contato entre uma superfície condicionada e os microrganismos. Porém, antes que uma adesão mais forte ocorra, esse processo é reversível e os microrganismos podem ser removidos da superfície por forças de cisalhamento. Várias forças físicas atuam sobre as bactérias fazendo com que elas se movam para uma superfície: forças intrínsecas ao movimento browniano, forças de atração de van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e forças gravitacionais. Além disso, fatores como energia disponível, funcionalidade superficial, orientação bacteriana, temperatura e condições de pressão são variáveis ambientais locais que contribuem para a adesão bacteriana. Se as forças repulsivas forem maiores que as forças atrativas, as bactérias se separarão da superfície (GARRETT et al., 2008; ANSELME et al., 2010; MORIARTY et al., 2011; MEBERT et al., 2016).

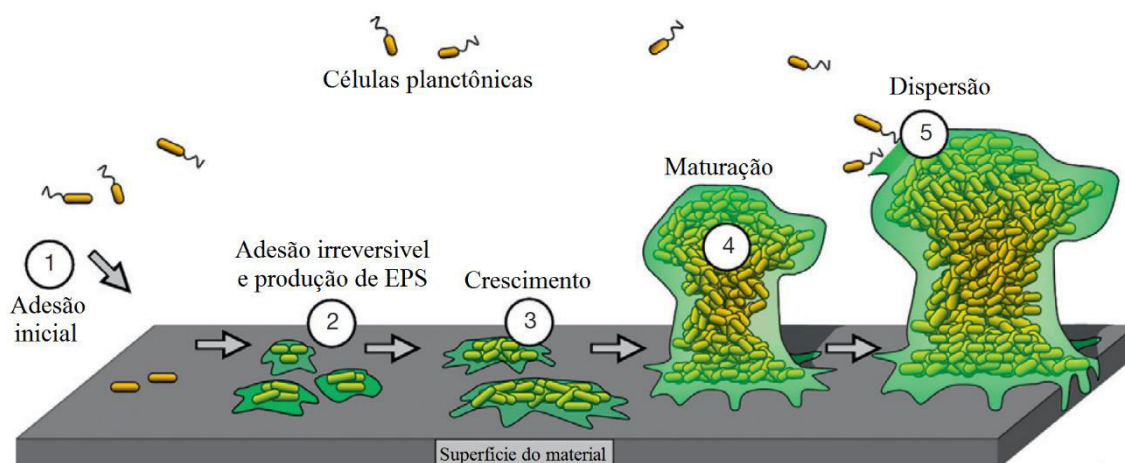
Uma vez aderidas, fatores químicos ligados à superfície (por exemplo, aminoácidos, açúcares, oligopeptídeos (peptídeo feito com poucos aminoácidos)) guiam o movimento haptotático (migração mediada por constituintes de adesão celular da matriz extracelular) das bactérias na superfície. Depois disso, inicia-se então a segunda fase de adesão (fase de ancoragem), que começa pela ligação molecular entre adesinas (complexos proteicos) bacterianas e a superfície. Microrganismos que não estão ligados fortemente podem fortalecer sua adesão pela produção de exopolissacarídeos, que interagem com a superfície do material ou por ligantes específicos a receptores localizados no pili, fimbrias e fibrilas. Ao final desta segunda etapa, a adesão torna-se irreversível na ausência de intervenção física ou química

externas, e o organismo é firmemente preso à superfície. Uma vez que as bactérias estão irreversivelmente ligadas à superfície, começa então o processo de formação e maturação do biofilme (GARRETT et al., 2008; MEBERT et al., 2016).

A densidade e complexidade do biofilme aumentam à medida que organismos ligados à superfície se replicam ativamente. Este crescimento do biofilme produz, em muitos casos, uma estrutura típica, em formato de cogumelo. Acredita-se que esse tipo de estrutura se forme para permitir a passagem de nutrientes para bactérias nas camadas mais internas de biofilme. Após uma fase de latência inicial, observa-se um rápido aumento populacional, no qual é descrito como uma fase de crescimento exponencial, sendo dependente da natureza do ambiente (física e química). Além disso, esse crescimento depende dos nutrientes do meio e do substrato. Neste estágio, processos biológicos determinam a excreção de polissacarídeos intracelulares de adesão, e a presença de cátions divalentes contribuem para formar ligações mais fortes entre as células. Neste estágio, a expressão gênica diferenciada entre os dois estados bacterianos (planctônico e sésil) está em parte associada às necessidades adesivas da população (GARRETT et al., 2008; MEBERT et al., 2016).

Quando a taxa de divisão celular é igual à taxa de morte celular o biofilme encontra-se na fase estacionária de crescimento. Em elevadas concentrações celulares, uma série de mecanismos de sinalização celular são empregadas pelo biofilme, denominados de *quorum sensing*. Após a maturação do biofilme ocorre a fase de dispersão. Esta fase pode ocorrer devido desprendimento de células “filhas” oriundas de células em crescimento ativo, ou desprendimento como resultado de fatores nutricionais, ou *quorum sensing*, ou ainda devido cisalhamento de agregados do biofilme devido aos efeitos físicos. Enzimas produzidas pelo biofilme catalisam a quebra dos polissacarídeos que unem o filme, liberando bactérias para colonização de outros substratos. Ao mesmo tempo, *operons* (conjunto de genes) codantes para proteínas de flagelo são promovidos, para que os organismos tenham o aparato para motilidade, e genes codantes para porinas (proteínas presentes na forma de crescimento sésil) têm sua expressão reprimida, completando assim o ciclo genético para adesão e coesão do biofilme (DONLAN, 2002; GARRETT et al., 2008; MEBERT et al., 2016; NORONHA, 2017).

Figura 4 - Diagrama ilustrativo das principais etapas da formação de biofilmes bacterianos



Fonte: Adaptado de Moriarty *et al.* (2011).

Para as bactérias, as vantagens da formação de biofilmes são enormes. Dentre estas vantagens podemos citar: proteção contra antibióticos, desinfetantes e ambientes dinâmicos, alta tolerância a estresses ambientais, resistência à radiação UV, raspagem, entre outras. As células em biofilmes foram consideradas de 100 a 1000 vezes mais resistentes a antibióticos e agentes desinfetantes do que as células planctônicas. A comunicação intercelular dentro de um biofilme estimula rapidamente a regulação ascendente e descendente da expressão gênica, permitindo adaptação temporal, como a variação fenotípica e a capacidade de sobreviver em condições deficientes em nutrientes (GARRETT *et al.*, 2008; SMITH; HUNTER, 2008; RIZZELLO *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2015).

Ao longo das últimas décadas, o crescimento de biofilmes tem sido relatado em ambientes industriais e domésticos. Infelizmente, na maioria dos casos o crescimento de biofilmes é prejudicial. Os maus efeitos do crescimento do biofilme afetam muitas indústrias, o que pode resultar em grandes custos na limpeza e na manutenção. Dentre os efeitos prejudiciais dos biofilmes podemos citar: a deterioração do produto, a redução da eficiência na produção, a corrosão, odores desagradáveis, mau gosto em produtos alimentícios, infecção, bloqueio de tubulações e falhas de equipamentos. Em relação a saúde e a vida humana, a formação de biofilme por bactérias patogênicas tem consequências deletérias, muitas vezes fatais, e leva a graves problemas de contaminação na medicina, odontologia, processamento de alimentos, tratamento de água e outras áreas que afetam diretamente a saúde e a vida humana. No que diz respeito a infecção hospitalar, instrumentos cirúrgicos e linhas de fluidos, isto é, bisturis, gotejadores e cateteres, são fontes comuns de crescimento de biofilme e subsequente infecção. Uma vez formado um biofilme nestes dispositivos, os tecidos circundantes podem ser

danificados como resultado da resposta do hospedeiro à infecção, e tecidos adjacentes também podem ser infectados. Estima-se que aproximadamente 80% de todas as infecções médicas sejam derivadas do crescimento de biofilme de patógenos (GARRETT et al., 2008; MORIARTY et al., 2011; FENG et al., 2015; WILLYARD, 2017).

Embora existam grandes problemas devido à formação indesejada de biofilmes, vale ressaltar que também há grandes utilidades para alguns tipos, especialmente no campo da biorremediação. Atualmente é comum a utilização desses organismos para remover contaminantes, como por exemplo metais e radionuclídeos, vazamentos de petróleo, compostos de nitrogênio e para a purificação de águas residuais industriais. Além disso, sabe-se que as características adesivas da flora humana são consideradas como uma ferramenta de prevenção à adesão de bactérias patogênicas, evitando assim infecções (GARRETT et al., 2008).

A prevenção da formação indesejada de biofilmes é de suma importância para áreas que afetam diretamente a saúde e a vida humana, incluindo medicina, odontologia, processamento de alimentos e tratamento de água, bem como em áreas industriais como nas indústrias alimentícias, áreas de transporte marítimo (os biofilmes promovem a ligação dos invertebrados aquáticos às seções imersas dos navios), entre outras. Devido à resistência significativa e cada vez maior de biofilmes à terapia antibiótica convencional ou a desinfetantes, novas estratégias para eliminar ou reduzir a formação desses biofilmes estão sendo encorajadas. Baseados no processo de formação dos biofilmes descritos anteriormente, as seguintes estratégias foram recentemente propostas: (i) inibição da adesão inicial dos microrganismos a superfície e da colonização; (ii) interferência nos processos de sinalização molecular presentes na modulação do crescimento do biofilme; e (iii) desagregação do biofilme. Materiais com efeitos antibióticos podem ser produzidos através de modificação físico-química da superfície (superfície anti-adesiva), ou pelo uso de agentes biocidas ligados à superfície. A obtenção de superfícies que previnam a formação de biofilmes através da modificação de sua topografia vem ganhando cada vez mais destaque (RIZZELLO et al., 2013; FENG et al., 2015; MEBERT et al., 2016; NORONHA, 2017), e será melhor discutida na próxima seção.

### ***2.2.1 Adesão bacteriana***

A adesão bacteriana em superfícies abióticas e subsequente formação de biofilmes são processos complexos, controlados por fatores relacionados à superfície, tais como topografia de superfície (nano e micro-rugosidade), carga superficial, energia superficial, hidrofobicidade/hidrofilicidade; por fatores biológicos, tais como a secreção de materiais

extracelulares pelas bactérias, morfologia da bactéria, energia superficial, comunicação célula-célula, apêndices bacterianos e outras estruturas de superfície celular que podem contribuir para a detecção bacteriana da superfície; e, finalmente, por fatores ambientais, tais como força iônica, pH e disponibilidade de nutrientes. A

Tabela 3 apresenta o resumo destes e outros principais fatores (CRAWFORD et al., 2012; RIZZELLO et al., 2013; FENG et al., 2015; ZHANG et al., 2015; MEBERT et al., 2016; NORONHA, 2017).

Tabela 3 - Fatores que influenciam a adesão bacteriana e colonização de superfícies

Elemento	Fatores
<b>Superfície</b>	Porosidade Energia livre de superfície Carga eletrostática Hidrofobicidade/hidrofilicidade Topografia, microrugosidade, nanorugosidade
<b>Microrganismos</b>	Apêndices extracelulares Expressão de adesinas Comunicação célula-célula Substâncias poliméricas extracelulares Forma do microrganismo Energia livre de superfície Potencial zeta
<b>Condições ambientais</b>	Força iônica pH Disponibilidade de nutrientes Tensão superficial Temperatura Hidrodinâmica Presença de macromoléculas

Fonte: Adaptado de Noronha (2017)

A maioria dos estudos que tentam mitigar os efeitos dos biofilmes concentram-se em intervenções destinadas a matar células microbianas em biofilmes já presentes em superfície sólidas. Entretanto, essas estratégias têm eficácia limitada devido à persistência e resistência

bacteriana em biofilmes pré-formados. Por isso, é amplamente aceito que a forma mais eficaz de prevenir a formação de biofilmes é a supressão, a priori, da adesão bacteriana, em vez de tratamento químico ou medicamentoso (a posteriori). Considerando que é muito difícil alterar as propriedades das bactérias a fim de torná-las menos propensas a se aderirem em superfícies abióticas, reduzir a predisposição dessas superfícies à adesão bacteriana alterando sua química superficial ou topografia é uma abordagem mais viável para combater a formação do biofilme. Com isso, a modificação superficial está emergindo como uma estratégia promissora para prevenir a formação de biofilmes em superfícies abióticas (RIZZELLO et al., 2013; FENG et al., 2015).

Embora muitas investigações se concentrem em modificar quimicamente superfícies abióticas, essas modificações apresentam várias desvantagens, tais como eficiência reduzida (uma vez que os compostos/fármacos são libertados), potencial de toxicidade e a possível ocorrência de imunogenicidade local *in vivo*. Ademais, não se sabe bem os efeitos do uso de agentes bactericidas (por exemplo nanopartículas de pratas - AgNPs) no que diz respeito a sua liberação no ambiente, podendo causar impacto para ecossistemas e para a saúde humana a longo prazo (espera-se que a produção de AgNPs atinja aproximadamente 800 t até 2025). O uso desses agentes bactericidas ou biocidas em ambientes domésticos, hospitalares e industriais pode também proporcionar uma evolução na resistência das bactérias. Em ambientes hospitalares o uso maciço de biocidas proporciona a seleção de cepas de bactérias multirresistentes. Além do mais, vários materiais anti-infecciosos desenvolvidos para uso médico têm sido funcionalizados com antibióticos, isso também pode contribuir para a disseminação atual da resistência aos antibióticos, motivo de grandes preocupações mundial, dificultando tratamentos de infecções (QUADROS; MARR, 2010; RIZZELLO et al., 2013; MEBERT et al., 2016; PULIT-PROCIAK; BANACH, 2016; WILLYARD, 2017; CALDERÓN-JIMÉNEZ et al., 2017).

Ainda nesse contexto, inconsistências foram identificadas nas taxas de colonização em superfícies quimicamente semelhantes: duas amostras com química superficial praticamente idêntica podem apresentar perfis de adesão celular muito diferentes devido às diferenças na arquitetura da superfície e rugosidade (CRAWFORD et al., 2012). Também foi relatado uma maior quantidade de bactérias aderidas à hidrogéis com maior dureza quando comparada com hidrogéis mais macios (indicando maior afinidade das bactérias para superfícies mais rígidas), sendo que essa relação ocorre independentemente da química do hidrogel (KOLEWE et al., 2015). Assim, a atenção recente mudou para os aspectos físicos e dimensionais das superfícies, e não só os aspectos químicos, como havia sendo feito. Há na literatura uma grande quantidade



e variedade de estudos que abordam a modificação da topografia de superfícies, especificamente seus parâmetros de rugosidade (que serão descritos mais adiante) e seus efeitos na adesão bacteriana (ANSELME et al., 2010; TRUONG et al., 2010; WU et al., 2011; CRAWFORD et al., 2012; RIZZELLO et al., 2013; FENG et al., 2015; KOLEWE et al., 2015; LÜDECKE et al., 2016; MEBERT et al., 2016).

O estudo da relação entre rugosidade superficial, adesão bacteriana e formação bacteriana remonta ao início dos anos 80, quando essa foi principalmente estudada nas áreas da odontologia e aplicações ambientais. Devido às limitações tecnológicas, estes estudos se restringiram à análise dos efeitos antibacterianos de rugosidades aleatoriamente medidas. Com o advento da nanotecnologia, novos métodos de caracterização foram criados, bem como, técnicas de fabricação com melhores resoluções para o controle de superfícies, incluindo nanorugosidades (regularmente organizadas ou aleatoriamente criadas). Estas técnicas incluem corrosão íon-reativa, corrosão química, oxidação anódica e recobrimentos com polímeros. Muitos destes métodos têm sido aplicados para explorar a influência da rugosidade superficial na adesão bacteriana. Através dessas técnicas é possível averiguar o papel da rugosidade com maior acuidade, embora, como dito anteriormente, ainda nos dias atuais não esteja totalmente claro o papel da rugosidade na adesão bacteriana (RIZZELLO et al., 2013; MEBERT et al., 2016; NORONHA, 2017).

Oposto ao nível da microescala, o efeito da rugosidade superficial ao nível da nanoescala sobre a adesão bacteriana não foi totalmente explorado. Embora o comportamento de adesão tenha se mostrado sensível à topografia em nanoescala, ainda não existem regras universais. A influência tanto da nanotopografia organizada aleatoriamente quanto da nanorugosidade padronizada regularmente na adesão bacteriana e na formação de biofilmes tem sido investigada (MEBERT et al., 2016).

Foi encontrada uma relação direta entre a rugosidade superficial média ( $R_a$ ) e a adesão de bactérias marinhas (BAKKER, 2004). Alguns estudos relatam a dependência da adesão em relação a nanorugosidade, ressaltando a importância dessas “nano-características” na adesão em superfícies. Entretanto, outros trabalhos encontraram tendências opostas, ou seja, que uma diminuição do padrão topográfico leva a um aumento no número de bactérias aderidas (RIZZELLO et al., 2013).

Para as superfícies com características topográficas na escala micrométrica, comparáveis com o tamanho das bactérias, as bactérias tendem a se posicionar de tal forma que maximizam a área de contato com a superfície, e isso favorece a adesão. Em geral, o aumento da rugosidade superficial promove a adesão bacteriana. Superfícies que apresentam

características topográficas de dimensões muito menores do que as bactérias, ou seja, na escala submicrométrica (nanorugosidade), foram relatadas como inibidoras da adesão, reduzindo a área de contato entre as bactérias e a superfície. Tipicamente, considera-se que superfícies com rugosidade média ( $R_a$ ) menor que  $0,8 \mu\text{m}$  são “higiênicas”, enquanto aquelas com rugosidade maior são mais susceptíveis à adesão bacteriana. Assim, o polimento de superfícies pode reduzir a formação do biofilme, sendo a rugosidade média ( $R_a$ ) de  $0,2 \mu\text{m}$  descrita como limiar para máxima redução da adesão bacteriana em superfícies de implantes dentários. Todavia, os efeitos exatos da rugosidade superficial na adesão bacteriana e formação de biofilme variam com o tamanho e a forma das células bacterianas e outros fatores ambientais. Assim, não existe uma rugosidade universalmente ótima que possa reprimir a adesão de todas as espécies bacterianas. (ANSELME et al., 2010; FENG et al., 2015; SONG et al., 2015; MEBERT et al., 2016; NORONHA, 2017).

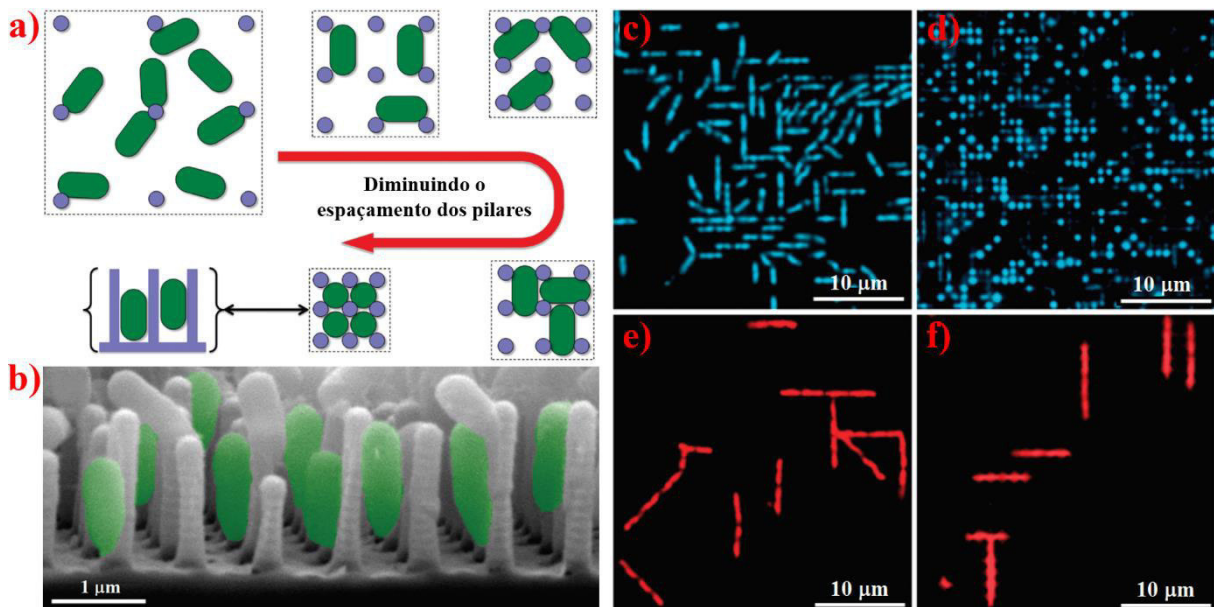
A maior área superficial das superfícies mais rugosas e a presença de depressões cria sítios favoráveis para colonização das mesmas, protegendo também os microrganismos de tensões de cisalhamento. Já a topografia superficial em nanoescala pode criar situações energéticas desfavoráveis para a adesão bacteriana e induzir forças de interação superfície-bactéria repulsivas que prejudicam a adesão e subsequente formação de biofilme. Alguns autores consideram que a influência da rugosidade no processo de colonização é negligenciável, mantendo controvérsias no papel da rugosidade (ANSELME et al., 2010; FENG et al., 2015; MEBERT et al., 2016).

A grande vantagem de se trabalhar com superfícies com nanorugosidade organizadas aleatoriamente é que estas superfícies não requerem métodos de fabricação complexos, o que pode ser interessante do ponto de vista de fabricação em escala industrial. Contudo, há atualmente vários métodos de fabricação de superfície padronizadas em nanoescala que foram otimizados, incluindo fotolitografia, nanoimpressão litográfica, litografia por feixe de elétrons, oxidação anódica de superfícies metálicas, entre outros. Consequentemente, padrões diferentes, tais como trilhas ordenadas, poços, pilares, quadrados e ranhuras, foram fabricados para criar superfícies antibacterianas e antimicrobianas. (RIZZELLO et al., 2013; MEBERT et al., 2016)

Tamanho, espaçamento e forma dos padrões topográficos presentes na superfície têm influência significativa na adesão e proliferação bacteriana. Algumas dessas superfícies apresentam capacidade de inibição da formação do biofilme quando comparadas com o mesmo material que apresentam superfícies planas. Foi verificado também que pode haver dependência entre a retenção e orientação de células bacterianas, e a periodicidade e dimensão destas

superfícies, especialmente quando o tamanho das estruturas é similar ao tamanho das células aderentes. Um exemplo é mostrado na Figura 5. Um esquema de como varia a orientação de bactérias, em forma de bastonetes, em função da geometria da superfície é mostrado na Figura 5a. À medida que o espaçamento dos pilares diminui, as bactérias podem aumentar a sua área de contato aderindo à um número crescente de pilares, com orientação anormal relativamente ao substrato. No estado mais densamente “empacotado”, as bactérias orientam-se perpendicularmente ao substrato para maximizar o seu contato com os pilares (Figura 5b). A Figura 5c e d mostra o resultado da montagem espontânea da *Bacillus subtilis*, enquanto a Figura 5e e f mostra para a *Escherichia coli* cultivadas nestas superfícies. O espaçamento entre os pilares é maior em c) e e) do que em d) e f) (HOCHBAUM; AIZENBERG, 2010; DÍAZ et al., 2010; RIZZELLO et al., 2013; VASUDEVAN et al., 2014; FENG et al., 2015).

Figura 5 - As geometrias de superfície ordenadas orientando a aderência bacteriana e seu padrão espacial. a) esquema do arranjo das bactérias em função da geometria da superfície padronizada. b) Imagem de microscopia eletrônica de varredura em corte transversal de bactérias cultivadas em superfícies estruturadas periodicamente. Montagem espontânea da *Bacillus subtilis*, c) e d), e *Escherichia coli*, e) e f), cultivadas nestas superfícies. O espaçamento dos pilares é mais largo em c) e e) do que em d) e f).



Fonte: Adaptado de Hochbaum e Aizenberg (2011) e Rizzello *et al.* (2013)

Em superfícies microestruturadas, a motilidade das bactérias pode ser mais complicada e, eventualmente, pode exigir mais energia do que o movimento em uma superfície

não estruturada. Isso atrapalha a formação de grandes aglomerados e promove o isolamento de bactérias isoladas. (DÍAZ et al., 2009, 2010, 2012). Assim, o efeito de antibióticos sobre as bactérias nesse tipo de superfície se mostrou mais eficaz. Esse efeito é atribuído a uma promoção de maior difusão de antibióticos para as bactérias isoladas quando comparadas com bactérias em agregados, na qual estariam mais protegidas (DÍAZ et al., 2012). Entretanto, esses estudos foram feitos apenas em tempos curtos, não se sabe ao certo se tais estruturas previnem totalmente a formação de biofilme.

Para nanopadrões ordenados, uma correlação direta entre o tamanho do padrão e aderência bacteriana não foi claramente demonstrada, semelhante ao caso de nanopadrões aleatório. Essa incerteza provavelmente decorre de respostas bacterianas específicas de estirpe a estímulos físicos externos, bem como de algumas limitações dos ensaios biológicos (RIZZELLO et al., 2013).

Apesar da grande quantidade de estudos na literatura sobre a correlação entre a topografia de superfícies e o comportamento bacteriano, os mecanismos pelos quais a topografia superficial modula a adesão não foram totalmente explicados, especialmente em escalas muito menores e maiores que a dimensão de uma célula bacteriana. Como veremos adiante, parte disso se deve a abordagem simplista com relação a caracterização de tais topografias. Essas abordagens tipicamente consideram parâmetros de rugosidade que descrevem apenas um aspecto da topografia de superfície. Assim, análises mais abrangentes de caracterização topográfica, bem como estudos abrangentes e sistemáticos com maior validade estatística, a fim de demonstrar uma clara correlação entre topografia e comportamento bacteriano são necessários. Discussões recentes na literatura apontam que esforços futuros devem ser direcionados para métodos de fabricação refinados, caracterização físico-química de alta resolução de superfícies e profunda investigação dos eventos de interação biológica e de proteínas adsorvidas em superfícies. A compreensão do comportamento bacteriano (adesão, colonização, e desenvolvimento de biofilmes) sobre superfícies pode levar à elaboração de superfícies que apresentem propriedades anti-adesivas, evitando assim a adesão bacteriana e a subsequente formação de biofilme, ou a eliminação das bactérias indesejáveis. Não há, na literatura, estudos relacionados a distribuição e quantificação de bactérias, aglomerados, colônias e possíveis biofilmes em escala de milímetro (ANSELME et al., 2010; CRAWFORD et al., 2012; RIZZELLO et al., 2013; FENG et al., 2015; MEBERT et al., 2016).

No que diz respeito às propriedades hidrofóbicas ou hidrofílicas das superfícies, há estudos demonstrando que superfícies hidrofóbicas podem atrasar a adesão de microrganismos quando comparados com superfícies hidrofílicas, que tipicamente promovem a adesão.

Contudo, resultados controversos também foram relatados, ou seja, superfícies hidrofílicas apresentando menor tendência para formação de biofilmes do que superfícies mais hidrofóbicas. Estudos recentes têm investigado as chamadas superfícies superhidrofóbicas e superhidrofílicas. Eles relatam que essas superfícies podem prevenir ou reduzir a formação de biofilmes. Em superfícies superhidrofóbicas, a rugosidade presente nelas é capaz de aprisionar ar nos elementos topográficos da superfície, evitando a molhabilidade. Já superfícies superhidrofílicas possuem uma densa camada de água em sua superfície, enfraquecendo as interações entre superfície da célula e substrato, reduzindo assim a adesão celular. (RIZZELLO et al., 2013; SONG et al., 2015; MEBERT et al., 2016; NORONHA, 2017).

Discrepâncias também surgiram sobre o papel desempenhado pela energia superficial na adesão bacteriana. A influência da energia superficial dos materiais na adesão bacteriana tem sido extensivamente estudada. Valores entre 20-30 mJ/m<sup>2</sup>, foram relatados na literatura como valores ótimos de energia superficial para inibição de colonização por microrganismos. Todavia, algumas exceções foram encontradas, provavelmente porque não apenas as características superficiais do dispositivo influenciam na adesão de microrganismos, mas também pelas propriedades superficiais da própria bactéria (RIZZELLO et al., 2013; MEBERT et al., 2016).

Com o intuito de modelar e estimar o resultado das interações bactérias-superfície, modelos físico-químicos foram propostos tratando as bactérias como partículas coloidais em suspensão, em razão de seu tamanho (0,5 a 2 µm) ser próximo ao de partículas em suspensão coloidais. De forma geral, um coloide é definido como partículas dispersas homogeneamente dentro de outra substância. Ao visualizar as bactérias numa suspensão como um coloide é possível modelar (a priori) a adesão bacteriana a uma superfície como o produto de uma série de propriedades físicas ou químicas, tanto das próprias bactérias como da superfície ao qual elas aderem. No estudo da adesão bacteriana sobre superfícies, três modelos coloidais são comumente aplicados: abordagem termodinâmica, teoria de Deryaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) e a teoria DLVO estendida (XDLVO) (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; HORI; MATSUMOTO, 2010; MORIARTY et al., 2011).

A abordagem termodinâmica é baseada nas energias livres superficiais das superfícies interativas, as quais são calculadas usando a seguinte equação:

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{sb} - \gamma_{sl} - \gamma_{bl} \quad (2)$$

onde  $\gamma_{sb}$ ,  $\gamma_{bl}$ ,  $\gamma_{sl}$ , são as energias livres das interfaces sólido-bactéria, bactéria-líquido e sólido-líquido, respectivamente. Essa abordagem leva em conta vários tipos de interações atrativas e

repulsivas, como de van der Waals, eletrostática ou dipolo, expressando-as coletivamente em termos de energia livre. Além disso, essa requer estimativa dos valores numéricos de parâmetros termodinâmicos, isto é, energia livre de superfície das superfícies da bactéria e do substrato e da energia livre (ou tensão de superfície) da suspensão, a fim de calcular a energia de adesão de Gibbs para a adesão bacteriana. A adesão é favorecida se a energia livre por unidade de superfície for negativa como resultado da adesão, o que significa que a adesão espontânea é acompanhada por uma diminuição na energia livre do sistema, como previsto pela segunda lei da termodinâmica. Em termos gerais, a abordagem descreve a mudança total na energia livre, que é a energia disponível em um sistema fechado para produzir trabalho ou uma reação. Entretanto, bactérias são organismos termodinamicamente abertos e fora do equilíbrio. A abordagem assume que o processo é reversível (o que não é o caso) e que a bactéria está em contato com a superfície, assumindo assim uma distância zero entre a bactéria e a superfície, de tal maneira a formar uma interface bactéria-substrato, sem a qual a abordagem não é aplicável. Outra questão é quanto da célula está realmente em contato com o substrato (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; HORI; MATSUMOTO, 2010; MORIARTY et al., 2011)

Vale ressaltar que a abordagem termodinâmica é um modelo de equilíbrio que não permite uma interpretação cinética. Além disso, geralmente é muito difícil obter valores precisos para energias livres de superfície bacteriana, pois estas superfícies possuem química de hidratação complexa *in vivo*. Portanto, a aplicação dessa abordagem não tem sido inteiramente bem-sucedida na explicação ou previsão de todos os vários comportamentos da adesão observados em sistemas bacterianos. No entanto, esta abordagem ajudou a explicar algumas observações recorrentes: em numerosos casos o aumento da hidrofobicidade das superfícies sólidas ou das superfícies das bactérias tende a resultar em um maior número de bactérias aderidas. Além disso, bactérias com superfície hidrofóbica preferem materiais com superfícies hidrofóbicas e, bactérias com superfície hidrofílica preferem materiais com superfícies hidrofílicas. A abordagem termodinâmica da adesão bacteriana é mais precisa com superfícies não carregadas ou na presença de grandes quantidades de íons (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; HORI; MATSUMOTO, 2010; MORIARTY et al., 2011).

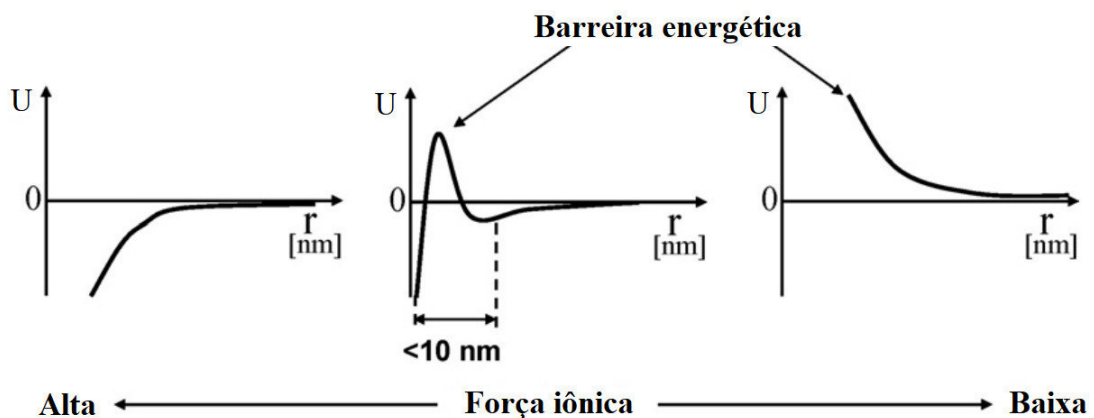
A teoria DLVO, bem como a abordagem termodinâmica, assume que a adesão é o produto das energias interfaciais. Essa teoria inclui também interações de Lifshitz-van der Waals (geralmente atrativas), entretanto, omite os efeitos de interações ácido-base de Lewis. Em vez disso, forças eletrostáticas são incluídas (interações de Coulomb, geralmente repulsivas devido à carga negativa de células e substrato). Assim a interação total entre uma superfície e

uma bactéria é a soma de suas interações de Lifshitz-van der Waals e Coulomb, e pode ser calculada através da equação:

$$U^{DLVO} = U^{LW} + U^{EL} \quad (3)$$

onde  $U^{DLVO}$ ,  $U^{LW}$  e  $U^{EL}$  são as energias de interação total, de Lifshitz-van der Waals e eletrostática, respectivamente. Como a força atrativa de Lifshitz-van der Waals é dominante na vizinhança de uma superfície, as partículas não podem separar-se da superfície pelo movimento Browniano e, portanto, podem estar irreversivelmente aderidas. Em contrapartida, a interação de Coulomb torna-se dominante a uma distância maior da superfície, uma vez que as forças de van der Waals diminuem acentuadamente com a distância. Partículas carregadas presentes em soluções aquosas formam camadas de íons e contra-íons em torno das bactérias, que são geralmente negativamente carregadas. Em virtude disto, barreiras de energia (repulsão eletrostática) são criadas, então, pela sobreposição de duplas camadas elétricas entre as células bacterianas e o substrato. Esta repulsão aumenta quando a força iônica da solução diminui, uma vez que a blindagem das cargas superficiais pelos íons na dupla camada elétrica é menor em menores forças iônicas. De forma oposta, em altas forças iônicas essa barreira energética desaparece e as bactérias alcançam a adesão irreversível de forma rápida e fácil (Figura 6). A teoria DLVO é mais precisa quando as forças eletrostáticas são as interações predominante. No entanto, o fato de não incorporar a componente de interação ácido-base de Lewis, que é a capacidade de uma superfície para aumentar (receber) ou diminuir (doar) a densidade eletrônica em seu entorno, essa teoria tem sua precisão limitada pois omite um aspecto importante da química de superfície (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; HORI; MATSUMOTO, 2010; MORIARTY et al., 2011; NORONHA, 2017).

Figura 6 - Energia total de interação entre a célula bacteriana e a superfície, em função da força iônica



Fonte: Adaptado de Hori (2010).

Embora a DLVO possa explicar os baixos níveis observados experimentalmente de adesão bacteriana em superfícies carregadas negativamente, não consegue explicar a variedade de comportamentos de adesão observados com outros tipos de superfícies, bem como as várias interações moleculares presentes quando os polímeros na superfície bacteriana entram em contato com grupos moleculares do substrato ou qualquer filme condicionante sobre a superfície. Além disso, não leva em conta estruturas e moléculas na superfície bacteriana que afetam a distância bactéria-superfície, o tipo exato de interação, a rugosidade do substrato e o fato que a correlação entre a carga superficial e a adesão não é direta (o efeito da carga é mais importante para a adesão de bactérias hidrofílicas do que as hidrofóbicas) (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004).

A mais avançada das teorias comumente utilizadas para a adesão bacteriana é a teoria DLVO estendida (XDLVO). A XDLVO combina as características da abordagem termodinâmica e da DLVO numa tentativa de avaliar de forma mais abrangente a adesão coloidal. A XDLVO foi originalmente concebida para modelar a adesão de biopolímero às superfícies, mas desde então tem sido usada na investigação microbiana para modelar mais precisamente a adesão bacteriana em comparação com as outras teorias existentes. A teoria XDLVO pode ser expressa como:

$$U^{DLVO} = U^{LW} + U^{EL} + U^{AB} \quad (4)$$

onde o termo acrescido  $U^{AB}$  em relação a equação da DLVO representa a energia de interação ácido-base de Lewis. Ademais, esse último termo, em princípio, descreve interações hidrofóbicas atrativas e efeitos de hidratação repulsivos, que são de 10 a 100 vezes mais fortes que as interações de van der Waals em superfícies onde há contato direto. A dependência da distância das interações ácido-base é relativamente curta. Essas interações e as interações elétricas decaem exponencialmente a partir do valor de contato próximo, e os cálculos mostraram que uma distância menor que 5 nm entre as superfícies interativas é necessária antes que as interações ácido-base possam ser majoritárias (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004; HORI; MATSUMOTO, 2010; MORIARTY et al., 2011).

Resumidamente, todas as teorias descritas acima tratam da energia livre de interações bactérias-superfície (colóide-superfície). Hipoteticamente, a adesão bacteriana é favorável quando o produto das equações associadas às teorias é negativo. Os resultados desses modelos são sempre semi-quantitativos, prevendo um aumento ou diminuição da adesão bacteriana para um conjunto de parâmetros em comparação com outro conjunto de parâmetros



diferentes. Por exemplo, para dois sistemas fechados diferentes, a adesão bacteriana será afetada por parâmetros específicos variáveis tais como carga superficial ou hidrofobicidade das bactérias ou do biomaterial (MORIARTY et al., 2011).

Apesar desses modelos usados para modelar e estimar a adesão bacteriana conseguirem explicar em parte certos resultados observados, ambos são modelos limitados, uma vez que a descrição de microrganismos é extremamente simplificada, ou seja, são tratados como micropartículas coloidais inertes, perfeitamente lisas, geometricamente regulares e com propriedades superficiais e dinâmicas de interação estimadas em bases puramente teóricas. Embora essas suposições sejam úteis para examinar as interações físico-químicas básicas entre superfícies abióticas e bactérias, elas são inadequadas para compreensão dos aspectos detalhados da interação bactéria-superfície. Questões importantes adicionais devem ser levadas em conta, tais como biológicas (composição proteica do seu envelope celular, presença de flagelos, fimbrias e pili, produção de material polimérico extracelular, entre outras), formas e tamanhos heterogêneos (esféricas, bastonetes e espirais) e condições de crescimento bacteriano (tempo de incubação, características do meio de crescimento, temperatura, agitação, entre outros). Por estas razões, modelos topológicos e físico-químicos simplistas para as bactérias e superfícies nem sempre são capazes de prever com precisão as relações entre a topografia e adesão bacteriana (DÍAZ et al., 2011; RIZZELLO et al., 2013).

### **2.3. Rugosidade de superfície**

A rugosidade superficial é muitas vezes entendida como um afastamento da “planaridade”, ou seja, o quão distante uma superfície real está de uma superfície perfeitamente lisa (FANG et al., 1997). Sua avaliação é muito importante, pois ela tem uma enorme influência em muitos fenômenos físicos e em diversos problemas relacionados, como fricção, adesão, vedação, deformação de contato, aquecimento e condução de corrente elétrica, propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas da superfície, refletividade ótica, entre outros. Ademais, como citado anteriormente, a influência da topografia, conseqüentemente da rugosidade superficial, na adesão bacteriana é um problema extremamente importante (GADELMAWLA et al., 2002; PERSSON et al., 2005; ANSELME et al., 2010; GONZALEZ MARTINEZ et al., 2012; RIZZELLO et al., 2013; MEBERT et al., 2016).

Há alguns métodos para se observar e medir a rugosidade de superfície, dentre os quais podemos citar, por exemplo, a perfilometria (BENNETT; DANCY, 1981; SOMMARGREN, 1981; WYANT et al., 1984; PROVDER; KUNZ, 1996; ZHOU et al., 2001),

a microscopia eletrônica de varredura (SEM) (BONETTO et al., 2006; PONZ et al., 2006), a microscopia confocal por varredura a laser (CLSM) (MACDONALD et al., 2004; CHEN et al., 2014; SAURÍ et al., 2015) e, principalmente, a microscopia de força atômica (AFM), sendo esse o método mais usado (FANG et al., 1997; IVANOVA et al., 2011; BRAMOWICZ et al., 2012; GONZALEZ MARTINEZ et al., 2012; PERSSON, 2014).

A topografia de superfícies reais é tão complicada que é impossível uma completa caracterização das mesmas usando apenas um parâmetro. Quanto mais parâmetros forem utilizados para descrever tais superfícies melhor será a precisão da descrição. Os parâmetros de rugosidade de superfícies são normalmente categorizados em três grupos, de acordo com suas definições e funcionalidade. Esses grupos são definidos como: parâmetros de amplitude, de espaçamentos e híbridos. No passado, os parâmetros de amplitudes atraíram mais a atenção da engenharia em geral do que os parâmetros de espaçamentos, sendo considerados como mais relevantes para o comportamento funcional como, por exemplo, o contato. Por outro lado, os parâmetros de espaçamentos foram considerados mais úteis na metalurgia e na ciência dos materiais em geral, devido à necessidade de examinar a estrutura, por exemplo, nos limites de grãos. Com o passar do tempo tornou-se óbvio que ambos são necessários e juntos melhor caracterizam e descrevem a topografia de superfície. Além disso, exames mais minuciosos do comportamento funcional de superfícies em situações de atrito e desgaste apontaram para declives e curvaturas, que são parâmetros híbridos (GADELMAWLA et al., 2002; WHITEHOUSE, 2002).

Os parâmetros de rugosidade podem ser calculados em formas bidimensionais (2D) ou tridimensionais (3D). A análise de perfil 2D tem sido amplamente utilizada na ciência e engenharia há mais de meio século. Com o passar do tempo houve uma maior necessidade de análise de superfície 3D. Os parâmetros de rugosidade 3D, também chamados de parâmetros areais, são calculados para uma área da superfície em vez de uma única linha (perfil). Assim, normalmente para calcular os parâmetros de rugosidade 3D, considera-se uma área da superfície a ser testada e divide-a em um número de seções. Estas seções representam uma série de perfis adjacentes da superfície. Então, os parâmetros de rugosidade 2D são calculados para cada seção separadamente e a média de cada parâmetro é tomada para todas as seções (GADELMAWLA et al., 2002; WHITEHOUSE, 2002).

### **2.3.1 Rugosidade Média ( $R_a$ )**

Dentre os parâmetros de rugosidade, os parâmetros de amplitudes são tidos como

os mais importantes para caracterizar a topografia superficial e são utilizados para medir as características verticais dos desvios da superfície. Os parâmetros mais citados descrevem o intervalo ou a distribuição das alturas (ANSELME et al., 2010; CRAWFORD et al., 2012). Entre esses, a rugosidade média ( $R_a$ ) é o parâmetro de rugosidade universalmente reconhecido e mais utilizado para o controle de qualidade em geral. É definida como a média aritmética dos valores absolutos das irregularidades da superfície em relação a linha média (ou plano médio), dentro de perfil (ou área) de medição. Costumava-se chamar CLA (*centre line average* - média da linha central) no Reino Unido e AA (*arithmetic average* - média aritmética) nos Estados Unidos da América. O símbolo  $R_a$  é útil porque se relaciona com o termo *roughness average* (rugosidade média) em inglês e *Rauteife* (rugosidade) em alemão, que são os dois principais campos de metrologia de superfície. Este parâmetro é fácil de definir, fácil de medir e dá uma boa descrição geral das variações de altura, porém não é sensível a pequenas alterações no perfil (GADELMAWLA et al., 2002; WHITEHOUSE, 2002). A definição matemática na forma integral e discreta de  $R_a$  são mostradas pelas equações (5) e (6), respectivamente.

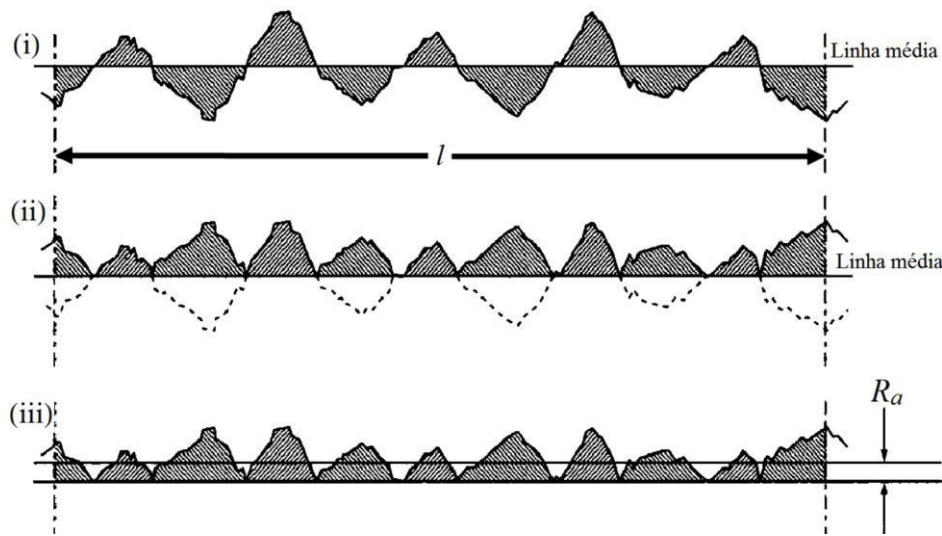
$$R_a = \frac{1}{l} \int_0^l |z(x)| dx \quad (5)$$

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |z_i| \quad (6)$$

onde em (5)  $l$  é o comprimento do perfil e  $z(x)$  é o perfil medido a partir da linha média na posição  $x$ , e em (6)  $n$  é o número total de valores de  $z$  e  $z_i$  é a altura do perfil no ponto de número  $i$ .

Na Figura 7 é ilustrado como é calculado o valor de  $R_a$ . Primeiramente é encontrada a linha média do perfil calculando a altura média do perfil ao longo do comprimento  $l$ . Então essa linha média, quando desenhada, divide o perfil de modo que a área total acima e a área total abaixo são iguais (Figura 7(i)). Se simplesmente calcularmos o desvio médio do perfil em relação a essa linha obteremos o valor zero por definição. Assim devemos tornar todos os desvios negativos em positivos (Figura 7(ii)) e então calcular a altura média desta forma a partir da linha média, que agora passa a ser a linha de base. Assim, esta altura média encontrada é o valor de  $R_a$ , mostrado na Figura 7(iii) (WHITEHOUSE, 2002).

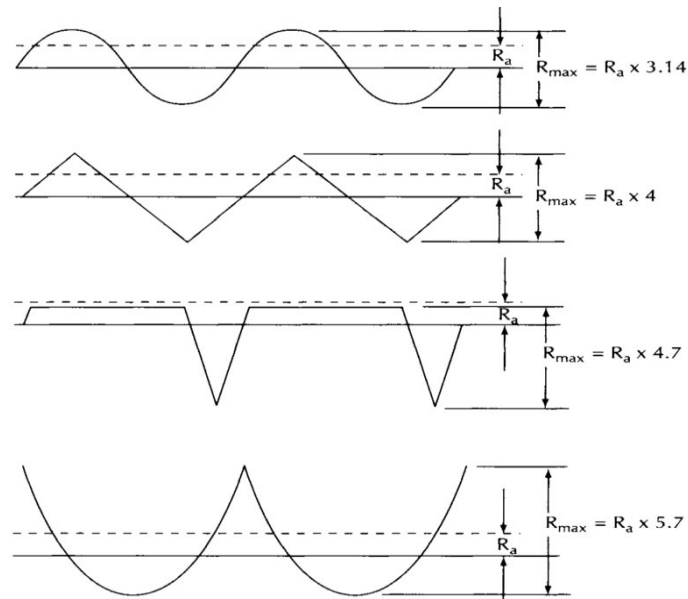
Figura 7 – Procedimentos para o cálculo do parâmetro  $R_a$ : obtenção (i) da linha média do perfil, (ii) dos módulos dos desvios em relação a linha média e (iii) da altura média dos módulos ( $R_a$ )



Fonte: Adaptado de David Whitehouse (2002).

Conforme citado anteriormente,  $R_a$  (ou qualquer outro parâmetro) sozinho não é suficiente por si só para descrever a rugosidade da superfície. Isso torna-se evidente quando olhamos a Figura 8. Nela é ilustrada algumas formas de ondas periódicas contendo todas os mesmos valores de  $R_a$ , porém todas possuem valores diferentes para a distância vertical entre o pico e o vale ( $R_{max}$ ) e relações diferentes entre a  $R_a$  e  $R_{max}$ . De uma forma geral, o parâmetro  $R_{max}$  (também conhecido como  $R_t$ ) é definido como a distância vertical entre o pico mais alto e o vale mais baixo ao longo do comprimento de avaliação do perfil. Algumas vezes,  $R_{max}$  pode ser descrito como a soma de suas componentes:  $R_p$ , a distância da linha ou plano médio ao valor máximo da altura, e  $R_v$ , a distância entre a linha média e o valor mais baixo da altura. (GADELMAWLA et al., 2002; WHITEHOUSE, 2002; CRAWFORD et al., 2012).

Figura 8 - Formas de onda com valores  $R_a$  iguais



Fonte: David Whitehouse (2002).

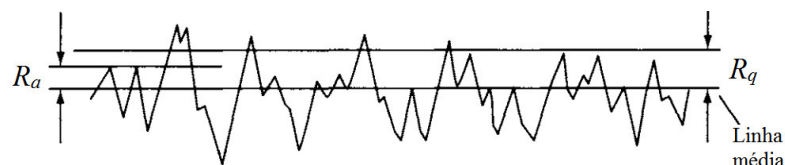
### 2.3.2 Rugosidade média quadrática (*rms* ou $R_q$ ).

Outro parâmetro largamente usado para descrever a rugosidade da superfície é a rugosidade média quadrática (*rms* ou  $R_q$ ). A  $R_q$  representa o desvio padrão da distribuição das alturas da superfície, sendo mais sensível a maiores desvios em relação a linha média, quando comparada a  $R_a$ . A definição matemática na forma integral e discreta de  $R_q$  são mostradas pelas equações (7) e (8), respectivamente. Quando comparamos as equações da  $R_q$  e  $R_a$ , vemos claramente que sempre  $R_q > R_a$  (ilustrado na Figura 9).

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{l} \int_0^l \{z(x)\}^2 dx} \quad (7)$$

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n z_i^2} \quad (8)$$

Figura 9 - Comparação entre  $R_q$  e  $R_a$



Fonte: Adaptado de David Whitehouse (2002).

O  $R_a$  e  $R_q$  são os parâmetros mais citados e utilizados para a descrição da rugosidade em artigos na área de biologia, e são essencialmente intercambiáveis (MEDILANSKI et al., 2002; ANSELME et al., 2010; GENTILE et al., 2010, 2013; TRUONG et al., 2010; CRAWFORD et al., 2012; BAGHERIFARD et al., 2015; LÜDECKE et al., 2016). Os estatísticos em geral preferem a utilização da  $R_q$  ao invés da  $R_a$ , uma vez que o desvio padrão é considerado como sendo mais importante do que o desvio médio. Entretanto, na prática, há pouca diferença entre essas duas quantidades, sendo  $R_a$  o parâmetro mais citado. É importante dizer que assim como outros parâmetros topográficos  $R_q$  e  $R_a$  dependem do comprimento da varredura. Além disso, foi demonstrado que os parâmetros como  $R_a$  calculados a partir de perfis de superfície obtidos com diferentes técnicas podem variar em até 1000 %, dependendo da técnica e do tipo de superfície (MACDONALD et al., 2004). Há estudos relatando que na microescala, os parâmetros de amplitude de rugosidade não são os parâmetros mais pertinentes para interpretar o comportamento celular em superfícies com microtopografias. Os parâmetros que descrevem a organização da superfície correlacionaram-se mais com a resposta celular melhor do que parâmetros de amplitude de rugosidade clássica como  $R_a$  (ANSELME; BIGERELLE, 2006; ANSELME et al., 2010; CRAWFORD et al., 2012).

### 2.3.3 Assimetria ( $R_{sk}$ )

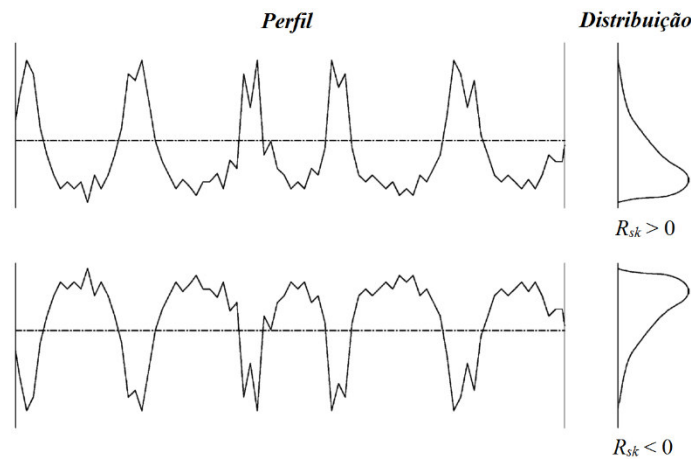
A assimetria ( $R_{sk}$ ) é um parâmetro que mede a simetria do perfil (ou plano) sobre a linha média (ou plano médio), sendo sensível tanto a vales profundos ocasionais quanto a altos picos. Superfícies com uma distribuição gaussiana ou uma distribuição de altura simétrica, isto é, tanto com muitos picos como vales, possuem  $R_{sk}$  igual a zero. Os perfis que apresentam arranhões profundos ou com ausência de picos agudos possuem o valor de assimetria negativa ( $R_{sk} < 0$ ), enquanto os com vales cheios ou altos picos têm assimetria positiva ( $R_{sk} > 0$ ). Portanto, os valores de  $R_{sk}$  depende de como o material da amostra está distribuído em relação a linha média (plano médio). Se a maior parte dos elementos está acima da linha média (planaltos altos com vales profundos e estreitos),  $R_{sk}$  é negativo; e se a maior parte dos elementos estiver abaixo da linha média (vales largos com picos estreitos),  $R_{sk}$  é positivo. Isto é ilustrado na Figura 10 onde vemos que as distribuições de alturas são diferentes. Este parâmetro é usado para distinguir perfis que possuem mesmos valores para  $R_a$  e  $R_q$ , porém com formas diferentes (GADELMAWLA et al., 2002; WHITEHOUSE, 2002; MACDONALD et al., 2004).

A definição matemática na forma integral e discreta de  $R_{sk}$  são mostradas pelas equações (9) e (10), respectivamente.

$$R_{sk} = \frac{1}{lR_q^3} \int_0^l \{z(x)\}^3 dx \quad (9)$$

$$R_{sk} = \frac{1}{NR_q^3} \left( \sum_{i=1}^N z_i^3 \right) \quad (10)$$

Figura 10 - Exemplos de perfis com diferentes assimetrias ( $R_{sk}$ ) e curva de distribuição de altura



Fonte: Adaptado de Gadelmawla *et al.* (2002).

### 2.3.4 Curtose ( $R_k$ )

Na literatura, comumente vemos a curtose sendo apresentada como uma característica chave da distribuição de altura, sendo a mesma atribuída como uma medida da agudez (“*peakedness*”) dessa distribuição, ou ainda, uma medida da agudez de um perfil ou superfície. Uma superfície com distribuição gaussiana tem valor de curtose  $R_k = 3$  e é dita mesocúrtica. Para uma superfície com distribuição de altura larga  $R_k < 3$ , e a curva de distribuição é dita platicúrtica, tendo relativamente poucos altos picos e baixos vales. Por outro lado, uma superfície com estreita distribuição de valores de alturas tem  $R_k > 3$ , e a curva de distribuição é dita como sendo leptocúrtica, tendo muitos picos altos e vales baixos. Na Figura 11 são mostrados dois perfis que resultam nos dois tipos de curtose em que  $R_k \neq 3$  (GADELMAWLA *et al.*, 2002; WHITEHOUSE, 2002; MACDONALD *et al.*, 2004; TRUONG *et al.*, 2010).

Apesar de ser bastante comum, alguns autores chamam a atenção para o fato que é incorreto definir a curtose como uma medida da agudez da distribuição, uma vez que é possível obter diferentes formas de distribuições (mais agudas ou mais achatadas) com o mesmo valor de curtose. Alguns relatam que os termos “curtose” e “agudez” da distribuição devem ser

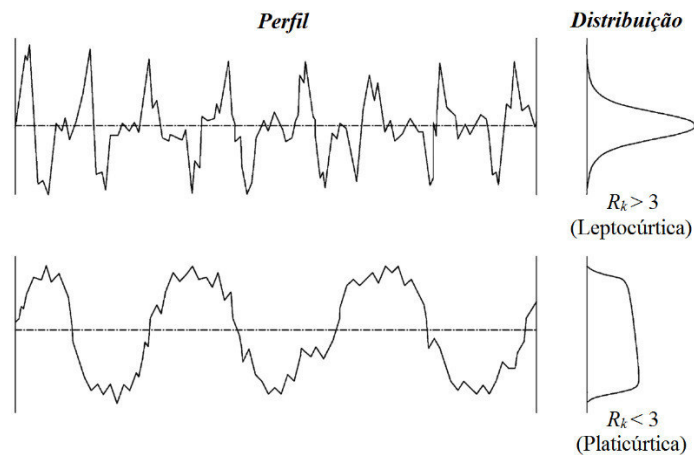
desassociados para erradicar as interpretações persistentes e errôneas da curtose em tal abordagem. Em alguns casos, certos gráficos podem apresentar a uma distribuição bastante estreita como efeito de mudança no escalonamento no eixo  $x$ , devido à presença de valores muito distantes da média (“*outliers*”), proporcionando assim a formação de longas caldas (“*heavy-tailed*”) na distribuição que normalmente são negligenciadas na avaliação da distribuição, induzindo a falsa ideia de um "pico" fortemente pronunciado (DECARLO, 1997; WESTFALL, 2014).

A definição matemática na forma integral e discreta de  $R_k$  são mostradas pelas equações (11) e (12), respectivamente.

$$R_k = \frac{1}{lR_q^4} \int_0^l \{z(x)\}^4 dx \quad (11)$$

$$R_k = \frac{1}{NR_q^4} \left( \sum_{i=1}^N z_i^4 \right) \quad (12)$$

Figura 11 - Exemplos de perfis com diferentes de curtoses ( $R_k$ ) e curva de distribuição de altura



Fonte: Adaptado de Gadelmawla *et al.* (2002).

## 2.4. Funções para caracterizações de superfícies

Foram discutidas aqui abordagens matemáticas de caracterização de superfície que utilizam um determinado valor de um parâmetro ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{sk}$ ,  $R_k$ ) para descrever os perfis de alturas (amplitudes). Quando pretende-se caracterizar a rugosidade e a topografia de superfície, usar parâmetros de amplitude é certamente necessário. Entretanto, eles fornecem uma descrição dimensional adequada somente na direção do eixo  $z$  (CRAWFORD *et al.*, 2012). A maioria dos artigos que abordam efeitos de topografia de superfície sobre comportamento de entidades

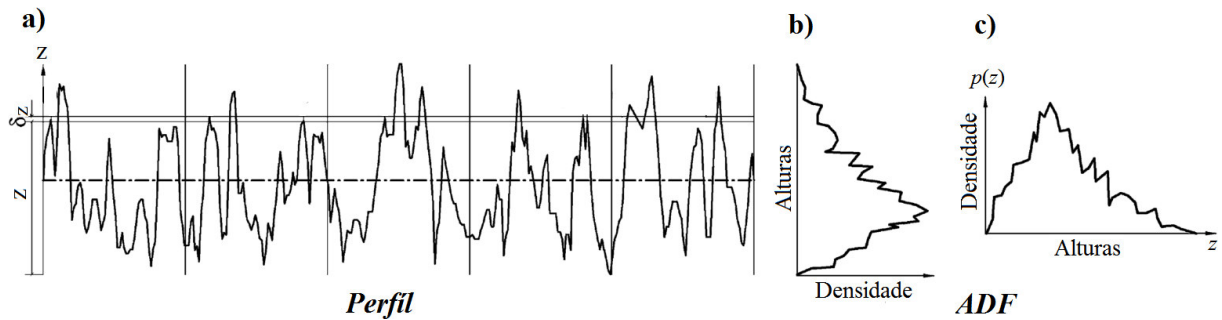


biológicas (células, bactérias, biofilmes) adota uma abordagem bastante simplista para caracterização da rugosidade de superfícies, restringindo-se à apresentação de  $R_a$  e/ou  $R_q$  (MEDILANSKI et al., 2002; LIU et al., 2008; WU et al., 2011; CRAWFORD et al., 2012; BAGHERIFARD et al., 2015). Estes parâmetros não descrevem a morfologia das superfícies de uma forma suficientemente precisa. Isto pode ser compreendido com um argumento muito simples: se assumirmos que uma superfície foi discretizada usando  $n \times n$  pontos (pixels) em uma imagem (por exemplo,  $512 \times 512$ ), todo o conteúdo de informação (neste caso, 262144 pixels) da superfície é reduzido a um único valor se apenas um destes parâmetros da superfície é medido. De fato, os parâmetros de rugosidade convencionais não são capazes de descrever completamente as características da superfície, e portanto, parâmetros de rugosidade adicionais devem ser considerados para fornecer uma descrição mais precisa dos aspectos morfológicos das superfícies, incluindo a formação de irregularidades e a sua distribuição espacial. Na maioria dos casos, funções matemática que descrevam a topografia são mais precisas que os parâmetros de amplitude descritos. Estas são chamadas de "curvas", embora sejam fórmulas avaliadas em um número de pontos com uma função ajustada através dos pontos (FANG et al., 1997; WHITEHOUSE, 2002; GONZALEZ MARTINEZ et al., 2012). Portanto, para uma caracterização mais abrangente de uma superfície, torna-se imprescindível uma análise das variações espaciais na rugosidade com o intuito de descrever pelo menos um ou mais parâmetros de espaçamentos, bem como a apresentação de gráficos que descrevam a distribuição espacial das alturas (CRAWFORD et al., 2012; BAGHERIFARD et al., 2015).

#### ***2.4.1 Função de densidade de amplitude (ADF ou $p(z)$ )***

O termo densidade de amplitude corresponde exatamente ao termo de densidade de probabilidade em estatística. Dado um perfil (Figura 12a) a função de densidade de amplitude (ADF ou  $p(z)$ ) representa o histograma de distribuição das alturas desse perfil. Ela pode ser encontrada plotando a densidade de alturas no eixo horizontal e a altura do próprio perfil no eixo vertical como mostra a Figura 12b. Porém, é comum vermos o oposto, ou seja, a densidade de alturas na vertical e as alturas do próprio perfil no eixo horizontal (Figura 12c). Tomando a curva de distribuição da densidade de amplitude representada por  $p(z)$  mostrada na Figura 12c,  $p(z)$  é a probabilidade de um valor  $z$  ocorrer quando o perfil é varrido da esquerda para a direita. (GADELMAWLA et al., 2002).

Figura 12 - ADF



Fonte: Adaptado de Gadelmawla *et al.* (2002).

Para calcular a densidade das alturas do perfil, a escala de amplitude é dividida em partes menores  $\delta_z$ . A medida dos valores de amplitudes achados dentro de  $\delta_z$  pode ser feita calculando todos os valores de amplitude entre  $z$  e  $\delta_z$  em relação ao comprimento do perfil avaliado. A densidade de amplitude é, portanto, definida pela equação:

$$p(z) = \lim_{\delta_z \rightarrow 0} \frac{P(z, z + \delta_z)}{\delta_z} \quad (13)$$

A densidade  $p(z)$  é normalizada de forma que,

$$\int_{-\infty}^{\infty} p(z) dz = 1 \quad (14)$$

Evidentemente, a escala dos valores é independente do número de pontos no histograma, e as distribuições cumulativas são integrais das densidades e têm valores dentro do intervalo  $[0, 1]$ .

A assimetria e a curtose podem ser calculadas a partir da ADF, como mostram as equações (15) e (16), respectivamente.

$$R_{sk} = \frac{1}{R_q^3} \int_{-\infty}^{\infty} z^3 p(z) dz \quad (15)$$

$$R_k = \frac{1}{R_q^4} \int_{-\infty}^{\infty} z^4 p(z) dz \quad (16)$$

Em razão disso, os parâmetros  $R_{sk}$  e  $R_k$  são ditos como sendo o terceiro e quarto momento central da função de densidade de probabilidade de amplitude do perfil ou área, medidos ao longo do comprimento da avaliação ou área de amostragem, respectivamente. (GADELMAWLA *et al.*, 2002; MACDONALD *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2014).

Portanto,  $R_{sk}$  e  $R_k$  podem ser obtidos operando sobre a curva da  $p(z)$ . Obviamente, os valores calculados para a assimetria e curtose a partir de  $p(z)$  ou  $z(x)$  são os mesmos. A diferença é que  $p(z)$  gera uma imagem das características do perfil à medida que  $z$  muda,

enquanto que uma sucessão de valores de  $z$  em posições  $x$  não nos diz muito.

Para superfícies produzidas por processos puramente aleatórios, a ADF será uma distribuição Gaussiana de alturas dadas pela seguinte equação:

$$ADF(z) = \sqrt{2\pi R_q^2} e^{\left(\frac{-z^2}{2R_q^2}\right)} \quad (17)$$

A ADF é uma outra forma de representar o perfil. As curvas, ao invés de parâmetros numéricos únicos, são mais relevantes para diferenciar características topográficas. A informação da superfície é apresentada de uma forma diferente do perfil, sendo às vezes mais claras. Além disso, conforme descrito acima, a ADF tem forma, posição e escala, e pode servir de base para os parâmetros de amplitude dados acima. De maneira análoga, existem funções semelhantes que são a base para informações horizontais, destacando-se a função de autocorrelação (ACF) e a densidade espectral de potência (*Power Spectrum Density-PSD*) (WHITEHOUSE, 2002; CRAWFORD et al., 2012).

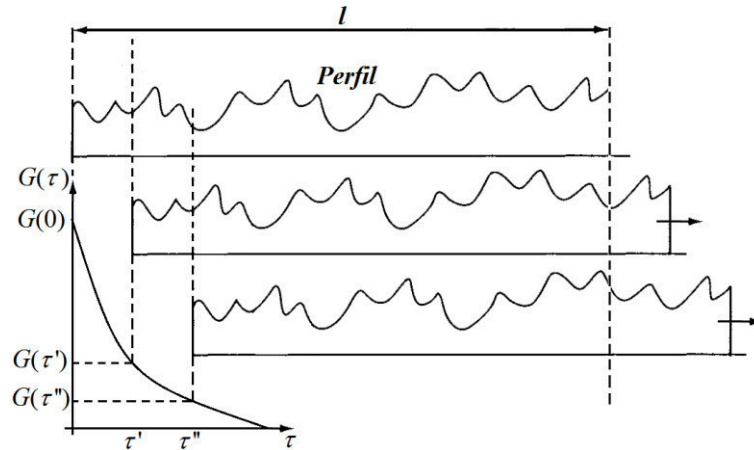
#### 2.4.2 Função de autocorrelação (ACF ou $G(\tau)$ )

A periodicidade ou aleatoriedade de uma superfície ou perfil pode ser avaliada pela construção de uma ou mais funções estatísticas relacionadas a elas. Estas funções medem como as alturas de dois pontos na superfície ou no perfil variam em função da distância entre eles, ou seja, elas fazem uma análise espacial da superfície ou do perfil. Para tal análise podemos utilizar a função de autocorrelação (ACF). Essa descreve a dependência geral dos dados das alturas numa posição em relação a outros valores em outras posições. Assim, a ACF pode ser considerada como uma medida quantitativa da similaridade entre um perfil e o mesmo perfil deslocado lateralmente (GADELMAWLA et al., 2002; CRAWFORD et al., 2012).

A operação para obter a ACF é relativamente simples. Primeiramente tira-se o valor médio do perfil, em seguida multiplica-se cada valor  $z$  do perfil por ele mesmo em todo o perfil, soma-se todos os valores da multiplicação e então divide pelo número de valores de  $z$ , dessa forma, encontramos o valor de  $G(0)$ , conforme a equação (18). Em seguida, desloca-se (em uma distância  $\tau'$ ) o perfil em relação a si próprio, conforme mostrado na Figura 13. Multiplica-se então cada valor de  $z$  no perfil superior pelo valor (no perfil inferior descolado) de  $z$  diretamente abaixo dele. Novamente, somam-se os produtos e divide-se pelo número de produtos. Dessa forma, obtemos agora o valor de  $G(\tau')$ , conforme a equação (19). Repete-se o procedimento

anterior para encontrar  $G(\tau')$ ,  $G(\tau'')$  e assim por diante, dessa forma obteremos a curva da ACF (ou  $G(\tau)$ ) mostrada no canto inferior esquerdo da Figura 13 (WHITEHOUSE, 2002).

Figura 13 – Mecanismo da ACF



Fonte: Adaptado de David Whitehouse (2002).

$$G(0) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i^2 \quad (18)$$

$$G(\tau') = \frac{1}{N - \tau'} \sum_{i=1}^N z_i \cdot z_{i+\tau'} \quad (19)$$

A definição matemática na forma integral e discreta da ACF são dadas pelas equações abaixo.

$$G(\tau) = \frac{1}{l - \tau} \int_0^{l-\tau} z(x) \cdot z(x + \tau) dx \quad (20)$$

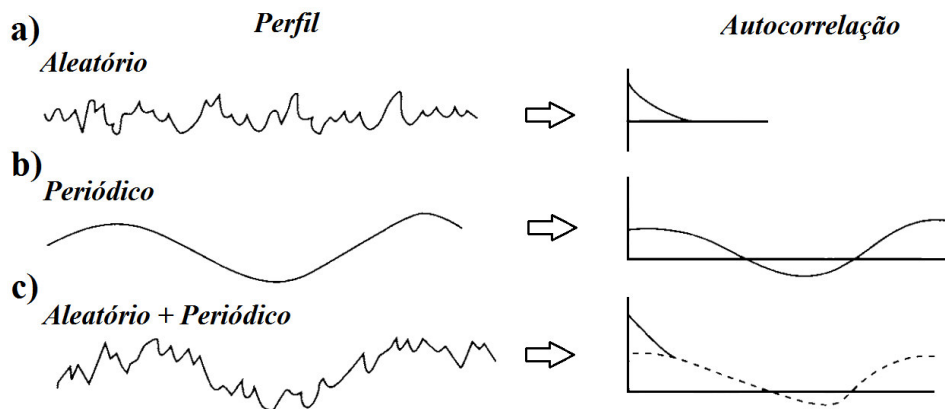
$$G(\tau) = \frac{1}{N - \tau} \sum_{i=1}^N z_i \cdot z_{i+\tau} \quad (21)$$

A ACF é às vezes chamada de função de autocovariância (ACVF). Além disso a ACF também é às vezes normalizada, dividindo-a por  $R_q^2$  (que é a variância do perfil). Comparando as equações (8) e (18), temos que  $G(0) = R_q^2$ , ambas representam a variância do perfil (TONG; WILLIAMS, 1994; WHITEHOUSE, 2002; CRAWFORD et al., 2012). Avaliando o comportamento básico da ACF concluímos que:

- A direção em que o deslocamento é feito é irrelevante;
- Seu valor é sempre máximo em  $G(0)$  (ver Figura 13);

- Para um perfil aleatório,  $G(\tau)$  decai para zero em um valor finito de  $\tau$  (ver Figura 14a);
- Para um perfil periódico,  $G(\tau)$  será periódica como o mesmo comprimento de onda, ou seja, não decai (ver Figura 14b);
- Os componentes aditivos de um perfil adicionam também a correlação (ver Figura 14c).

Figura 14 – Exemplos de função de autocorrelação



Fonte: Adaptado de David Whitehouse (2002).

Conforme dito anteriormente, a ACF tende a 0 quando  $\tau$  aumenta, com superfícies relativamente aleatórias. Esse decaimento acontece mais rapidamente do que aquelas com uma estrutura bem definida. Isto permite que elas sejam caracterizadas por um parâmetro, o comprimento de correlação ( $\zeta$ ), que é usado para descrever as características de correlação da ACF. O  $\zeta$  é definido como o valor de  $\tau$  em que a ACF se decompõe para uma determinada fração de seu valor original, normalmente 10% de  $G(0)$ . Os pontos no perfil ou superfície que são separados por  $\tau > \zeta$  podem ser considerados como não correlacionados, ou seja, estatisticamente independentes (GADELMAWLA et al., 2002; CRAWFORD et al., 2012; CHEN et al., 2014).

Superfícies e perfis são bastantes complicados de analisar, pois qualquer ponto pode ser constituído de informação aleatória e/ou determinística. Fica claro então a importância da ACF para caracterização dos mesmos. Assim como a ADF, a ACF retira informações posicionais da superfície ou perfil. Enquanto a ADF observa as alturas a ACF observa os espaçamentos (mas não a posição). Dessa forma um dos maiores problemas em se estudar superfícies aleatórias é suprimido, o efeito da posição aleatória. Portanto, nem a ADF nem a ACF são tão variáveis (não mudam tanto) quanto a forma da superfície ou perfil, uma vez que um elemento aleatório (a posição) é removido. Por exemplo, se considerarmos dois perfis tomados de uma superfície, é possível que eles sejam bem diferentes, entretanto a ADF e a ACF

dos mesmos tendem a ser mais ou menos semelhantes. Por isso, a ADF e a ACF são ditas como “estáveis”, ou seja, elas têm formas mais ou menos constantes para qualquer que seja a área ou perfil tomados em uma superfície, podendo assim, uma superfície aleatória ser caracterizada por ambas as funções. Isto reforça a importância de usar “curvas” como base para caracterização (WHITEHOUSE, 2002; CHEN et al., 2014).

### **2.4.3 Densidade espectral de potência (PSD ou $C(q)$ )**

Conforme já citado, superfícies com morfologias muito diferentes podem apresentar os mesmos valores de *rms*, ou ainda, em diferentes superfícies o valor de *rms* depende da escala de comprimento usada para a medição, isto é, à medida que o tamanho da área da superfície analisada é aumentado, o valor da *rms* varia até sua saturação a partir de um certo comprimento analisado (FANG et al., 1997; BRAMOWICZ et al., 2012). Portanto, o valor da *rms* da rugosidade superficial não é uma quantidade invariante em relação a escala. Assim, a análise topográfica deve fazer uso de ferramentas mais sofisticadas. Uma dessas é a densidade espectral de potência (*Power Spectral Density* - PSD) (GONZALEZ MARTINEZ et al., 2012).

A PSD é uma função importante para caracterizar tanto as amplitudes quanto o espaçamento da rugosidade de uma superfície, oferecendo uma visualização das propriedades geométricas da superfície em todos os comprimentos de onda da mesma. Especificamente, a PSD dá a distribuição de frequência espacial da rugosidade de superfície. Muitas vezes, as superfícies apresentam uma propriedade chamada de fractalidade (discutida posteriormente), de forma que, assim como outras manifestações na natureza, parecem obedecer a uma lei de potência quando analisada em diferentes escalas de comprimento. Neste ponto, a PSD também é extremamente útil para avaliar essa dependência, fornecendo parâmetros para a caracterização destas superfícies. A PSD é calculada pela decomposição de Fourier do perfil (ou superfície) em suas frequências espaciais de componente sinusoidal ( $f$ ). Portanto, para determinar a PSD, é preciso transformar perfis ou imagens 2D obtidas de uma superfície do espaço real para o espaço recíproco, e isso é feito através da transformada de Fourier (*Fourier Transform* - FT) (FANG et al., 1997; GISIGER, 2001; GADELMAWLA et al., 2002; GONZALEZ; WOODS, 2008; MARTIN; CUNGE, 2008; JAMES, 2011; CHEN et al., 2014) descrita a seguir.

Considerando um perfil contínuo de uma superfície  $z(x)$  (ou qualquer função contínua), a transformada de Fourier,  $F(u)$ , é definida pela equação

$$F(u) = \int_{-\infty}^{\infty} z(x)e^{-j2\pi ux} dx \quad (22)$$

onde  $j = \sqrt{-1}$  e  $u$  é a frequência em relação ao eixo  $x$ . Inversamente, a partir de  $F(u)$  pode-se calcular  $z(x)$  através da FT inversa

$$z(x) = \int_{-\infty}^{\infty} F(u)e^{j2\pi ux} du \quad (23)$$

ou seja,  $z(x) = F^{-1}[F(u)]$ , de modo que não só  $F(u)$  é a FT de  $z(x)$  como também  $z(x)$  é a FT de  $F(u)$ . Estas duas equações compreendem o par de transformadas de Fourier (GONZALEZ; WOODS, 2008; JAMES, 2011).

A transformada de uma função discreta  $z(x)$ ,  $x = 0, 1, 2, \dots, M-1$ , é dada por

$$F(u) = \sum_{x=0}^{M-1} z(x)e^{-j2\pi ux/M} \quad (24)$$

Similarmente, a FT inversa é dada por

$$z(x) = \frac{1}{M} \sum_{u=0}^{M-1} F(u)e^{j2\pi ux/M} \quad (25)$$

Para o caso de uma função bidimensional  $z(x,y)$  discreta, como por exemplo uma imagem representando uma superfície, o par de transformadas de Fourier 2D tem a seguinte forma:

$$F(u, v) = \sum_{x=0}^{M-1} \sum_{y=0}^{N-1} z(x, y)e^{-j2\pi(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N})} \quad (26)$$

$$z(x, y) = \frac{1}{MN} \sum_{u=0}^{M-1} \sum_{v=0}^{N-1} F(u, v)e^{j2\pi(\frac{ux}{M} + \frac{vy}{N})} \quad (27)$$

Como as componentes da FT são quantidades complexas, é conveniente expressar  $F(u)$  em coordenadas polares

$$F(u) = |F(u)|e^{-j\varphi(u)} \quad (28)$$

onde

$$|F(u)| = [R^2(u) + I^2(u)]^{1/2} \quad (29)$$

é chamado de magnitude ou espectro da FT, onde  $R(u)$  e  $I(u)$  são as partes real e imaginária de  $F(u)$ , respectivamente, além disso

$$\varphi(u) = \tan^{-1} \left[ \frac{I(u)}{R(u)} \right] \quad (30)$$

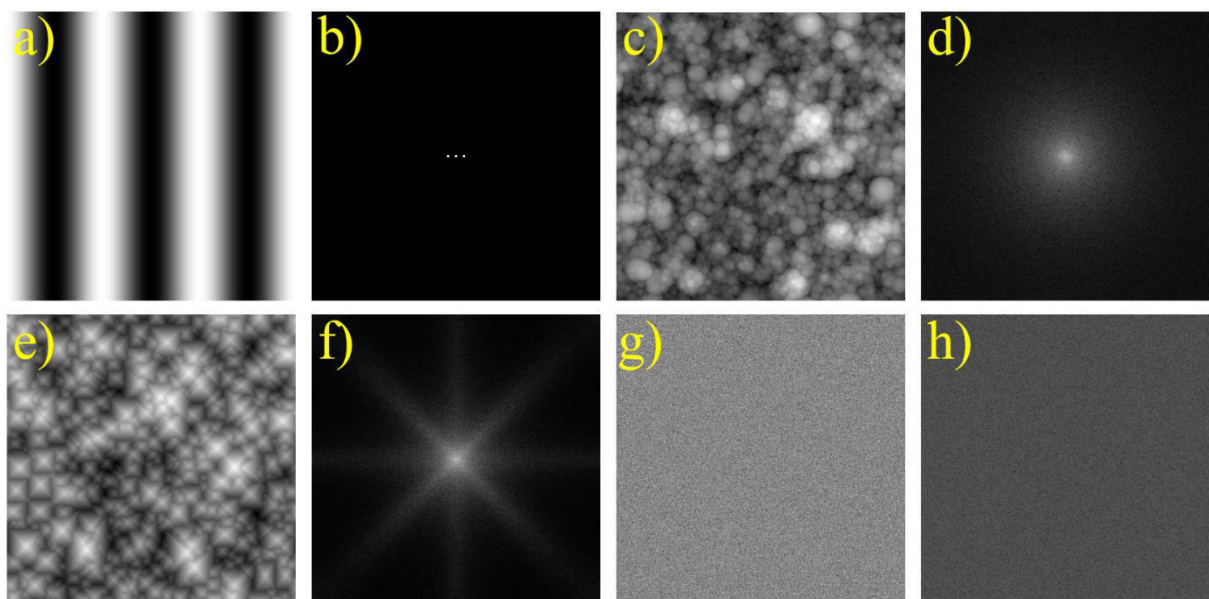
é chamado de ângulo de fase ou espectro de fase da transformada.

Assim, a transformada de Fourier de  $z(x)$  funciona mudando um sinal do domínio

real (neste caso espaço) para o domínio recíproco (frequência), também conhecido como domínio de Fourier, sem que haja perda de informação. Sua inversa, como o nome sugere, faz o processo inverso, também sem que haja perda de informação. A FT foi inicialmente utilizada no campo da difusão do calor, onde permitiu a formulação de equações diferenciais representando o fluxo de calor, de tal forma que as soluções puderam ser obtidas pela primeira vez. Somente a partir da segunda metade do século passado seu uso foi disseminado para várias aplicações, principalmente a partir do início da década de 60, através do advento dos computadores e a formulação do algoritmo FFT (Transformada rápida de Fourier - *Fast Fourier Transform*). Esse último, proporcionou uma verdadeira revolução no campo de processamento de sinais e imagens (FANG et al., 1997; GONZALEZ; WOODS, 2008).

A Figura 15 mostra exemplos de imagens e suas representações no domínio de Fourier. Quando a FT é aplicada sobre uma imagem com padrão perfeitamente sinusoidal (Figura 15a), contendo apenas uma única frequência espacial  $f$ , o resultado apresentado pelo espectro de Fourier é uma imagem com um ponto na origem (ponto central da imagem  $(u_0, v_0)$ ) que representa o brilho médio de toda a imagem, e dois pontos simétricos a este (Figura 15b). O ponto da direita está localizado no valor  $f$  no eixo  $u$  das frequências. Portanto, o ponto a esquerda está localizado em  $-f$ . Se a Figura 15a for rotacionada  $90^\circ$  e for aplicada a FT, o resultado seria análogo a Figura 15b rotacionada também a  $90^\circ$ . Portanto, nesse caso os pontos estariam sobre o eixo  $v$  das frequências no espaço recíproco.

Figura 15 – Imagem no domínio real (1ª e 3ª coluna) e recíproco (2ª e 4ª coluna)



Fonte: Elaborado pelo autor.



A Figura 15c foi gerada no gerada pelo *software* Gwyddion (NEČAS; KLAPETEK, 2012). Nela podemos observar várias esferas de diferentes tamanho, semelhantes a várias partículas esféricas na escala nano ou micrométrica, encontradas na literatura (KOO et al., 2008; BAZARGAN et al., 2013). Em seu espectro de Fourier (Figura 15d) é possível observar que a maior concentração de frequência está próxima ao centro, apresentando assim um maior brilho. Geralmente, para a maioria das imagens a maior parte de suas informações se encontram na região de baixa frequências, portanto mais próxima do centro. Já a Figura 15e (gerada no *Gwyddion*) contém várias pirâmides, semelhantes às observadas na literatura em superfícies de silício decorrentes de ataques anisotrópicos (XIU et al., 2007; LIU et al., 2014; MA et al., 2014; JIANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Em seu espectro de Fourier (Figura 15f) podemos observar faixas na horizontal, vertical e diagonais decorrentes dos formatos das pirâmides da imagem real. Por fim, a Figura 15g mostra uma imagem com distribuição gaussiana ruidosa (gerada no *Gwyddion*), enquanto que a Figura 15h mostra seu espectro de Fourier. Nesta última imagem podemos observar que as frequências observadas da imagem Figura 15g se distribuem de maneira uniforme, contendo tanto altas e baixas frequências. Vale ressaltar que a FT de uma função gaussiana também é uma gaussiana, assim a distribuição de frequência em Figura 15g também é uma gaussiana (JAMES, 2011).

Estes exemplos mostram que a FT é uma outra forma de representar e avaliar uma imagem levando em consideração suas frequências, e assim, algumas características da superfície que não são observadas diretamente nas imagens reais passam a ser observadas na análise de suas frequências. Esta é uma forma de avaliar as frequências espaciais da superfície.

Uma vez definido o espectro de Fourier, a PSD é definida como o quadrado do espectro de Fourier, ou seja

$$PSD(u) = |F(u)|^2 = R^2(u) + I^2(u) \quad (31)$$

O termo *power spectrum* também é utilizado para se referir a PSD (GONZALEZ; WOODS, 2008; JAMES, 2011).

A PSD pode ser obtida através do teorema de Wiener-Khinchine (JAMES, 2011; CHEN et al., 2014). Esse teorema estabelece que a PSD é a transformada de Fourier da função de autocorrelação, ou seja:

$$PSD(u) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{-j2\pi u\tau} d\tau \quad (32)$$

assim, podemos calcular a transformada inversa e obtemos a seguinte equação

$$G(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} PSD(u) e^{j2\pi u\tau} du \quad (33)$$

ou seja, também podemos dizer que a função de autocorrelação é a FT da PSD.

Para o estudo de superfícies obtém-se a PSD 2D, que para o caso bidimensional é dada pelo módulo quadrado da transformada de Fourier da topografia  $z(x, y)$ , ou de forma equivalente, a transformada de Fourier do ACF 2D, definida por:

$$C_{2D}(q) = \frac{1}{(2\pi)^2} \int \langle z(\mathbf{x})z(\mathbf{0}) \rangle e^{-j\mathbf{q}\mathbf{x}} d\mathbf{x}^2 \quad (34)$$

onde  $\mathbf{x} = (x, y)$  é a coordenada planar;  $z(\mathbf{x})$  é o perfil da superfície medida a partir de um plano médio, definido como  $\langle z \rangle = 0$ ; e  $\mathbf{q} = (q_x, q_y)$  é um vetor de onda bidimensional de uma componente de rugosidade superficial (seu módulo  $q$  é chamado de número de onda e está relacionado com o comprimento de onda característico  $\lambda$  na forma  $q = 2\pi/\lambda$ , e sua direção é dada por um ângulo  $\varphi$  [ $q = (q_x^2 + q_y^2)^{1/2}$  e  $\varphi = \arctan(q_y / q_x)$ , onde  $q_x$  e  $q_y$  são as frequências espaciais nas direções  $x$  e  $y$ ]). Na equação acima o símbolo  $\langle \dots \rangle$  significa a média de um conjunto de diferentes superfícies com estatísticas com propriedades idênticas (PERSSON et al., 2005; GENTILE et al., 2010, 2013; KOVALEV et al., 2014; PERSSON, 2014).

A partir de  $C(q)$  alguns parâmetros de interesse da superfície podem ser diretamente calculados. Por exemplo, da equação anterior, temos que a ACF (que é a transformada inversa da equação anterior) é dada por:

$$\langle z(\mathbf{x})z(\mathbf{0}) \rangle = \int C_{2D}(q) e^{j\mathbf{q}\mathbf{x}} dq^2 \quad (35)$$

Se considerarmos o deslocamento  $\tau = 0$  (ou seja,  $\mathbf{x} = (0, 0)$ ), então  $\langle z(\mathbf{0})z(\mathbf{0}) \rangle = \langle z^2 \rangle$ . Portanto, obtemos a variância, que é justamente a rugosidade média quadrática ao quadrado ( $R_q^2$ ), na qual foi citado anteriormente para o caso  $G(0)$ . Assim o parâmetro  $R_q$  pode ser obtido por:

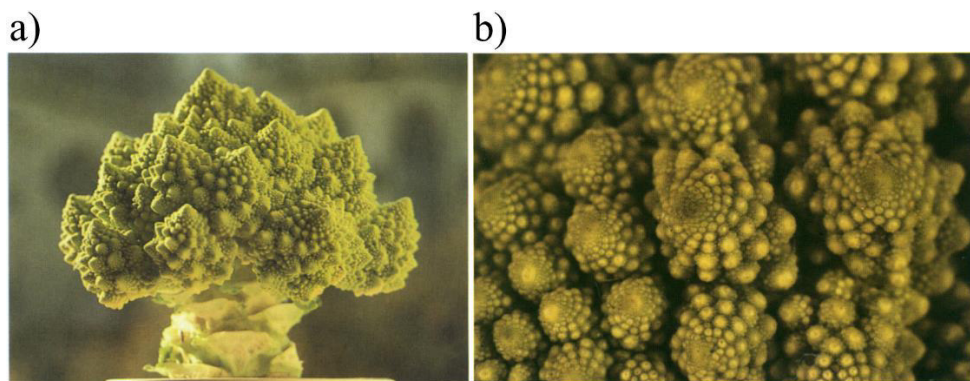
$$R_q^2 = \int C_{2D}(q) dq^2 = 2\pi \int_{q_0}^{q_1} q C(q) dq \quad (36)$$

onde  $q_0 = 2\pi/\lambda_0$  é o menor número de onda (“*cut-off*” inferior), sendo  $\lambda_0$  o maior comprimento de onda, o qual na imagem corresponde ao seu comprimento  $L$ . Já  $q_1 = 2\pi/a$  é o maior número de onda (“*cut-off*” superior), onde  $a$  é na imagem corresponde ao tamanho de um pixel (PERSSON et al., 2005).

Outro parâmetro muito importante que pode ser extraído da superfície através da PDS é a dimensão fractal ( $D$  ou  $FD$ ). O termo fractal foi introduzido pela primeira vez por Mandelbrot (MANDELBROT, 1982) em seu livro “*The Fractal Geometry of Nature*”. É derivado da palavra em latim “*fractus*” que significa quebrado, fragmentado. Trata-se de um conceito de uma nova geometria que teve como objetivo preliminar descrever a grande

variedade de estruturas encontradas na natureza que são irregulares, rugosas ou fragmentadas. Essas estruturas possuem um padrão que se mantém independente da escala avaliada, ou seja, parecem obedecer a uma certa hierarquia regular, na qual a cada nível de aproximação ou afastamento é obtido o mesmo padrão anterior (em pelo menos uma dimensão). A Figura 16a mostra um exemplo interessante e bastante citado de uma estrutura fractal encontrada na natureza, trata-se do brócolis romanesco. Em uma primeira visão vemos uma forma que é melhor descrita como um aglomerado. Essa estrutura é composta de estruturas menores, que parecem quase idênticas a estrutura inteira (ver Figura 16b), porém reduzida por algum fator. Cada uma dessas pequenas estruturas é composta novamente de outras pequenas estruturas quase idênticas, porém ainda menores. É possível observar com facilidade pelo menos três gerações de estruturas, onde a segunda, terceira e todas as gerações seguintes são essencialmente versões reduzidas das anteriores (MANDELBROT et al., 1984; PEITGEN et al., 2004).

Figura 16 – a) Brócolis romanesco e b) sua imagem ampliada



Fonte: Adaptado de Peitgen *et al.* (2004).

Durante as últimas décadas, evidências da invariância da escala apareceram em vários campos de estudos, inclusive estudos relacionado ao corpo humano, uma vez que foram observadas estruturas fractais nos ossos, sistema circulatório, pulmões, cérebro, entre outros. Com isso, a análise de dimensões fractais têm se expandido largamente como um método capaz de modelar vários fenômenos naturais de uma maneira simples e eficiente. Conseqüentemente, o parâmetro  $D$  tem sido aplicado nesses campos, inclusive nos campos das ciências biológicas, entre os quais estão histologia, anatomia normal e patológica, botânica, biologia molecular e zoologia. A pesquisa sobre este assunto é de caráter multidisciplinar, e incluem ideias da física, biologia, informática, matemática, entre outras ciências (GISIGER, 2001; IEVA, DI et al., 2014, 2015).

O sistema fractal do brócolis romanesco (Figura 16) é chamado de auto-similar, pois sua estrutura é invariante sob uma mudança de escala em todas as direções, de forma isotrópica. Ou seja, todos os comprimentos em todas as direções possuem o mesmo fator de escala. Quando a invariância de escala é preservada somente com fatores de escala diferentes, em outras palavras, quando a re-escala depende da direção, o fractal é dito anisotrópico e chamado de auto-afim. Portanto, fractais auto-similares são casos particulares dos fractais auto-afins. Assim, define-se como fractalidade a propriedade de um objeto (superfície e etc.) de invariância por transformação de escala, em partes ou em toda de sua extensão, com pelo menos uma dimensão fractal (MANDELBROT et al., 1984; PEITGEN et al., 2004).

Muitas superfícies tendem a ser quase fractais auto-afins. Portanto, pode-se usar a dimensão fractal  $D$  como um parâmetro para caracterizar as superfícies que apresentam fractalidade. Há vários métodos descritos na literatura para calcular o valor de  $D$ , sendo alguns mais adequados para determinadas situações, com vantagens e limitações. (MANDELBROT, 1982; ANGUIANO et al., 1993a, 1993b; PEITGEN et al., 2004). Dentre os métodos, utilizaremos os métodos FAPS, FASA, FACA (que utilizam a PSD) e FARMS para avaliar a fractalidade de superfícies, que serão descritos na próxima seção.

## 2.5. Métodos para análise de fractalidade de superfícies

Embora a PSD 2D forneça uma versão da superfície transformada no espaço recíproco, ainda é difícil fazer análises e comparações quantitativas desta informação transformada. O método padrão para resolver este problema é extrair uma PSD 1D a partir da PSD 2D. Feito isso, PSD 1D é representada em função da frequência espacial (número de onda  $q$ ). Uma imagem obtida por AFM com  $n \times n$  pixels (tipicamente  $512 \times 512$ ), resulta em uma PSD 2D também com  $n \times n$  pixels, mas a PSD 1D só requer  $n / 2$  pontos (tipicamente 256) de informações relacionados com a superfície. Obviamente, embora a redução do conteúdo de informação seja bastante elevada, a redução é muito menor em comparação com os casos em que toda a informação da superfície é reduzida a parâmetros únicos da superfície, como o  $R_a$ ,  $R_q$  e etc (FANG et al., 1997; GONZALEZ MARTINEZ et al., 2012). Alguns processos de obtenção da PSD 1D que permitem calcular a dimensão fractal  $D$  são apresentados logo abaixo.

### 2.5.1 Análise fractal por espectro de potência (FAPS)

Neste método, a transformada de Fourier discreta (DFT) de cada linha de varredura

é calculada e, em seguida a média dos quadrados de cada valor absoluto da DFT ao longo de cada linha de varrimento é obtida (ou seja, uma PSD média). Essa média é feita para reduzir as flutuações no espectro de frequência. Essas flutuações se devem pela utilização de um número finito de pontos ( $N_x$ ) para calcular o espectro de frequência. Também surgem devido à ruídos com uma frequência específica que só aparecem em algumas linhas da varredura, podendo ser oriundos de fatores externos como, por exemplo, vibração no piso ou no equipamento, de tal forma que essas frequências não são próprias da superfície (ANGUIANO et al., 1993a; GONZALEZ MARTINEZ et al., 2012). Em termos matemáticos, o que é feito é o seguinte:

$$\Gamma \equiv \langle |F(h_i)|^2 \rangle = \sum_{i=1}^{N_y} \frac{|F(h_i)|^2}{N_y} \quad (37)$$

onde  $N_y$  é o número de linhas de varredura,  $h_i$  é a  $i$ -ésima linha de varredura e  $F$  é a DFT. O comportamento usual de  $\Gamma$  em relação a frequência é da forma  $1/f^\beta$  (uma lei de potência). Portanto, neste caso uma linha reta é obtida através de uma plotagem log-log, na qual a inclinação é  $\beta$ , como mostra a Figura 17. Assim,  $\beta$  é obtido através de uma simples regressão linear

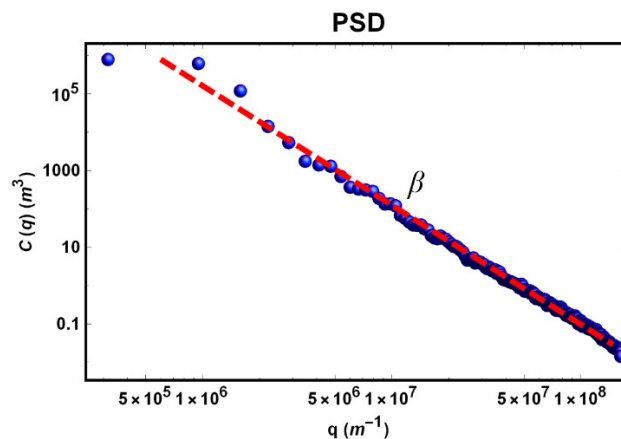
$$\Gamma = C \frac{1}{f^\beta} \quad (38)$$

$$\log \Gamma = \log C + \beta \log f \quad (39)$$

Então, podemos calcular o valor da dimensão fractal  $D$  através seguinte relação

$$D = \frac{7 - \beta}{2} \quad (40)$$

Figura 17 – Gráfico da PSD



Fonte: Elaborado pelo autor.

Se ao invés de usarmos as linhas da varredura usarmos a imagem como um todo, podemos então calcular a transformada de Fourier 2D e a PSD 2D. Isto então permite calcular

a dimensão fractal de outras maneiras (ANGUIANO et al., 1993a, 1993b).

### 2.5.2 *Análise fractal por média de seções (FASA)*

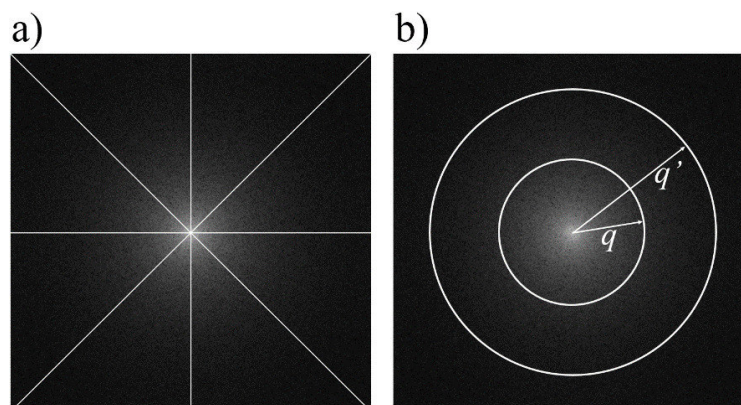
De posse da PSD 2D, podemos fazer várias seções ao longo de diferentes direções a partir do centro (ver Figura 18a) e então obter a PSD 1D para cada uma dessas seções. Depois podemos calcular a PSD média, em seguida plotamos em uma escala log-log (ver Figura 17). Feito isso, calculamos a inclinação  $\beta$  (relacionada com o parâmetro de Hurst ( $H$ ) através da equação  $\beta = 2(H + 1)$ ) e então encontramos a dimensão fractal  $D$  dada pela equação abaixo (ANGUIANO et al., 1993a, 1993b).

$$D = \frac{8 - \beta}{2} \quad (41)$$

### 2.5.3 *Análise fractal por média circular (FACA)*

Uma vez obtida a PSD 2D podemos calcular a PSD 1D de uma forma bastante conveniente. Considerando as variáveis polares  $q$  e  $\varphi$  no plano de interesse, o valor de  $q$  é tomado como a média em todas as direções do espaço recíproco, ou seja, obtemos o valor médio da intensidade para cada valor de raio  $q$  na imagem sobre uma circunferência com centros na origem ( $q_x = 0, q_y = 0$ ), como ilustra a Figura 18b. Dessa forma obtemos a PSD 1D e em seguida em plotamos o gráfico escala log-log da intensidade de  $C(q)$  em função de  $q$ , ou seja da frequência (ver Figura 17). Novamente, calculamos a inclinação  $\beta$  para então encontrarmos a dimensão fractal  $D$ , dada pela mesma equação do método FASA (ANGUIANO et al., 1993a, 1993b).

Figura 18 – Processo da (a) FASA e (b) FACA



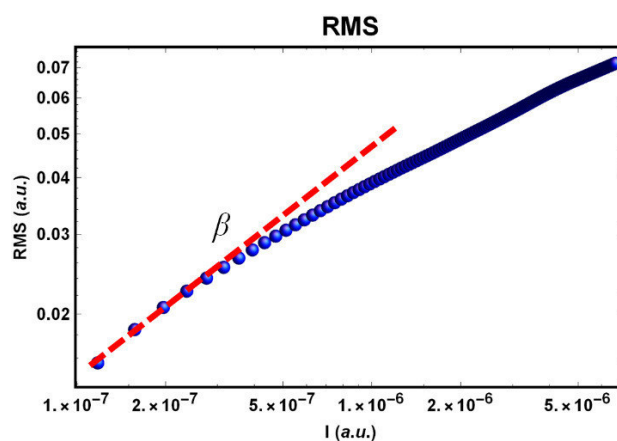
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 2.5.4 Análise fractal por RMS (FARMS)

Este método também é chamado de método do variograma. Diferente dos anteriores, ele não usa a PSD e sim a *rms* da superfície. Embora o método do variograma original use as variâncias, é mais conveniente o usar o desvio padrão (*rms*; apesar de na literatura ser ainda sim chamado de método do variograma). Uma vantagem deste método é que ele é de fácil aplicação, não envolvendo processamento matemático complexo. O mesmo pode ser definido em termos de como o desvio padrão entre as diferenças interpixels variam com a distância. Para os cálculos, toma-se inicialmente o passo de um pixel, a partir de então o procedimento é repetido para incrementos sucessivos de pixels. Então, o valor de um desvio padrão  $R_q(l)$  correspondendo a um certo passo de pixels  $l$  é calculado por recombinação das somas individuais de diferenças quadráticas para as direções  $x$  e  $y$ , respectivamente. Normalmente o procedimento é repetido até um número limite de pixels tomados, porque para distâncias maiores as estatísticas não se mantêm. O parâmetro  $D$  da superfície pode então ser estimado a partir de um gráfico, que chamaremos de RMS, representado pelo log-log do desvio padrão de incrementos em função dos incrementos (PUT et al., 1994). A partir do ajuste linear dos mínimos quadrados dos dados (ver Figura 19) a dimensão fractal pode ser calculada através da seguinte equação:

$$D = 3 - \beta \quad (42)$$

Figura 19 – Gráfico do método FARMS



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Materiais

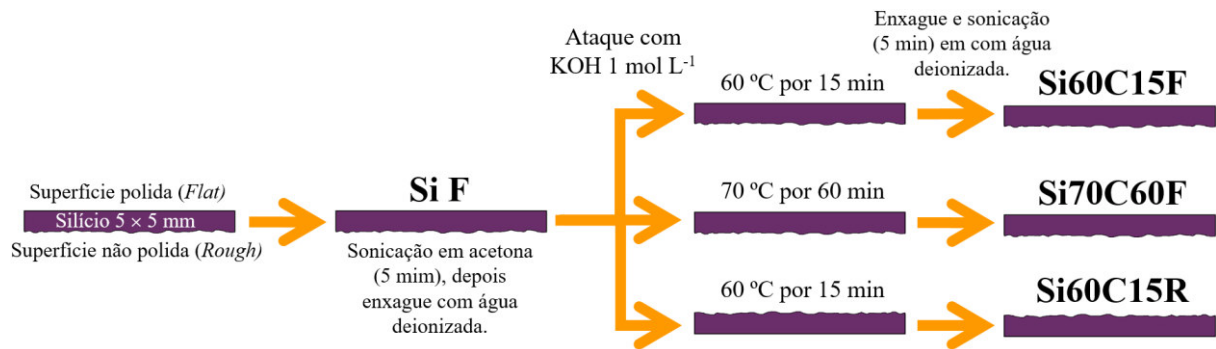
Os substratos de silício foram adquiridos da Ted Pella (EUA). O hidróxido de potássio (KOH) em escamas foi obtido da Sigma-Aldrich (EUA). O óleo de silicone e acetona foram obtidos junto à Synth (Brasil). A água ultrapura foi produzida em um sistema Direct-Q<sup>®</sup>3 UV (Millipore, EUA).

#### 3.2. Preparação dos substratos de silício

Os substratos de silício de 5 × 5 mm pré-cortados (orientação <111>; camada de SiO<sub>2</sub> < 5 nm, tipo *p*, dopado com boro) possuem uma superfície polida (*flat*) e uma não polida (*rough*). O esquema da preparação das amostras é mostrado na Figura 20. Primeiramente, os substratos foram limpos por sonicção a alta frequência (40 kHz) em acetona por 5 min e, então, extensivamente enxaguados com água ultrapura. A superfície *flat* foi utilizada como uma das superfícies em estudo (amostra: Si F). Depois da etapa de limpeza, as amostras foram então submetidas à corrosão (ou “ataque”) anisotrópica com solução de KOH 1 mol L<sup>-1</sup>, sendo o pH igual a 14. Esta solução foi previamente preparada a partir da diluição de 10 mL de solução estoque de KOH 4 mol L<sup>-1</sup> em 30 mL de água deionizada. As amostras de silício foram submersas através de pinças na solução de KOH 1 mol L<sup>-1</sup> e mantidas sob agitação magnética. A solução de KOH 1 mol L<sup>-1</sup> foi mantida em banho de óleo de silicone e um termômetro foi mantido no banho para controle da temperatura, conforme mostrado na Figura 21. Para avaliação do efeito da topografia na adesão microbiana, além da amostra Si F, duas diferentes combinações de tempo de ataque e temperatura foram avaliadas sobre a superfície *flat* do silício: 60 °C e 15 min (amostra: Si60C15F) e 70 °C e 60 min (amostra: Si70C60F). Além disso, para a superfície *rough* foi avaliada a condição de ataque 60 °C e 15 min (amostra: Si60C15R). Após o ataque, as amostras foram lavadas com água ultrapura em abundância e submetidos à sonicção em água ultrapura por 5 minutos. A Tabela 4 resume as amostras utilizadas com suas respectivas descrições.

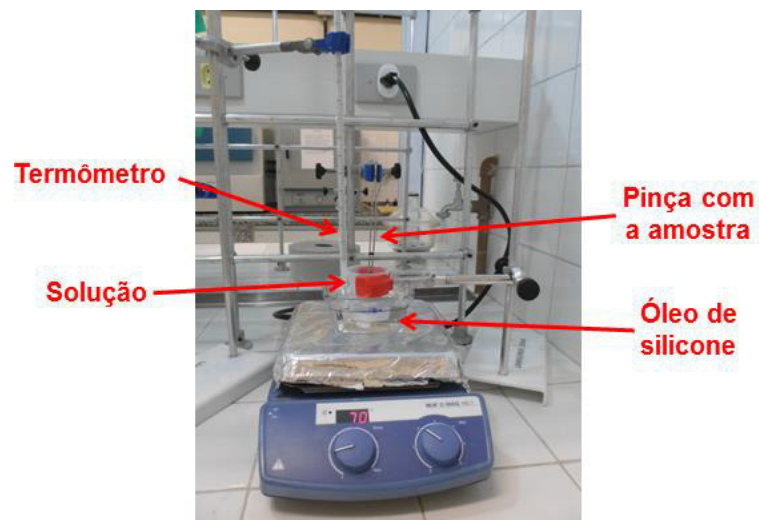


Figura 20 – Esquema das etapas de preparação das amostras



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Arranjo utilizado para corrosão anisotrópica



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 4 – Nomenclatura das amostras utilizadas com suas respectivas descrições de ataque

Amostras	Temperatura (° C)	Tempo (min)	Superfície
<b>Si F</b>	-	-	<i>Flat</i>
<b>Si60C15F</b>	60	15	<i>Flat</i>
<b>Si70C60F</b>	70	60	<i>Flat</i>
<b>Si60C15R</b>	60	15	<i>Rough</i>

Fonte: Elaborado pelo autor.

### **3.3. Caracterização das superfícies com diferentes topografias**

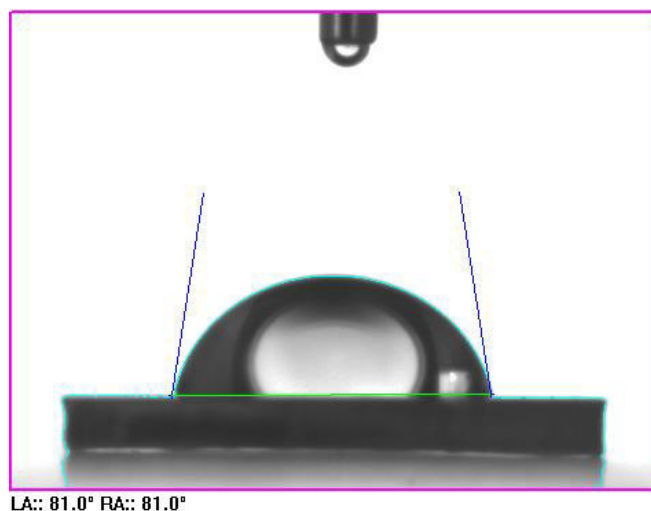
#### ***3.3.1 Microscopia de força atômica (AFM)***

As análises da topografia e da rugosidade das superfícies de todas as amostras foram realizadas através do microscópio de força atômica modelo MFP-3D da Asylum Research. As imagens foram feitas no modo contato, com uma frequência de varredura de 0,4 Hz, varrendo uma área de  $80 \times 80 \mu\text{m}$  com uma resolução de  $512 \times 512$  pixels. Foram feitas medidas em pelo menos 5 substratos diferentes para cada tipo de amostra. Para algumas micrografias que apresentaram artefatos devido a varredura foi aplicado o corretor do Gwyddion “*Corrigir ranhuras horizontais (golpes)*”.

#### ***3.3.2 Avaliação de ângulos de contato***

As medidas de ângulo de contato foram feitas através do método da gota séssil. 18 uL de água destilada foram dispensados através de uma seringa sobre as amostras de silício, e então foi realizada gravação de vídeos do gotejamento nas superfícies das amostras. Os vídeos foram realizados através da câmera pixeLink Nikon, a qual é acoplada ao medidor de ângulo de contato GBX Instrumentation Scientific. Uma vez feita a gravação dos vídeos, a medição do ângulo de contato foi realizada no momento em que a gota se fixava na superfície do substrato, e sua vibração devido a queda cessava. A Figura 22 mostra uma medida realizada pelo equipamento. Foram utilizados pelo menos 5 substratos de cada tipo de amostra para a realização das medidas, em seguida foi calculada a média e o desvio padrão para essas amostras.

Figura 22 – Exemplo de medida realizada para ângulo de contato



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3.3 Espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS)

A análise do ambiente microquímico de superfície dos substratos foi realizada em um espectrômetro fotoeletrônico de raios X K-Alpha (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) equipado com um analisador de elétrons hemisférico e uma fonte de raios X (anodo) de Al ( $K\alpha = 1486,6$  eV). As amostras utilizadas nesta análise foram o Si F e Si60C15F. Espectros *survey* e de alta resolução foram gravados utilizando energias de 200 e 50 eV, respectivamente, e os dados foram analisados usando o software Thermo Advantage (versão 5.921). O *fitting* do espectro foi realizado assumindo o formato de pico como uma mistura de curva Gaussiana e Lorentziana (a razão entre a forma Gaussiana e a forma Lorentziana foi 0,3). Os espectros de fotoelétrons obtidos são a soma de três espectros coletados em três regiões diferentes de cada amostra.

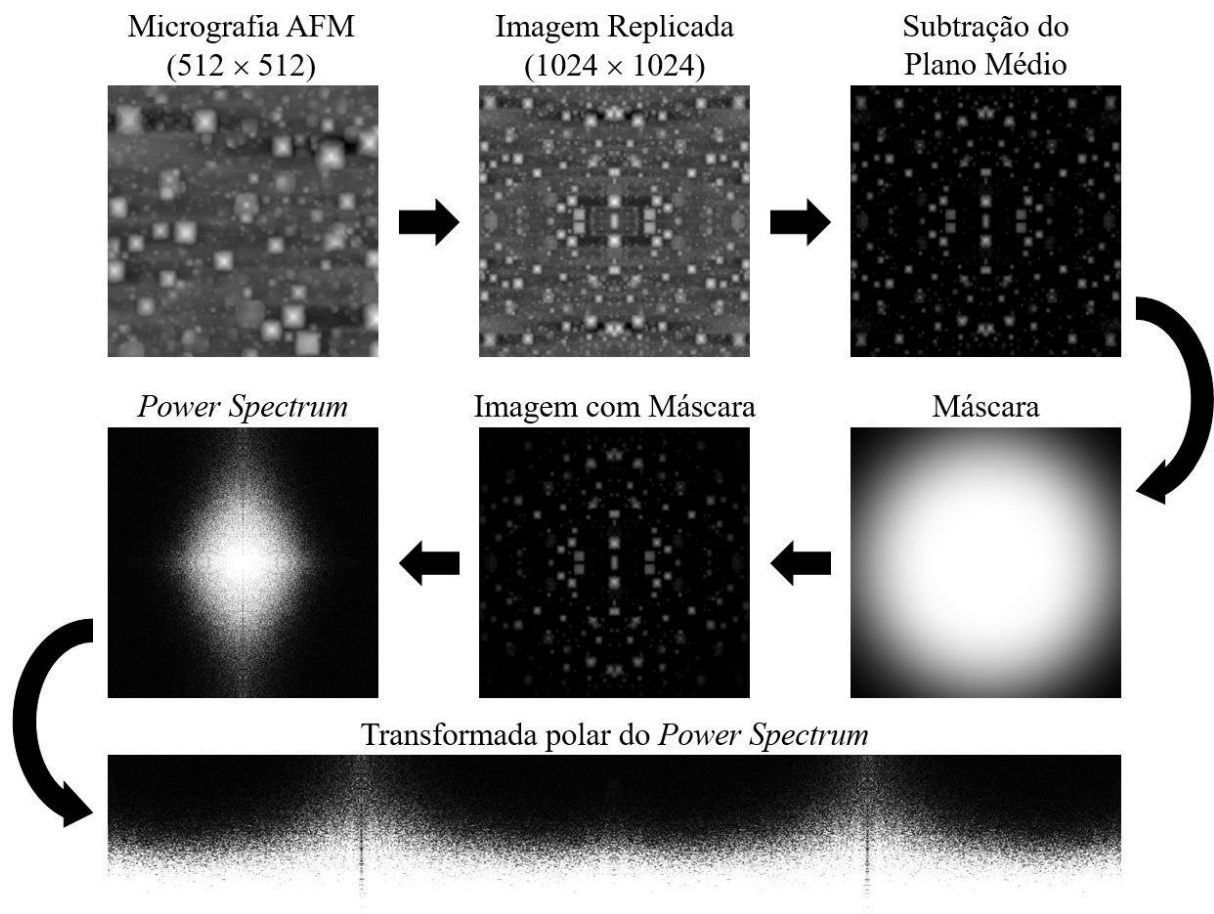
### 3.3.4 Cálculos de parâmetros da superfície

Os parâmetros da superfícies como a rugosidade média ( $R_a$ ), rugosidade média quadrática ( $R_q$ ), assimetria ( $R_{sk}$ ), curtose ( $R_k$ ) e a função de densidade de amplitude (ADF) foram extraídos das micrografias de AFM utilizando o *software* Gwyddion. A função de autocorrelação (ACF) e o comprimento de correlação ( $\xi$ ) das imagens foram calculadas através de algoritmos desenvolvidos no *software* Wolfram Mathematica (ver APÊNDICE A). Uma vez importadas as micrografias de AFM das amostras, suas matrizes foram extraídas e as linhas

(perfis) no sentido da varredura do AFM (em  $x$ ) foram então tomadas para calcular a ACF. Para essa etapa foi utilizada a função do Mathematica “*CorrelationFunction*”. Essa função estima a ACF do perfil por ele mesmo deslocado a partir de uma certa quantidade de pixels. A ACF foi calculada para todas as linhas de varreduras e então sua média foi obtida para reduzir flutuações decorrentes da varredura. O gráfico da ACF obtido é normalizado, de tal forma que seu valor máximo é 1. De posse desse gráfico, o comprimento de correlação foi calculado através da interseção da ACF com uma linha horizontal plotada na altura 0.1 (10% do valor máximo), sendo a posição em  $x$  da interseção (ou da primeira interseção) o comprimento de correlação  $\zeta$ . A detecção desse ponto de interseção pode ser feita através da função indocumentada do Mathematica “*Graphics'Mesh'FindIntersections*” (STACK EXCHANGE, 2014).

Com base em artigos da literatura, algoritmos no Mathematica também foram desenvolvidos para calcular as funções da densidade espectral de potência (PSD) e averiguar as possíveis fractalidade das superfícies em estudo através dos métodos FAPS, FASA, FACA e FARMS (ver APÊNDICE B) (ANGUIANO et al., 1993a, 1993b; GENTILE et al., 2013). No que diz respeito aos métodos FAPS, FASA e FACA, para eliminar os artefatos da transformada de Fourier resultantes da falta de continuidade dos perfis reais (i.e. as imagens tem um tamanho finito), foi utilizado o procedimento de replicação (espelhamento) de imagem proposto por Anguiano *et al.* (1993b). Um esquema mais geral da manipulação das imagens pelo algoritmo é mostrado na Figura 23.

Figura 23 – Esquema da manipulação das micrografias pelo algoritmo no Mathematica para calcular as funções PSD



Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, é importada a micrografia de AFM da amostra com resolução  $512 \times 512$  pixels em escala de cinza, em seguida é feito o espelhamento que resulta em uma imagem de  $1024 \times 1024$  pixels. Depois, é subtraído de todas as alturas o valor da altura média (altura do plano médio), dessa forma todas as alturas passam a ser definidas em relação ao plano médio. Para o método FAPS, a partir dessa imagem é calculado a PSD 1D para cada linha no sentido da varredura do AFM (em  $x$ ) utilizando a função do Mathematica “*PeriodogramArray*”. Então, a média de todas as PSD é obtida para reduzir flutuações decorrentes da varredura. Já para os métodos FACA e FASA, a continuação da manipulação da imagem dá-se com a utilização de uma máscara com gradiente de transparência do centro para as bordas, isso para auxiliar na redução de artefatos (já bastante reduzidos devido ao espelhamento). No passo seguinte é calculado o *Power Spectrum* 2D dessa imagem utilizando novamente a função “*PeriodogramArray*”.

Uma vez obtida a imagem do *Power Spectrum*, é aplicada então uma transformada

polar dessa imagem para passar do plano cartesiano para o polar. Para tal, foi utilizada uma função definida como  $f[x_, y_] := \{\text{Cos}[x]*y, \text{Sin}[x]*y\}$  que é utilizada dentro da função do Mathematica “*ImageTransformation*”. A função  $f$  define uma transformação a partir dos pontos  $\{x, y\}$  da imagem de entrada, enquanto a função “*ImageTransformation*” resulta em uma imagem na qual cada pixel em uma determinada posição é transformado pela função  $f[x_, y_]$ . O passo seguinte consiste em calcular as médias das linhas da imagem da transformada polar do *Power Spectrum*, o qual é equivalente a calcular a média sobre as circunferências na imagem do *Power Spectrum* original. Esse último processo permite obter a PSD 1D. Por fim, para esses três métodos, realiza-se um ajuste linear sobre a PSD média (pelo menos 5 amostras diferentes) para calcular a inclinação da reta, e por conseguinte calcular a dimensão fractal através das fórmulas apropriadas para cada caso descritas anteriormente.

Como dito anteriormente, o método FARMS não utiliza a PSD; a imagem apenas é importada e sua matriz obtida. De posse dessa matriz, as operações descritas desse método são feitas sobre linhas e colunas da imagem, e então a média total (linhas e colunas) é calculada. Para cada imagem são tomadas pelo menos 32 linhas e 32 colunas igualmente espaçadas da amostra, e o gráfico usado para o ajuste linear é resultado da média de pelo menos 5 amostras diferentes.

### **3.4. Incubação com suspensão bacteriana**

#### ***3.4.1 Avaliação de influência da topografia na adesão bacteriana***

Para os ensaios de avaliação da adesão microbiana nos diferentes substratos, a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538p foi utilizada para todas as amostras (cada uma feita em quintuplicata): Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R. Todas as amostras foram esterilizadas em luz UV durante 30 minutos (15 minutos para cada uma das faces). As cepas foram reativadas, inoculadas em meio BHI-ágar e transferidas para 3 mL de caldo BHI (*brain heart infusion*) por meio de alça. O inóculo em caldo BHI foi incubado em estufa a 35 °C por 24 h. Para o ajuste de concentração do inóculo, alíquotas da suspensão bacteriana foram transferidas para um tubo contendo 3 mL de água peptonada. O ajuste da concentração foi feito através da comparação com a escala nefelométrica de McFarland, onde a solução de água peptonada contendo inóculo bacteriano foi ajustada para apresentar turbidez semelhante àquela encontrada no tubo 0,5 da escala, resultando em um número de bactérias no tubo de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  bactérias/

mL. Um volume de 40 uL desta suspensão foi inoculado em cada um dos poços de uma placa para cultura de células (24 poços), que continha 2 mL de caldo BHI em cada poço. Os poços em cada placa foram preenchidos então com o caldo BHI, os substratos com diferentes topografias (cinco para cada tratamento) e a suspensão bacteriana. Após o inóculo da suspensão bacteriana no caldo contendo a amostra, as placas foram incubadas em estufa a 35° C durante cinco diferentes tempos: 3h, 5h, 18h, 26 h e 95 h. Após esse período, o meio de cultura foi retirado e os substratos foram lavados nos poços duas vezes com 1 mL de solução salina 0,85%. Depois desta etapa, as amostras prosseguiram para o processo de coloração com o kit para avaliação de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® *BacLight*<sup>TM</sup>. Nesta etapa, volumes de 40-80 uL da solução (contendo os corantes SYTO 9 e iodeto de propídio) foram gotejados sobre os substratos contendo bactérias e incubadas no escuro por 15 minutos. Por fim, as amostras foram submetidas a uma tensão de cisalhamento, passando-se por uma placa de petri de 90 mm de diâmetro contendo solução NaCl 0,85% em quantidade suficiente para cobrir os substratos de silício. Depois desta etapa, as amostras foram secas livremente ao ar e montadas em lâmina para visualização através de microscopia confocal por varredura a laser (CLSM).

### **3.5. Análise por microscopia confocal por varredura a laser em campo amplo (LF-CLSM)**

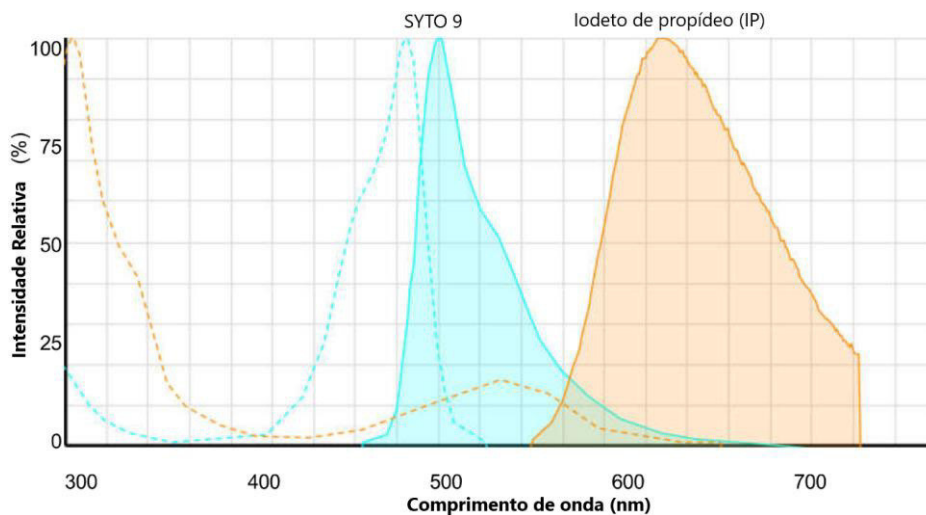
No processo de colocação, com o kit LIVE/DEAD® *BacLight*<sup>TM</sup> L13152, os pós dos dois componentes (SYTO 9 e iodeto de propídio) armazenados em ampolas foram dissolvidos em 10 mL de solução de NaCl 0,85% esterilizada, resultando em uma concentração final de 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Ambos os fluoróforos são capazes de ligar-se a ácidos nucleicos, embora possuam diferentes permeabilidades. SYTO 9 é capaz de penetrar por membranas celulares intactas, corando bactérias vivas e mortas, enquanto o iodeto de propídio penetra apenas membranas danificadas, corando as células bacterianas inviáveis (causando também uma drástica redução da quantidade de SYTO 9 ligado às bactérias inviáveis, quando utilizados simultaneamente). SYTO 9 pôde ser excitado através do laser de comprimento de onda de 482 nm, apresentando um máximo de excitação em 502 nm. Já o iodeto de propídio pode ser excitado através do laser de 543 nm, apresentando um máximo de emissão em cerca de 625 nm (ver Figura 24). As curvas pontilhadas na figura representam os espectros de absorbância para o SYTO 9 (azul) e iodeto de propídio (laranja), enquanto as linhas cheias representam os espectros de emissão de fluorescência. As lâminas foram, então, montadas fixando-se o lado do substrato não desejado em uma lâmina por fita adesiva dupla face. As análises foram realizadas em um microscópio Zeiss LM710, usando uma lente objetiva

Plan Apochromat 20× (abertura numérica de 0,8 e distância focal de 0,55 mm) e uma lente objetiva EC Epiplan NeoFluar de 50× (abertura numérica de 0,8 e distância focal de 0,57 mm).

Para análise da influência da topografia no crescimento bacteriano, micrografias foram obtidas por lentes objetivas 20× e 50× em 1024 × 1024 pixels por campo (definição de imagem), com um tempo de permanência de pixel de 1,27 e 1,58  $\mu\text{s}$ , respectivamente. Foram usadas diâmetros de *pinhole* de 140 e 130  $\mu\text{m}$ , respectivamente, correspondendo a 4,7 e 2 *airy units* (AU) nas condições analisadas. Foram obtidas imagens em um total de 36 e 49 campos adjacentes, totalizando uma área de cerca de 30,53 e 1,42  $\text{mm}^2$ , respectivamente. Nesta análise, as imagens foram coletadas e processadas apenas em um canal (limitado de 485 a 515 nm) através da média de duas leituras de cada linha e com emprego do *beamsplitter* MBS 488, utilizando o laser de 488 nm a 1,5 % como fonte de excitação dos fluoróforos.

Para análise dos volumes dos biofilmes, pilhas de fatias óticas (*stacks*) foram obtidos na lente objetiva de 50×, com passo de 1,0  $\mu\text{m}$ , tempo de permanência de pixel de 0,79  $\mu\text{s}$  e com abertura de *pinhole* de 66  $\mu\text{m}$  (1 AU), varrendo uma área de aproximadamente  $3 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  (2048 × 2048 pixels). Também nesta análise, as imagens foram coletadas e processadas apenas em um canal (limitado de 485 a 515 nm) através da média de quatro leituras de cada linha e com emprego do *beamsplitter* MBS 488, utilizando o laser de 488 nm a 2% como fonte de excitação dos fluoróforos.

Figura 24 – Espectros de absorção e emissão de fluorescência para os fluoróforos SYTO 9 e iodeto de propídio. As curvas pontilhadas na figura representam os espectros de absorbância para o SYTO 9 (azul) e iodeto de propídio (laranja), enquanto as linhas cheias representam os espectros de emissão de fluorescência



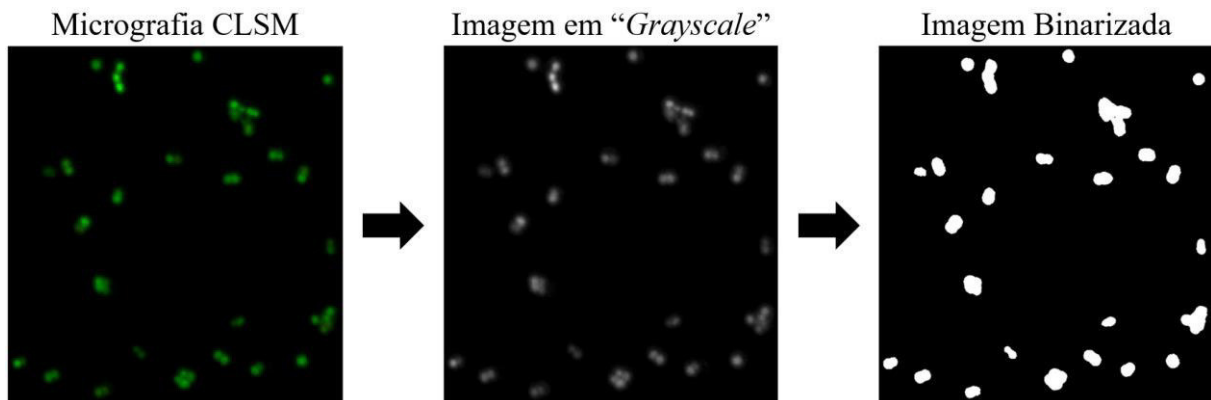
Fonte: Adaptado de Noronha (2017).



### 3.6. Processamento das imagens obtidas por LF-CLSM

Para a determinação da quantidade, distribuição e distância média de bactérias, aglomerados, colônias e biofilmes, bem como ocupação de área, foram desenvolvidos algoritmos no Mathematica para processar as micrografias obtidas por LF-CLSM usando lentes de aumento de 20× (com 6656 × 6656 pixels) e 50× (com 7168 × 7168 pixels) (ver APÊNDICE C). As micrografias por LF-CLSM são exportadas em escalas de cinza (“*Grayscale*”), onde os valores dos pixels variam de 0 (preto) a 1 (branco), e qualquer valor intermediário é atribuído a um tom de cinza. O algoritmo então importa essas micrografias e binariza através da função “*Binarize*”, na qual é escolhido um melhor limiar (“*threshold*”), de forma a revelar a maior quantidade de bactérias, introduzindo o mínimo possível de artefatos. Todos os pixels com valores iguais ou maiores que o *threshold* passam a ter valor igual a 1 (branco), enquanto os com valores abaixo passam a ter valor igual a 0 (preto). No caso das micrografias por LF-CLSM analisadas, o melhor valor observado foi 0,003 (ver Figura 25).

Figura 25 – Da esquerda para a direita: parte ampliada de uma micrografia por LF-CLSM na lente de 50×, sua imagem em escala de cinza e sua imagem binarizada



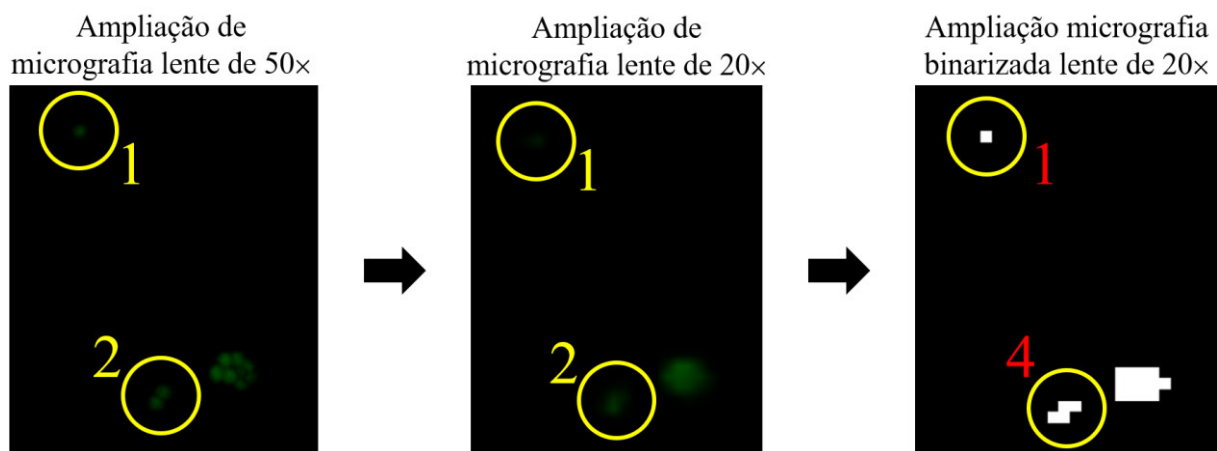
Fonte: Elaborado pelo autor.

Uma vez binarizadas, em cada imagem foi aplicada a função “*MorphologicalComponents*” do *software* Mathematica. Essa função gera uma matriz onde cada pixel de valor 1 da imagem binarizada é substituído por um índice inteiro. Assim, todos os pixels 1 do primeiro elemento identificado na imagem permanecem sendo 1, todos os pixels 1 do segundo elemento são substituídos por 2, todos os pixels 1 do terceiro por 3 e assim por diante. Em seguida, sobre essa matriz é aplicada a função “*ComponentMeasurements*” com a

propriedade “*Area*” dentro da mesma. Essa propriedade gera uma lista com a área aproximada para cada elemento, onde a área de cada pixel é ponderada pela configuração de sua vizinhança.

Nas micrografias feitas com a lente de 50× os valores de áreas (em pixel) abaixo da metade do valor médio para uma única bactéria (~40 pixels) são descartados. Assim, pequenos artefatos (ruídos), tal como pixels isolados, são eliminados. Por outro lado, para as micrografias com aumentos de 20× não foi necessário tal filtro, uma vez que a imagem de uma única bactéria quando binarizada resulta em 1 ou 2 pixels, como mostra a Figura 26. Nessa figura é possível ver uma mesma região ampliada de micrografias de uma mesma amostra feitas com lente de 50× e 20×. Obviamente, a micrografia feita na lente de 50× permite visualizar as bactérias e seus contornos com maior clareza quando comparada com a micrografia obtidas na lente de 20×. Entretanto, a lente de 20× é mais apropriada para a análise das bactérias em ampla escala. Os números em amarelos na Figura 26 representam a quantidade de bactérias dentro do círculo, e os números em vermelho a quantidade de pixel. Como os valores das áreas são dados em termo de pixels, as áreas equivalentes dos elementos identificados são determinadas em  $\mu\text{m}^2$  através de um simples fator representado pela área, em número de pixel, pelo valor real da área de um pixel para cada tipo de aumento (20× e 50×). Por fim, histogramas são gerados com essa lista de valores de áreas, bem como o cálculo da ocupação total de área é obtido através do valor da soma de todas as áreas de todos elementos identificados em relação a área total da micrografia.

Figura 26 – Mesma região ampliada de micrografias por LF-CLSM na lente de 50× (esquerda), lente de 20× (central) e binarização (direita) da imagem central



Fonte: Elaborado pelo autor.

As micrografias obtidas na lente de 20× varrem todo o substrato. Entretanto, da área total do substrato de silício ( $5 \times 5$  mm) apenas uma área quadrada de  $3,6 \times 3,6$  mm ( $4337 \times 4337$  pixels,  $\sim 13$  mm<sup>2</sup>) da região central foi considerada nas imagens de campo amplo. As regiões periféricas do substrato (uma borda com 0,7 mm de cada lado do substrato de silício) foram excluídas da imagem devido artefatos introduzidos tanto no *etching* quanto na secagem das amostras após o processo de incubação e coloração. Além disso, como o manuseio foi realizado com pinças segurando as bordas, artefatos podem ser introduzidos nas regiões periféricas durante essas etapas. Esse procedimento já foi adotado em trabalhos anteriores por nosso grupo (SOUSA et al., 2017; NORONHA et al., 2017).

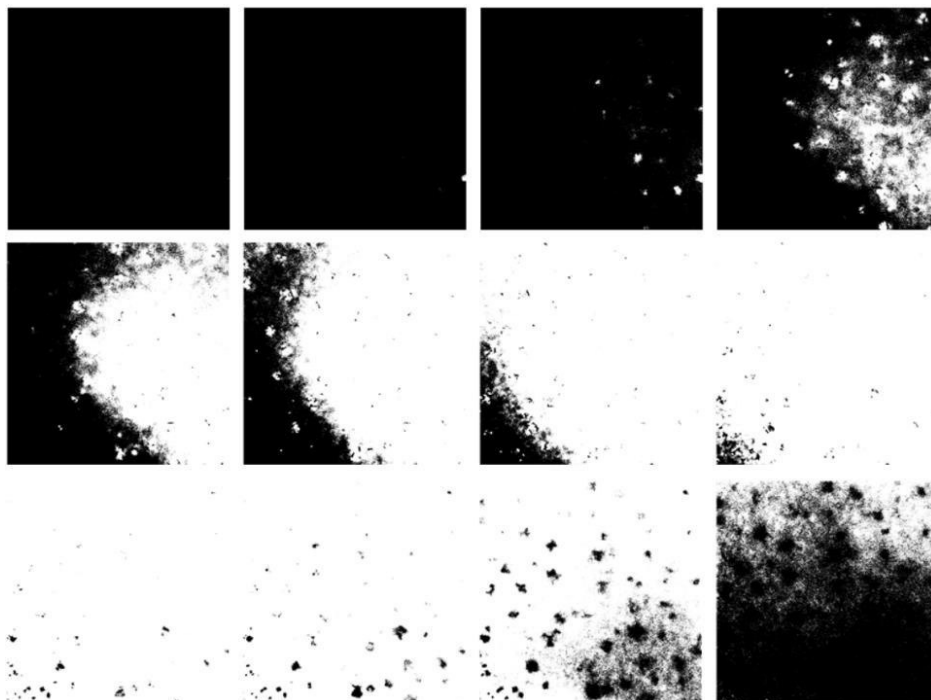
Usando novamente no *software* Mathematica a função “*ComponentMeasurements*” com a propriedade “*Centroid*” dentro da mesma é gerada uma lista com a centroide de cada elemento. Depois, usando a função “*Nearest*” é encontrada a coordenada mais próxima para cada coordenada de cada elemento. Então, é usada a função “*EuclideanDistance*” para calcular a distância para cada par de coordenadas mais próximas, sendo a distância calculada em pixel. Uma multiplicação é feita pelo comprimento real de um pixel para obter a distância em micrometros. Por fim, uma média das distâncias é feita através da função “*Mean*” e um desvio padrão é calculado através da função “*StandardDeviation*”. Essas medidas foram realizadas para todos os elementos dentro de cada faixa de área ( $a$ ) escolhida ( $0,55 \leq a < 1,38$ ,  $1,38 \leq a < 3,3$ ,  $3,3 \leq a < 10$ ,  $10 \leq a < 100$ ,  $100 \leq a < 1000$ ,  $1000 \leq a < 5000$  e  $\geq 5000$   $\mu\text{m}^2$ ) sendo realizada em pelo menos 5 amostras para cada tipo de substrato.

### **3.6.1 Processamento de imagens dos Biofilmes obtidas por CLSM**

Esforço iniciais para quantificar estruturas de imagens de CLSM ocorreram no final dos anos 90 (KUEHN et al., 1998). Logo em seguida, novos trabalhos e *softwares* foram propostos e desenvolvidos para executar tal tarefa, sendo a grande maioria comerciais e muito diferentes em termos de tempo de execução, aceitação de formato de arquivo, procedimento de *thresholding*, reconhecimento de pixel/voxel/objeto, quantificação volumétrica, e determinação de parâmetros estruturais e automatização (HEYDORN et al., 2000; YANG et al., 2000; BEYENAL et al., 2004; NEU et al., 2010). No presente trabalho também foi desenvolvido no Wolfram Mathematica algoritmos para processamento dos *stacks* dos biofilmes obtidos por CLSM na lente de 50× ( $1024 \times 1024$  pixels), com o intuito de calcular alguns parâmetros dos biofilmes (ver APÊNDICE D).

O algoritmo importa os *stacks* das fatias óticas (*layers*) e aplica um filtro gaussiano através da função “*GaussianFilter*” do *software* Mathematica. Isso reduz a quantidade de ruídos nas imagens. Em seguida, as imagens são binarizadas através da função “*Binarize*” com um *threshold* 0,001 (ver Figura 27). Então, é feita uma seleção das imagens a serem consideradas. Isso foi feito através da escolha de um limiar para porcentagem de pixels branco de cada imagem em relação a imagem com a maior quantidade de pixels brancos. Nessa etapa, foi averiguado para cada *stack* a primeira e a última *layer* selecionada pelo algoritmo, de forma a evitar que alguma *layer* significativa fosse descartada. No exemplo da Figura 27 a primeira *layer* considerada é a segunda imagem da primeira linha. Nela é possível observar um elemento mais próximo ao canto inferior direito. Esse elemento corresponde a parte mais alta do biofilme em questão.

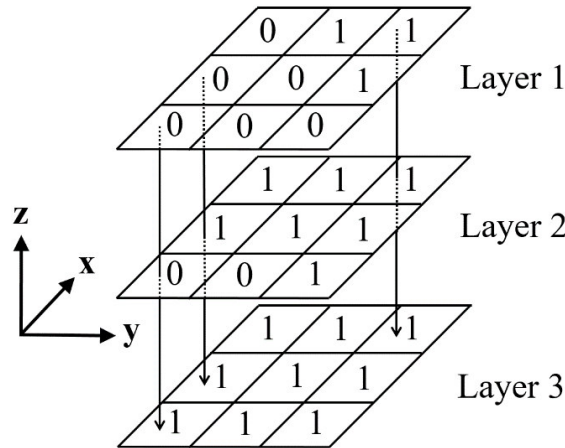
Figura 27 – Sequência de *layers* binarizadas



Fonte: Elaborado pelo autor.

As matrizes das imagens binarizadas selecionadas são então obtidas através da função “*ImageData*”. A partir dessas matrizes, uma nova matriz ( $M$ ) é obtida onde cada linha dessa matriz é uma lista com os valores dos pixels das *layers* que se encontram em uma mesma posição ( $x, y$ ). A Figura 28 mostra um esquema desse procedimento sobre três *layers*, onde cada uma é composta por 9 pixels (matriz  $3 \times 3$ ).

Figura 28 – Esquema da obtenção da matriz  $M$ . Cada *layer* é representada por uma matriz binarizada e cada linha da matriz  $M$  corresponde a um conjunto de valores ao longo das direções em  $z$ , tomados de cima para baixo, conforme indicado pelas setas na figura



Fonte: Elaborado pelo autor.

Assim, a matriz  $M$  resultante é:

$$M = \{\{0, 0, 1\}, \{0, 1, 1\}, \dots, \{1, 1, 1\}\}$$

onde neste caso  $M$  é uma matriz  $9 \times 3$ .

Esse mesmo procedimento é feito para as imagens originais em escala de cinza correspondentes as imagens binarizadas selecionadas, gerando assim uma outra matriz  $M'$ , que por exemplo, poderia ser:

$$M' = \{\{0.0001, 0.0005, 0.0012\}, \{0.0006, 0.0020, 0.0450\}, \dots, \{0.0670, 0.8640, 0.7650\}\}$$

onde após a binarização com o *threshold* 0.001, resultaria na matriz  $M$ .

Cada linha dessa matriz é então normalizada através da divisão de cada linha pelo máximo valor presente em cada linha, assim a matriz  $M'$  resulta em outra matriz  $M''$ , de forma que:

$$M'' = \{\{0.0833, 0.4167, 1\}, \{0.0133, 0.044, 1\}, \dots, \{0.0775, 1, 0.8854\}\}$$

Feito isso, é então criada uma lista decrescente do número de *layers* utilizadas, para este exemplo temos:

$$Lista1 = \{3, 2, 1\}$$

e então o primeiro valor da lista é somado a cada primeiro elemento de cada linha de  $M''$ , o segundo valor é somado a cada segundo elemento da cada linha e assim por diante, de tal forma que se obtém:

$$M''' = \{\{3.0833, 2.4167, 2\}, \{3.0133, 2.044, 2\}, \dots, \{3.0775, 3, 1.8854\}\}$$

No passo seguinte é feita a multiplicação (não sendo matricial) de elementos de mesma posição nas matrizes  $M$  e  $M'''$ , isso resulta em outra matriz  $M''''$  dada por:

$$M''' = \{\{0, 0, 2\}, \{0, 2.044, 2\}, \dots, \{3.0775, 3, 1.8854\}\}$$

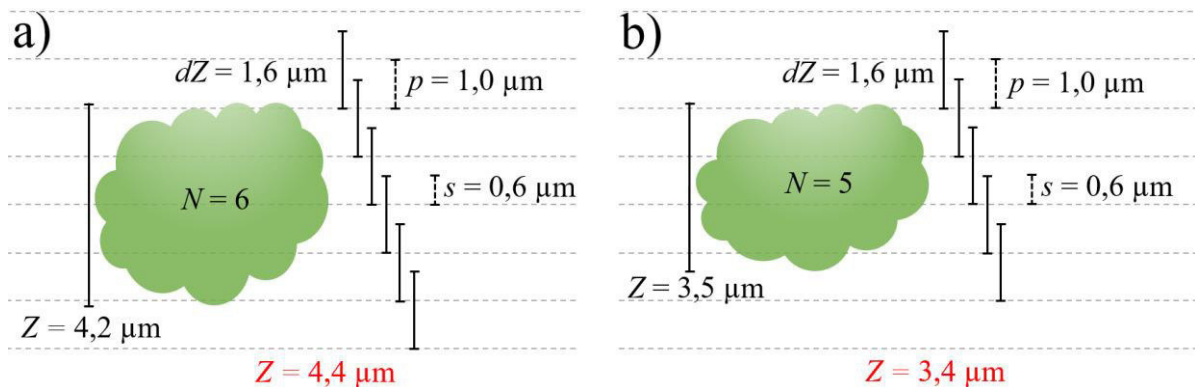
Esse procedimento é feito para diminuir o efeito da “planarização” resultante do processo de binarização, em outras palavras, para gerar uma aproximação mais real das diferenças de alturas do biofilme.

O passo seguinte consiste em encontrar o primeiro elemento diferente de 0 em cada uma das linhas de  $M'''$ , o que é feito através do comando “*First@Cases[#, Except[0]] &/@M'''*”. Esse comando gera uma lista com todos esses valores, ou seja:

$$Lista2 = \{2, 2.044, \dots, 3.0775\}$$

Os valores presentes nessa lista acima estão em função da quantidade de *steps* (número de *layers*) tomados para todo o procedimento, que nesse exemplo seria 3. Em se tratando dos biofilmes, esses não são necessariamente os valores reais das alturas dos mesmos, pois a estimativa da altura real depende de alguns parâmetros usados para a aquisição dos *steps*, tais como espessura da fatia ótica ( $dZ$ ) e tamanho do passo ( $p$ ). Assim, é necessário encontrar uma relação entre esses parâmetros juntamente com o número de *steps* ( $N$ ) utilizados, que resulte em um valor que melhor se aproxima do valor real. Dependendo dos valores tomados para essa aquisição torna-se bastante complicado dizer com exatidão qual o valor real, como por exemplo o uso de um  $dZ$  maior do que o elemento a ser analisado. A Figura 29 mostra um esquema de aquisição de *steps* para dois elementos. O primeiro, Figura 29a, idealiza um elemento de  $4,2 \mu\text{m}$ , que usando as configurações que foram utilizadas no presente trabalho,  $dZ = 1,6 \mu\text{m}$  e  $p = 1,0 \mu\text{m}$ , teria pelo menos 6 *steps* que emitiriam sinal de fluorescência no processo de aquisição dos mesmos, ambos com uma sobreposição  $s = 0,6 \mu\text{m}$ . Já o segundo, Figura 29b, com um tamanho de  $3,5 \mu\text{m}$  teria pelo menos 5 *steps*. Assim, uma boa estimativa para o tamanho real ( $Z$ ), apresentadas nas imagens em vermelho, é obtida através da equação:

$$Z = N \cdot p - dZ \quad (43)$$

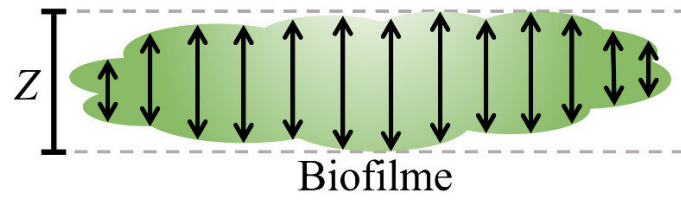
Figura 29 – Esquema da aquisição dos *steps*

Fonte: Elaborado pelo autor.

De posse desse valor calculado, toda lista obtida como a *Lista2* do exemplo é normalizada dividindo todos seus elementos pelo seu maior valor e então multiplica-se esses elementos pelo valor  $Z$  encontrado. Feito isso, a nova lista obtida é dividida em linhas e colunas, de mesmos tamanhos das matrizes dos *steps*. Portanto, dessa forma a matriz final com as alturas da superfície é obtida, e de posse da mesma é possível calcular parâmetros como  $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{sk}$  e  $R_k$  através das fórmulas discretas de suas definições, mostradas anteriormente.

Para fins de comparação, é feita uma estimativa da quantificação da biomassa do biofilme (ver APÊNDICE D). Neste procedimento o biofilme é considerado totalmente preenchido (sem vazios internos) e então a espessura total aproximada de cada posição vertical (cada posição de pixel) é calculada em micrometros. Para isso, uma vez que já foram encontrados os primeiros valores diferentes de 0 em cada linha da matriz  $M'''$ , são encontrados então os últimos valores diferentes de 0, através do comando "*Last@Cases[#,Except[0]]&/@M''''*". Depois, é feito um ajuste para essas posições e por fim, é feito a subtração do primeiro pelo último valor em cada linha, encontrando assim a espessura aproximada. Fazendo a média dessas espessuras obtém-se a espessura média, multiplicando cada uma dessas espessuras pela área real do pixel e somando todos esses valores obtém-se a estimativa do volume total. Obviamente, se tomada a espessura média e a multiplicar pela área real total da imagem obtém-se o mesmo valor para o volume do biofilme, que no caso é dado em  $\mu\text{m}^3$ . Entretanto, é comum encontrar os valores de biomassa dados em  $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^2$ , os quais são o resultado da divisão do volume encontrado pela área do substrato, que nada mais é que a espessura média (FENG et al., 2015). A Figura 30 ilustra algumas das medições das espessuras ao longo do biofilme.

Figura 30 – Esquema para medição do volume e espessura média (quantidade de biomassa) do biofilme



Fonte: Elaborado pelo autor.

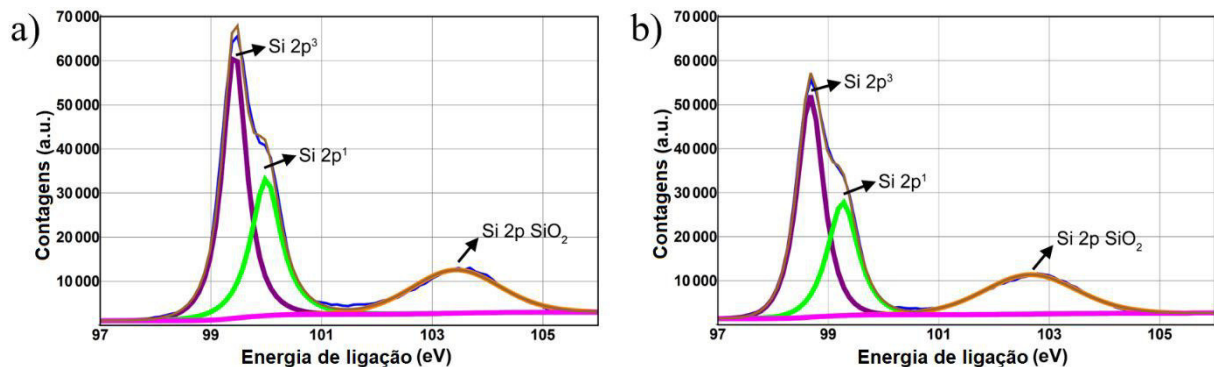


## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Caracterização das superfícies

Para avaliação do ambiente químico superficial foi realizada espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS) do silício puro (Si F) e atacado (Si60C15F). Esses espectros revelaram que os ambientes químicos superficiais de ambos são bastante similares, como mostra a Figura 31. Além disso, imageamento de raio-X de campo amplo e espectros obtidos por espectroscopia de energia dispersiva (EDS), realizados previamente por nosso grupo, revelam a presença de oxigênio e carbono por toda a amostra de silício atacada (Si60C15F) (NORONHA et al., 2017).

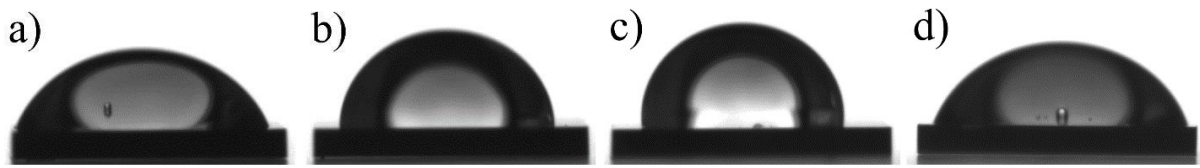
Figura 31 – Espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS) do substrato bruto (Si F) e atacado (Si60C15F)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Através dos ataques (com KOH) em diferentes temperaturas e tempos, foram obtidas superfícies com características bem distintas, resultando em superfícies com diferentes propriedades hidrofóbicas. Isto é comprovado através de medida de ângulo de contato (ver Figura 32) cujos os resultados são mostrados na Tabela 5. As amostras atacadas com KOH apresentaram maior hidrofobicidade em relação a amostra Si F, sendo esse aumento mais expressivo para as amostras Si60C15F e, principalmente, Si70C60F. Esse aumento está associado com a modificação de topografia através da corrosão anisotrópica com o KOH (XIU et al., 2007). O processo de corrosão proporcionou a formação de crateras e pirâmides na superfície dos substratos (ver Figura 33 e Figura 36), as quais causaram mudanças nas características da superfície.

Figura 32 – Imagens para medida de ângulo de contato das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R



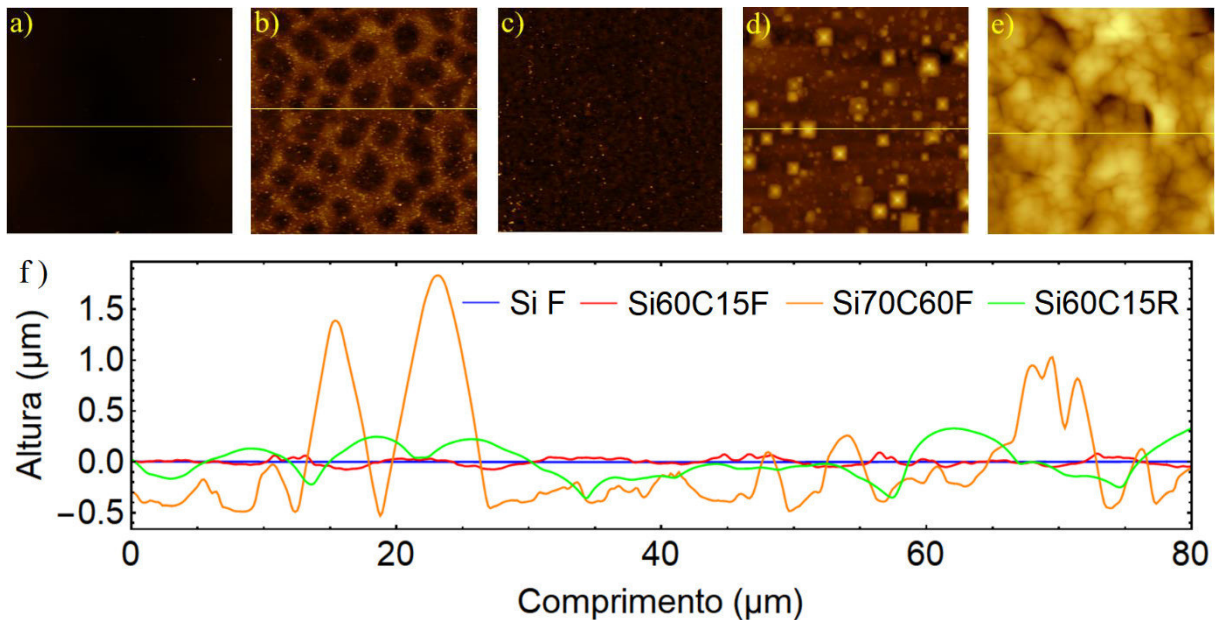
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 – Medidas de ângulos de contato para água destilada nas amostras de silício

Amostras	Ângulo de contato
Si F	$64,7 \pm 4,1$
Si60C15F	$87,4 \pm 2,4$
Si70C60F	$93,1 \pm 3,5$
Si60C15R	$70,4 \pm 7,6$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 33 – Micrografias ( $80 \times 80 \mu\text{m}$ ) obtidas por AFM dos substratos: (a) Si F, (b) e (c) Si60C15F, (d) Si70C60F e (e) Si60C15R. (f) perfis das amostras retirados das posições indicadas pelas linhas amarelas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme dito anteriormente, a formação de pirâmides em superfícies de silício já foi relatada na literatura, decorrentes de ataques químicos (“*etching*”) anisotrópicos

(SCHRÖDER et al., 1999; XIU et al., 2007; LIU et al., 2014; MA et al., 2014; JIANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Os valores de  $R_a$  e  $R_q$  obtidos por microscopia de força atômica para o Si F foram  $\sim 0,6$  e  $\sim 0,8$  nm, respectivamente. Através do AFM, pode-se afirmar que as amostras que permaneceram durante mais tempo em solução de ataque (Si70C60F) apresentaram os maiores valores de  $R_a$  e  $R_q$  ( $\sim 226$  e  $\sim 329$  nm, respectivamente), como mostra a Tabela 6. Nessas amostras, em algumas regiões houve a formação de grandes pirâmides da ordem de alguns micrômetros (mesma ordem de grandeza de bactérias), mostrada na Figura 33d. Apesar da distribuição das posições e dos tamanhos das pirâmides terem sido randômicas, observamos que todas estão com as bases nas mesmas direções, mostrando que há planos em que a corrosão do silício é maior, tratando-se, portanto, de uma corrosão anisotrópica (descrita anteriormente na seção 2.1.2).

Em contrapartida, as amostras Si60C15F apresentaram crateras com profundidades de dezenas ou poucas centenas de nanômetros de alturas. Todavia, suas extensões são da ordem de alguns micrômetros, como mostra a Figura 33b. Essas amostras apresentaram ainda pequenas pirâmides de dezenas ou poucas centenas de nanômetros, vistas como pontos mais claros na Figura 33b. Os valores de  $R_a$  e  $R_q$  foram  $\sim 25$  e  $\sim 32$ , respectivamente. Relativamente, essas amostras apresentaram o maior desvio padrão para esses parâmetros, como mostra a Tabela 6. Isto se deve ao fato que nessas amostras houve uma variação na intensidade do ataque ao longo de toda a superfície, proporcionando assim, a formação de regiões com crateras menores, bem como menor quantidade de pirâmides pequenas e, por conseguinte, rugosidades menores (ver Figura 33c). As superfícies das amostras Si60C15R apresentaram uma distribuição de picos largos com caráter randômico (ver Figura 33e), com valores de  $R_a \sim 178$  e  $R_q \sim 226$ , respectivamente. O valor de  $R_q$  é cerca de 100 nm menor que os valores obtidos para as amostras Si70C60F. O padrão da superfície não polida do substrato de silício é o mesmo antes da amostra passar pelo ataque a 60 °C por 15 min.

A Figura 33f mostra os perfis das micrografias por AFM das amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R extraídos nas posições indicadas pelas linhas amarelas, das respectivas micrografias mostradas na Figura 33, extraídas com auxílio do programa Gwyddion. É possível observar que para o Si F, o perfil corresponde a praticamente uma linha reta quando analisado em uma escala de altura em micrômetros, representado pela linha azul. Para a amostra Si60C15F observa-se picos e vales de ordem de grandezas de dezenas ou poucas centenas de nanômetros, ilustrado pela linha vermelha. Já para a amostra Si70C60F onde o ataque foi mais intenso, é possível observar estruturas que variam de centenas de nanômetros a poucos micrômetros (linha laranja). Essas estruturas se devem principalmente às grandes pirâmides

formadas nessas condições de ataque. Por fim, no perfil das amostras Si60C15R é possível observar elementos da ordem de algumas centenas de nanômetros (linha verde), porém menos agudos quando comparados com as estruturas encontradas no perfil da amostra Si70C60R.

Tabela 6 – Valores dos parâmetros de superfície das amostras de silício com diferentes topografias e seus desvios padrões

Amostras	$R_a$ (nm)	$R_q$ (nm)	$R_{sk}$	$R_k$	$\xi$ ( $\mu\text{m}$ )
<b>Si F</b>	$0,63 \pm 0,18$	$0,80 \pm 0,23$	$1,27 \pm 0,92$	$13,94 \pm 21,21$	$12,10 \pm 1,78$
<b>Si60C15F</b>	$25,30 \pm 11,45$	$31,65 \pm 12,53$	$1,05 \pm 1,20$	$5,07 \pm 9,43$	$3,00 \pm 0,92$
<b>Si70C60F</b>	$225,94 \pm 34,31$	$329,42 \pm 38,82$	$1,85 \pm 0,30$	$5,83 \pm 2,79$	$3,73 \pm 0,65$
<b>Si60C15R</b>	$178,28 \pm 9,29$	$226,18 \pm 12,05$	$-0,37 \pm 0,16$	$0,39 \pm 0,54$	$8,18 \pm 1,01$

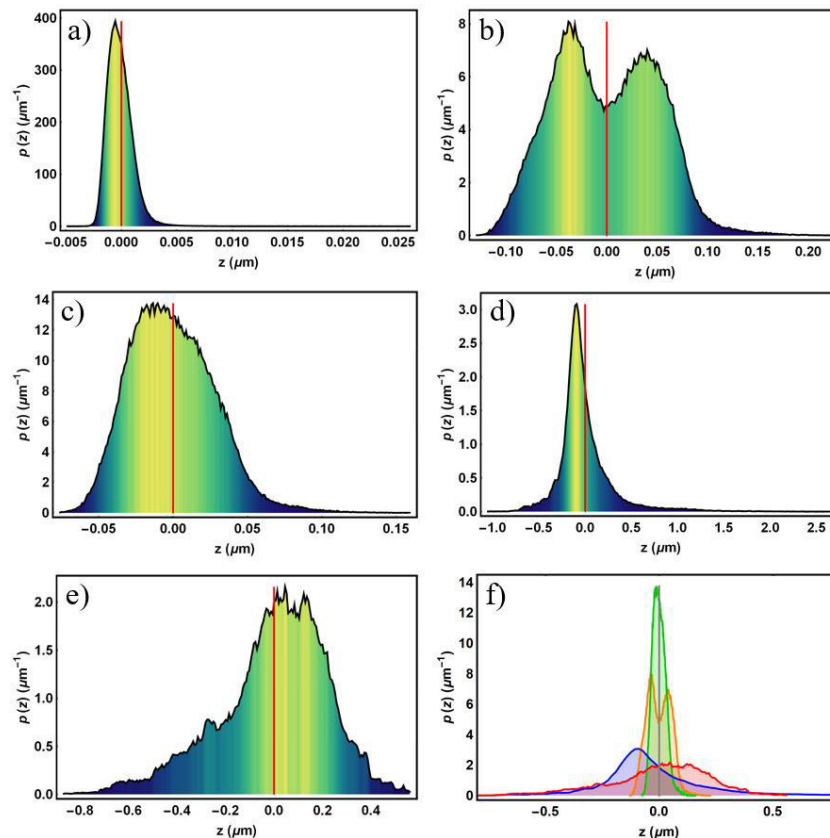
Fonte: Elaborado pelo autor.

Através do Gwyddion, as funções de densidade de amplitude (distribuição de alturas) das amostras foram extraídas e plotadas (no Mathematica) como mostra a Figura 34. Observamos que para as amostras Si F (Figura 34a), Si60C15F (Figura 34b e c) e Si70C60F (Figura 34d), a maior parte da superfície encontra-se abaixo do plano médio (representado pela linha vermelha nos gráficos). Em razão disso, vemos na Tabela 6 valores positivos para a assimetria ( $R_{sk}$ ) para as respectivas amostras. Haja visto a pouca variação de altura, as amostras Si F apresentaram distribuição de altura bastante concentrada em torno do plano médio (ver Figura 34a). Para as amostras Si60C15F com superfícies com grandes crateras (semelhantes às da Figura 33b), é possível observar dois máximos de distribuição (ver Figura 34b), o que se encontra à esquerda da linha vermelha se deve às grandes crateras. De forma oposta, o máximo da direita é devido as regiões onde não houve formação de crateras, representando, portanto, os planos mais elevados em relação ao plano médio. Em regiões das amostras Si60C15F onde não houve formação de grandes crateras (tais como a Figura 33c), a distribuição apresenta apenas uma região de máximo como mostra a Figura 34c. Novamente, devido essas diferentes regiões, houve um grande desvio padrão no valor calculado para a assimetria dessas amostras.

As amostras Si70C60F também apresentam apenas um pico em sua distribuição de amplitudes, possuindo ainda o maior valor de assimetria (1,85) entre as amostras (ver Tabela 6). Isso indica que a distribuição de alturas está mais deslocada em relação ao plano médio quando comparadas com as demais amostras. A Figura 34f ilustra tal fato. Neste gráfico vemos que o pico da linha azul, usada para a amostra Si70C60F (referente à Figura 34d), encontra-se

mais deslocado em relação a linha vertical cinza (plano médio) quando comparado com os demais picos das amostras Si60C15F (linhas verde e laranja) e Si60C15R (linha vermelha). Neste gráfico a plotagem da distribuição da amostra Si F é inviável devido sua escala no eixo  $p(z)$  ser muito maior que as demais. Entretanto, quando vemos a escala comprimento ( $z$ ) da Figura 34a, vemos que é menor que as demais. Assim podemos garantir que a distribuição não se encontra mais deslocadas que as das outras amostras. O motivo da maior assimetria das amostras Si70C60F são as grandes pirâmides presentes nessas amostras, pois os topos das pirâmides correspondem às maiores alturas. Porém as áreas dos topos dessas pirâmides são menores que as áreas mais próxima da base, bem como da área onde não há pirâmides. As amostras Si60C15R foram as únicas que apresentaram valores negativos de assimetria (-0,37), o que indica que a maior parte da superfície se encontra acima do plano médio, como mostra a Figura 34e. Isto pode ser explicado devido a presença de picos largos e vales estreitos, quando comparados com esses picos (ver linha verde na Figura 33f).

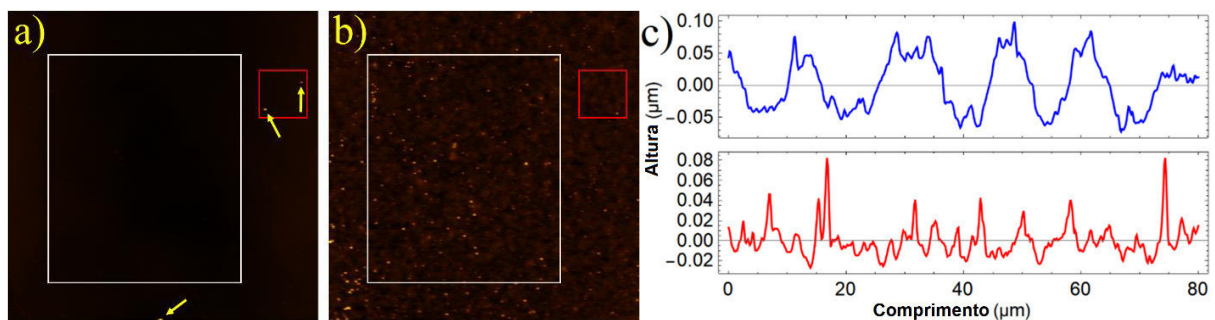
Figura 34 – Gráficos das funções de distribuição de amplitude das amostras (a) Si F, (b) e (c) Si60C15F, (d) Si70C60F e (e) Si60C15R. Em (f) são mostradas as funções das imagens (b), (c), (d), e (e), nas cores laranja, verde, azul e vermelho, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação aos valores de curtose apresentados na Tabela 6, vemos que o valor para as amostras Si F foi o maior dentre as amostras (13,94). Do ponto de vista da curtose como uma medida da agudez de uma superfície, esse valor não era esperado, pois trata-se da superfície mais plana. Entretanto a presença de alguns elementos nas superfícies (podendo ser impurezas) medidas por AFM podem causar grandes variações na medição devido à sensibilidade deste parâmetro. Por exemplo, a Figura 35a é a mesma micrografia mostrada na Figura 33a para a amostra Si F. Nesta imagem, podemos observar três pontos mais claros indicados pelas setas (ver também Figura 36a). Quando o cálculo da curtose é feito em toda a imagem (incluindo a presença desses pontos), o valor obtido é 59,4. Por outro lado, quando considerado apenas a área delimitada pelo retângulo branco, o valor obtido é  $\sim 0,03$  (valor em maior conformidade para esse tipo de superfície). Já para a área delimitada pelo quadrado vermelho o valor é  $\sim 261$  (muito acima do esperado). Portanto, fica evidente o quanto esses elementos influenciam no cálculo para superfícies muito planas, o que dificulta sua caracterização em relação ao parâmetro da curtose. Assim, deve-se tomar cuidado para seu uso em relação a esse tipo de superfície.

Figura 35 – a) Micrografia de AFM do Si F com presença de elementos que influenciam na medida da curtose, (b) Micrografia de AFM do Si60C15F e (c) perfis da amostra Si60C15F com (azul) e sem (vermelho) grandes crateras



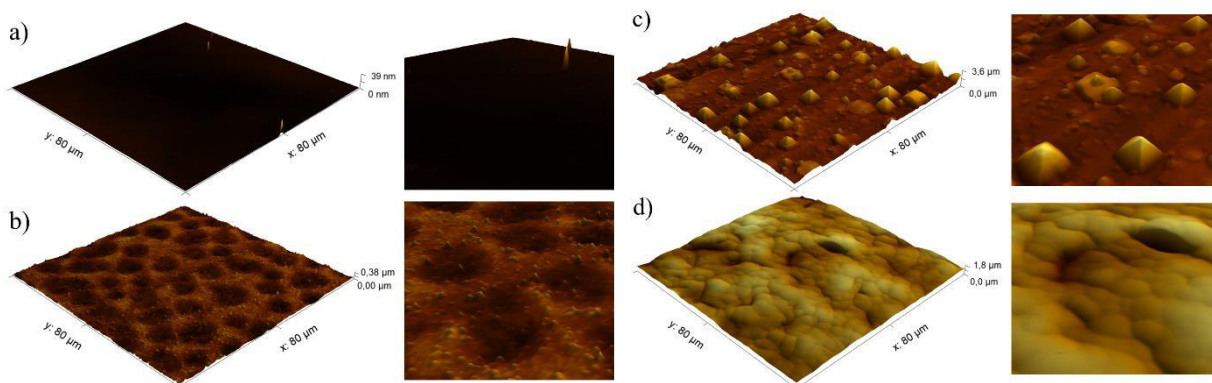
Fonte: Elaborado pelo autor.

Novamente, também para as amostras Si60C15F o valor da curtose teve um grande desvio padrão (9,43) para o valor médio (5,07) devido a maior variação das topografias dessas amostras. Enquanto a superfície mostrada na Figura 33b apresenta valor de -0,14, a superfície mostrada pela Figura 33c apresenta valor de 25,8 para a curtose. Embora ambas as superfícies apresentem pequenas pirâmides (pontos claros), fica evidente que as grandes crateras apresentadas na Figura 33b (ver também Figura 36b) modulam mais o perfil da superfície do que propriamente as pirâmides, tornando o perfil menos agudo (perfil azul Figura 35c) e,

consequentemente, refletem em menor valor para curtose. Todavia, na ausência dessas crateras, as pirâmides têm maior influência sobre o perfil, tornando-o mais agudo (perfil vermelho Figura 35c) e, portanto, refletindo em maior valor para curtose. É relatado que características mais agudas terão uma contribuição relativa maior em escalas menores em comparação com ondulações suaves de mesma amplitude vertical (XU et al., 2011). Diferentemente das amostras Si F, os valores calculados para a curtose das superfícies Si60C15F não são tão alterados quando tomados em diferentes regiões. A Figura 35b é a mesma micrografia mostrada na Figura 33c, e o valor da curtose calculado para toda a imagem, para a região delimitada pelo retângulo branco e quadrado vermelho, são 25,8, 21,3 e 18,7, respectivamente.

O maior valor da curtose entre as amostras foi observado para as amostras Si70C60F (5,83), devido a presença das grandes pirâmides (ver Figura 36c). Esta análise foi mais precisa quando comparadas com as anteriores, haja visto o menor desvio padrão (2,79). Em contrapartida, o menor valor da curtose foi observado para as amostras Si60C15R (0,39). Essa baixa medida na agudez era esperada uma vez que nessas amostras os picos são mais largos (ver linha verde da Figura 33f e Figura 36d). Assim como para as amostras Si60C15F, as amostras Si70C60F e Si60C15R não apresentam grandes variações para os valores da curtose quando tomadas em diferentes regiões das micrografias. Embora as escalas no eixo z das micrografias apresentadas em 3D na Figura 36 não estejam normalizadas, essa visualização facilita uma comparação dos elementos presentes nas superfícies em relação às áreas restantes das mesmas.

Figura 36 – Micrografia de AFM em 3D da amostra (a) Si F (com presença de elementos que influenciam na medida da curtose), (b) Si60C15F (com grandes crateras), (c) Si70C60F (com grandes pirâmides) e (d) Si60C15R

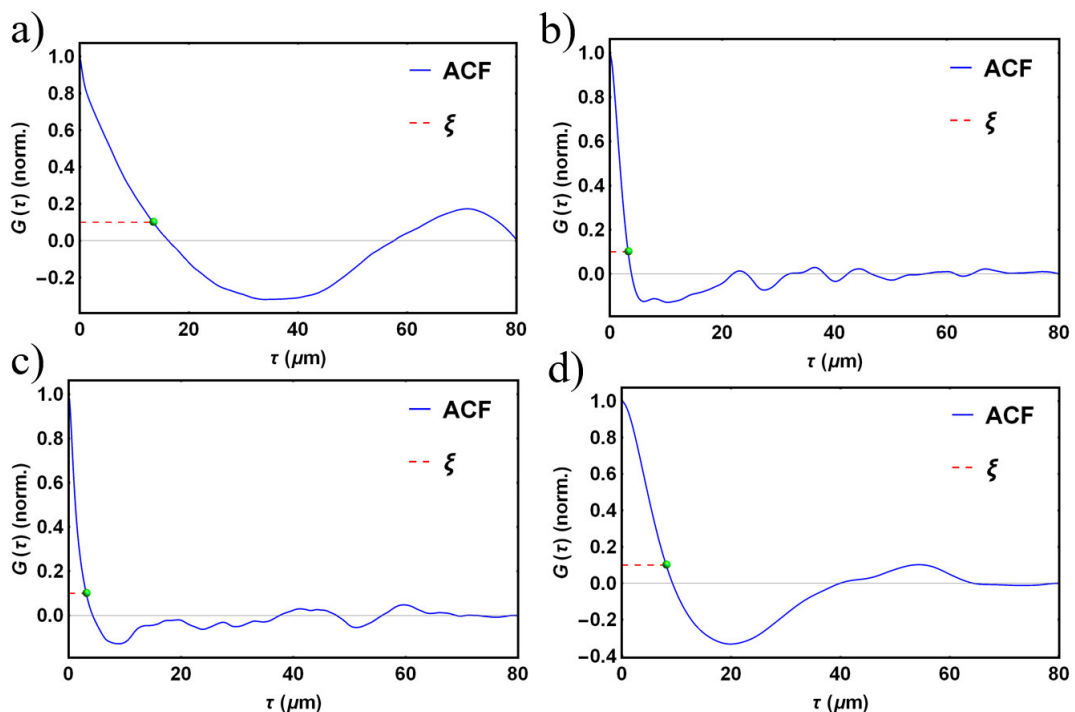


Fonte: Elaborado pelo autor.

A última coluna da Tabela 6 traz os valores dos comprimentos de correlação das

amostras de silício. Vemos que entre as amostras o maior comprimento de correlação é calculado para as amostras Si F (12,20  $\mu\text{m}$ ). Como essas amostras são mais planas, os deslocamentos laterais iniciais encontram-se mais correlacionados, apresentando assim menor variação quando comparada com as demais amostras, resultando em um maior comprimento de correlação (ver Figura 37a). Em contrapartida, o menor comprimento de correlação foi observado para as amostras Si60C15F (3,00  $\mu\text{m}$ ), seguida pelas amostras Si70C60F (3,75  $\mu\text{m}$ ). Devidos a presença de pirâmides nessas amostras (que tornam a superfície mais aguda), os deslocamentos laterais para os cálculos da ACF influenciam mais fortemente seus valores, resultando assim em um decaimento mais acentuado, conforme mostram as Figura 37b e Figura 37c, respectivamente. Por fim, o valor do comprimento de correlação para as amostras Si60C15R foi 8,18  $\mu\text{m}$ . Novamente, devido aos largos picos nessas amostras, uma menor variação na ACF para os deslocamentos iniciais é evidenciada, resultando assim em um maior comprimento de correlação quando comparado com as amostras Si60C15F e Si70C60F, na qual apresentam superfícies com maior agudez (ver Figura 37d).

Figura 37 – Gráficos das ACF das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R



Fonte: Elaborado pelo autor.



### 4.1.1 Análise da fractalidade

Para averiguar a precisão dos algoritmos, imagens com coeficientes de Hurst variando de 0 a 1 foram geradas no Gwyddion versão 2.48, através do diretório “*Processamento de dados* → *Sintético* → *Browniano*” (sendo escolhida a opção “*distribuição Gaussiana*” no gerador), e então foram testadas nos mesmos. A Tabela 7 apresenta os valores teóricos das dimensões fractais ( $D$ ) e os valores calculados como resultado do melhor ajuste sobre os gráficos obtidos. Já a Figura 38 mostra a plotagem desses valores (teórico versus calculados). Assim é possível ter uma rápida noção geral da precisão desses algoritmos.

Tabela 7 – Valores das dimensões fractais calculados pelos algoritmos no Mathematica

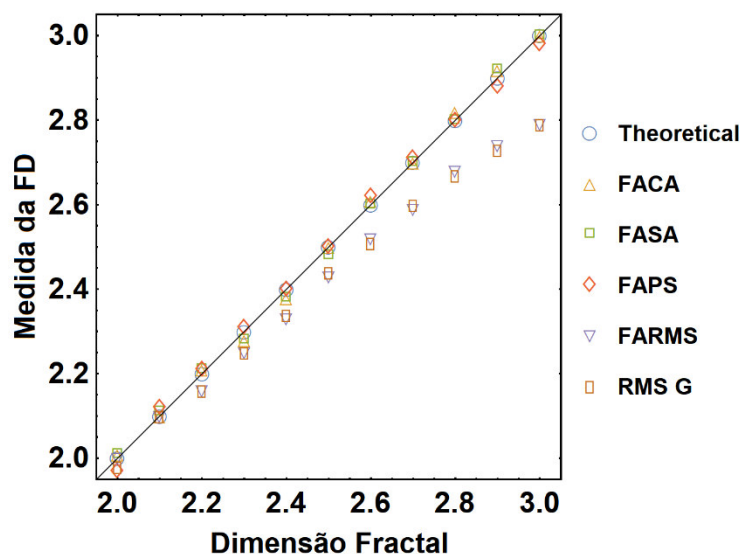
$D$	FAPS	FASA	FACA	FARMS
<b>2,00</b>	1,97	2,01	2,01	2,00
<b>2,10</b>	2,12	2,11	2,10	2,10
<b>2,20</b>	2,21	2,21	2,21	2,16
<b>2,30</b>	2,31	2,28	2,29	2,25
<b>2,40</b>	2,40	2,38	2,38	2,33
<b>2,50</b>	2,50	2,48	2,50	2,42
<b>2,60</b>	2,62	2,60	2,61	2,52
<b>2,70</b>	2,71	2,70	2,70	2,59
<b>2,80</b>	2,80	2,80	2,82	2,61
<b>2,90</b>	2,88	2,92	2,92	2,64
<b>3,00</b>	2,98	3,00	3,00	2,68

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores obtidos pelos métodos que utilizam a PSD tiveram bons resultados, uma vez que os valores obtidos foram próximos ou iguais aos valores esperados. Esses resultados apresentam boa conformidades aos obtidos por Anguiano *et al.* (1993b) para o método FACA, e um pouco melhor para o método FAPS, testados pelos autores em imagens com fractalidade estabelecidas geradas por outro algoritmo (*IFR algorithm*). Entretanto, podemos observar que para o método FARMS a precisão foi maior apenas para os menores valores de fractalidade, com os valores calculados se afastando gradativamente dos valores esperados a medida que a fractalidade da imagem aumenta (ver Figura 38). Todavia, esses valores calculados estão

bastante próximos dos valores para a dimensão fractal calculados pelo Gwyddion (RMS G) utilizando o método “*Particionamento*” (Dentro do Gwyddion: “*Processamento de dados* → *Estatísticas* → *Dimensão fractal*”) para imagens geradas pelo mesmo gerador e nas mesmas condições (ver Figura 38).

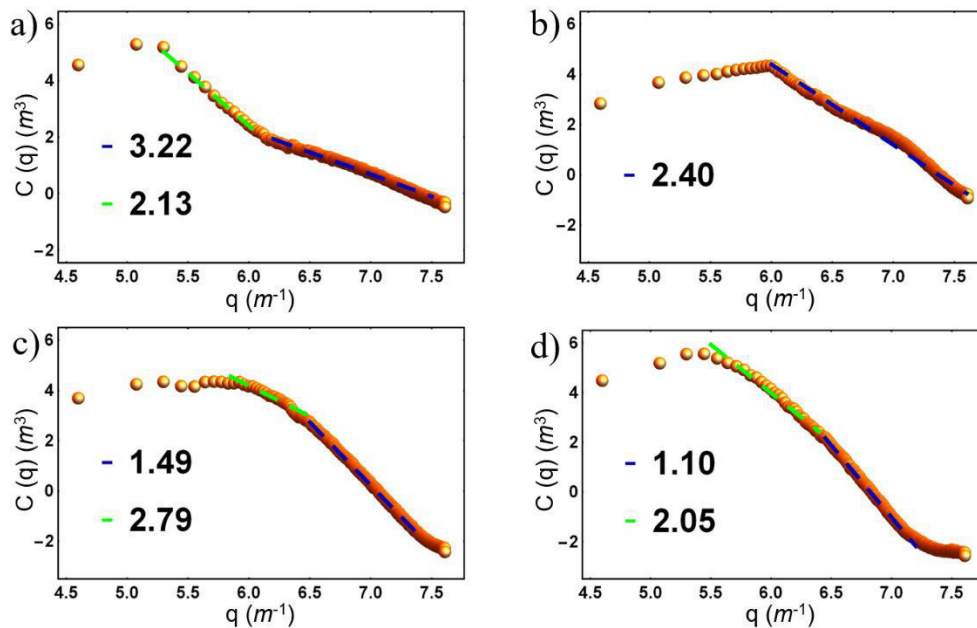
Figura 38 – Gráficos dos valores calculados para a dimensão fractal através dos algoritmos FACA, FASA, FAPS e FARMS em comparação com os valores teóricos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após averiguar a precisão dos algoritmos em imagens com fractalidade bem definidas, foram feitas análises da fractalidade dos substratos de silício. Todos os gráficos da PSD 1D gerados estão plotados em escala logarítmica (log-log), entretanto, os valores apresentados nos eixos são referentes ao processo de ajuste linear, utilizado para o cálculo da dimensão fractal, devendo ser tratado então como arbitrário. A Figura 39 mostra os gráficos das PSD 1D para as amostras de silício obtidos através do método FACA. Para a amostra Si F (ver Figura 39a) é possível observar duas regiões que apresentam uma certa linearidade, o que indica que para essas regiões as frequências têm um comportamento da forma de uma lei de potência, sendo a primeira região, de mais baixa frequência (linha verde), comumente usada para o cálculo da fractalidade (XU et al., 2011, 2012). O valor 2,13 para a fractalidade é coerente com a teoria que prevê que, de uma forma geral, superfícies mais planas possuem fractalidade mais baixa (MANDELBROT, 1982; MANDELBROT et al., 1984; MANNELQUIST et al., 1998). O segundo ajuste linear, feito na região de altas frequências (linha azul), resulta em uma fractalidade 3,22, acima do máximo valor ( $D = 3$ ) que prevê a teoria para fractalidade de superfícies.

Figura 39 – Gráficos da PSD 1D das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R obtidos através do método FACA



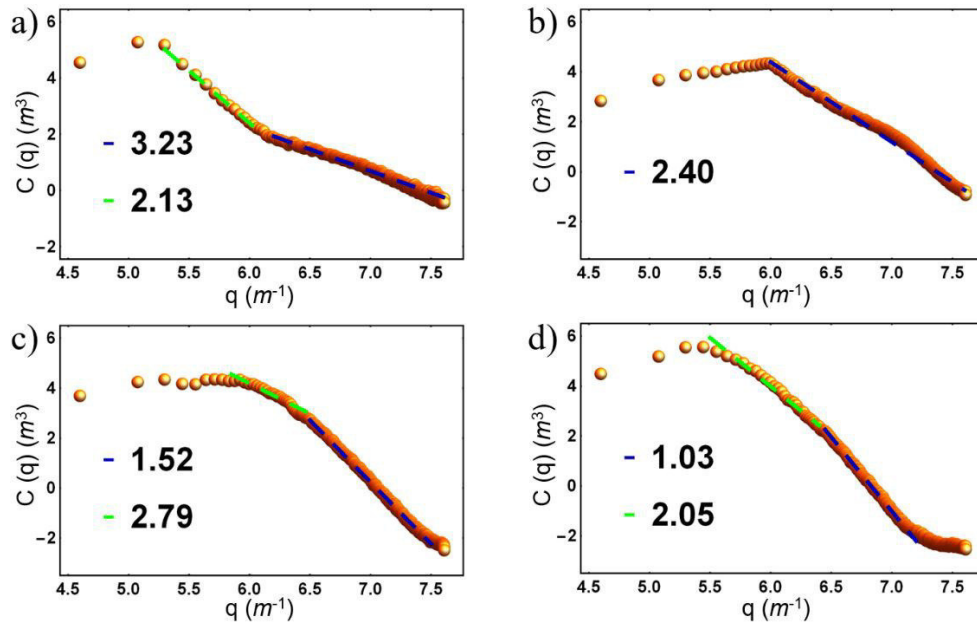
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a amostra Si60C15F é observado um aumento na dimensão fractal, sendo o valor calculado igual a 2,40 (ver Figura 39b). Para essa amostra houve um maior ajuste linear, o que indica que essa amostra apresenta melhor ajuste com uma lei de potência. Já para a amostra Si70C60F, o gráfico apresenta duas regiões lineares, sendo que a primeira (linha verde) resulta em uma dimensão fractal igual a 2,79 (ver Figura 39c) seguida por uma região linear de altas frequências sob lei de potência que resultaria em uma dimensão fractal 1,49, portanto fora de faixa teórica. Finalmente, para a amostra Si60C15R fica evidente a dificuldade de identificar alguma região linear logo após a diminuição da intensidade da PSD, impossibilitando o cálculo mais preciso da dimensão fractal para essa amostra.

A Figura 40 mostra as PSD 1D e os valores da fractalidade obtidas através do método FASA. Os gráficos e valores apresentados mostram que, quando tomada várias seções ao longo de diferentes direções a partir do centro da PSD 2D, os resultados obtidos praticamente não diferem dos resultados obtidos pelo método FACA. Já para o método FAPS, é possível observar diferenças tanto nos valores obtidos quanto nos gráficos (ver Figura 41). Para a amostra Si F, um ajuste na região linear (linha verde) resulta em o valor de  $D = 2,19$ , um pouco maior do que os valores observados pelos métodos anteriores. A partir dessa região, é possível observar um comportamento descrito na literatura como correlação  $K$  (ou modelo  $ABC$ ), que obedece a equação  $g(f) = A/[1 + (Bf)^2]^{(C+1)/2}$ . Assim, é possível calcular a curva de ajuste

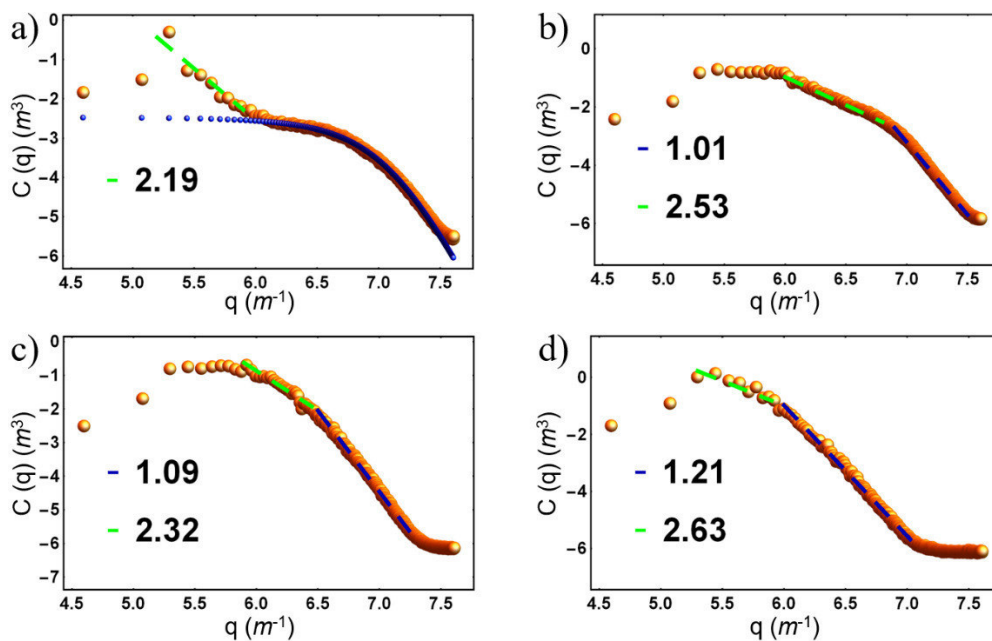
(representadas pelos pontos azuis), na qual é constante para pequenos valores de  $f$ , tem um “joelho” em uma posição determinada por  $B$ , e segue uma lei de potência para valores altos de  $f$  (RONNOW et al., 1998; SENTHILKUMAR et al., 2005; XU et al., 2011).

Figura 40 – Gráficos da PSD 1D das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R obtidos através do método FASA



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 41 – Gráficos da PSD 1D das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R obtidos através do método FAPS

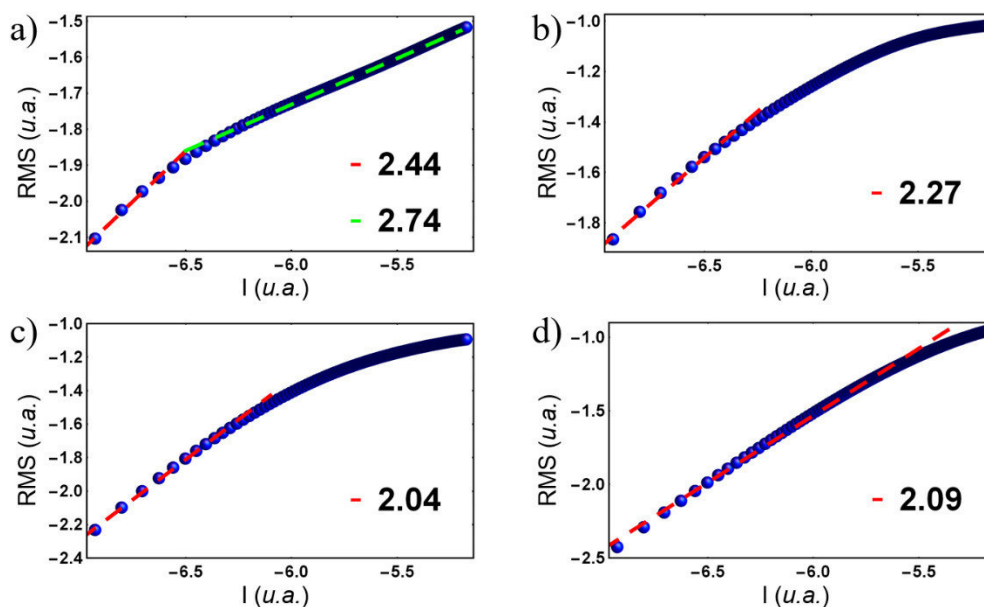


Fonte: Elaborado pelo autor.

O valor calculado para a amostra Si60C15F ( $D = 2,53$ ) foi maior que o obtido pelos métodos anteriores ( $D = 2,40$ ). Já o valor apresentado para a amostra Si70C60F ( $D = 2,32$ ) difere bastante do valor obtido anteriormente ( $D = 2,72$ ). Este fato deve-se a não clareza do comportamento sob lei de potência nessa região usada para o ajuste linear. Por fim, diferentemente dos métodos anteriores, para a amostra Si60C15R é possível observar mais claramente uma região linear (linha verde), na qual resulta em  $D = 2,63$ .

A Figura 42 mostra os gráficos obtidos através do método FARMS. Os valores obtidos foram bastante diferentes dos obtidos pelos métodos anteriores. Além disso, para algumas superfícies os valores apresentados são de certa forma contraditórios com a teoria, uma vez que para a amostra Si F o valor ( $D = 2,74$ ) foi maior do que para as amostras Si70C60F e Si60C15R ( $D = 2,04$  e  $D = 2,09$ , respectivamente) as quais são bem mais rugosas (ver Tabela 6) (MANDELBROT, 1982; MANDELBROT et al., 1984). A Tabela 8 resume os valores da dimensão fractal calculados pelos diferentes métodos, sendo os valores apresentados em vermelho como incoerentes ou duvidosos.

Figura 42 – Gráficos das amostras (a) Si F, (b) Si60C15F, (c) Si70C60F e (d) Si60C15R obtidos através do método FARMS



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Valores calculados da dimensão fractal ( $D$ ) para as amostras de silício pelos métodos FACA, FASA, FAPS e FARMS

Amostras	FACA	FASA	FAPS	FARMS
<b>Si F</b>	2,13	2,13	2,19	2,74
<b>Si60C15F</b>	2,40	2,40	2,53	2,27
<b>Si70C60F</b>	2,79	2,79	2,32	2,04
<b>Si60C15R</b>	2,05	2,05	2,63	2,09

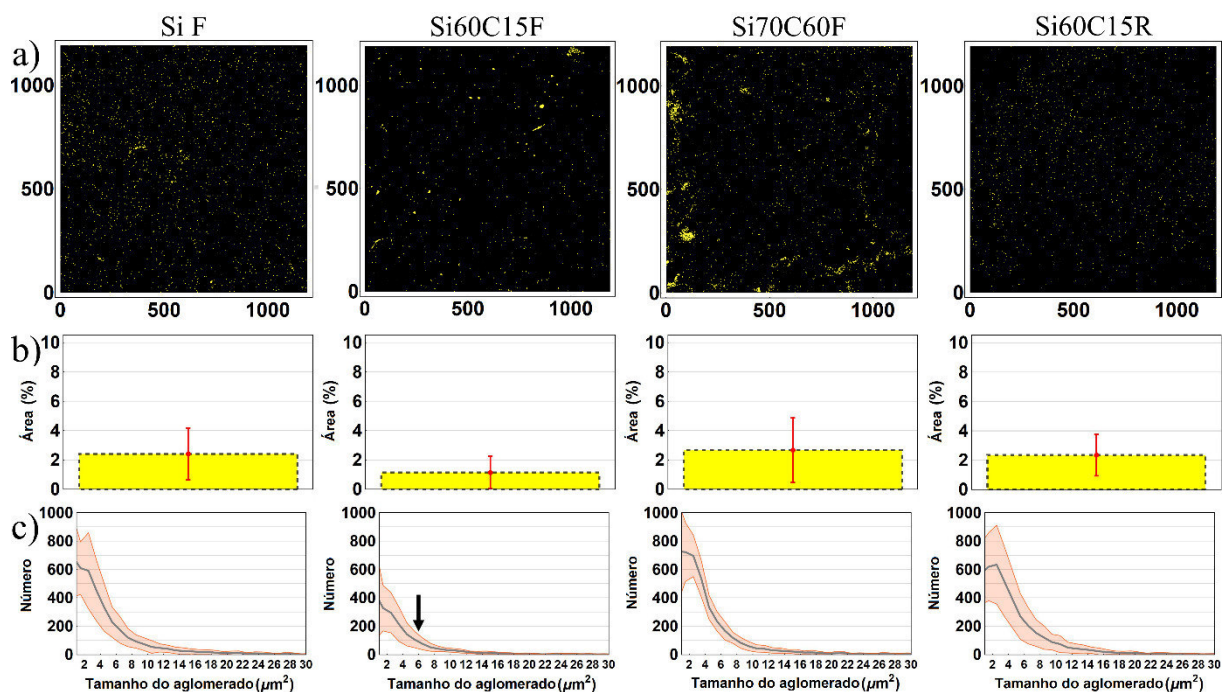
Fonte: Elaborado pelo autor.

## 4.2. Análise da adesão e crescimento bacteriano sobre as superfícies

### 4.2.1 Análise para o tempo de 3 h de incubação

Para avaliar a adesão inicial das bactérias sobre as amostras de silício em ampla escala (de nanômetro a milímetro), o tempo inicial de incubação escolhido foi 3 h. A Figura 43 apresenta os resultados obtidos através da LF-CLSM na lente de 50 $\times$  (área de  $\sim 1,42 \text{ mm}^2$ ). Na Figura 43a é mostrado um exemplo binarizado para cada amostra, onde a cor preta representa ausência de bactéria e a amarela presença. Nessas imagens é possível observar que as bactérias estão distribuídas por toda a região. Ao analisar os resultados apresentados pela Figura 43b, é possível observar que apesar das amostras possuírem diferentes topografias e hidrofobicidade, não houve diferença estatística na ocupação de área média (comprovada por análise de variância com pós-teste de Tukey - ANOVA), embora seja possível constatar uma menor média para a amostra Si60C15F. Além disso, a análise de distribuição de tamanho dos aglomerados (bactérias), com áreas variando de 1 a  $30 \mu\text{m}^2$ , revela um menor número médio de bactérias isoladas (abaixo de 400) quando comparadas com as demais amostras (acima de 600). Também há a menor presença de aglomerados da ordem de  $6 \mu\text{m}^2$  para a amostra Si60C15F (abaixo de 100), como indica a seta do segundo gráfico da Figura 43c.

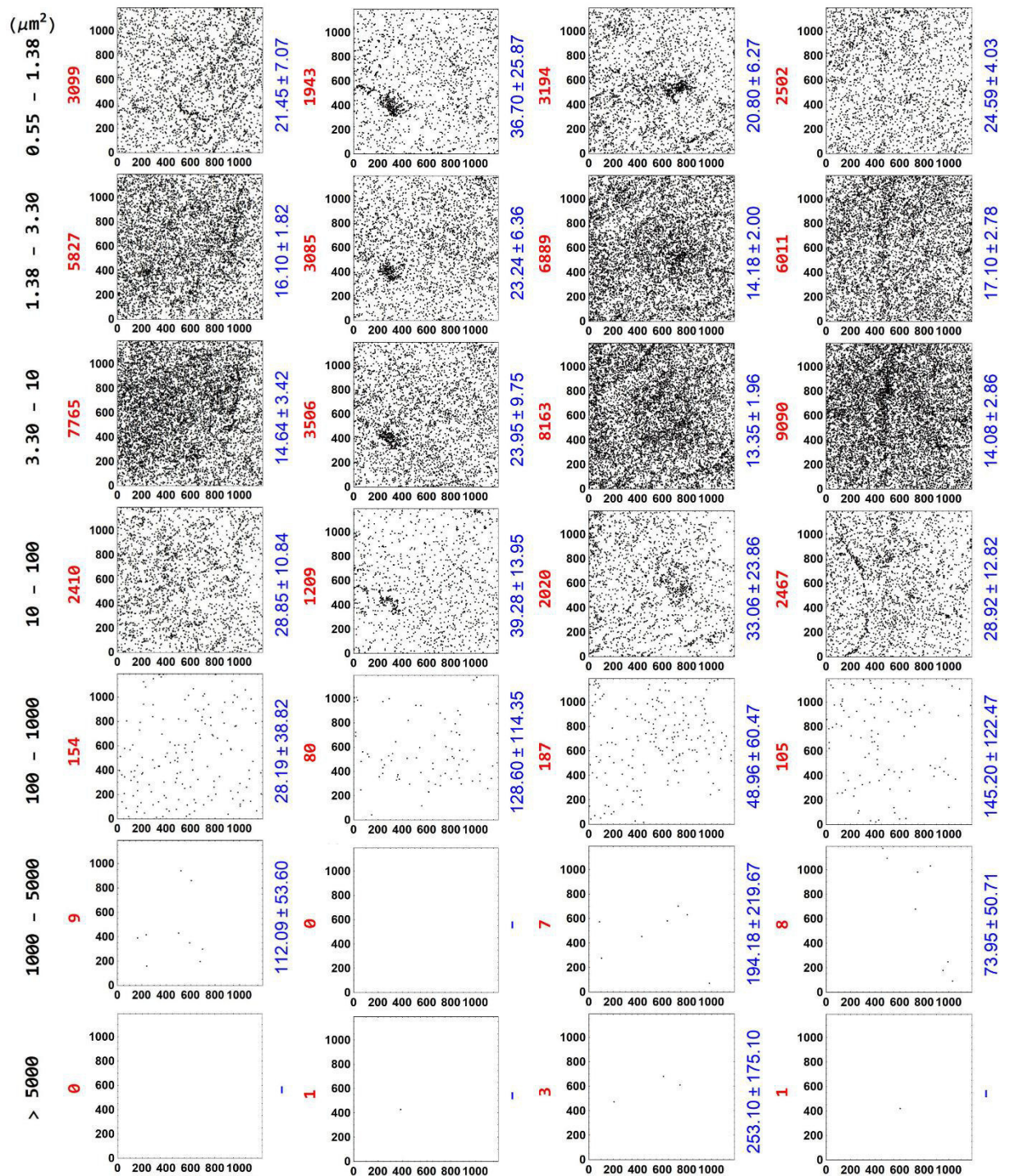
Figura 43 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 50× (1190 × 1190 μm), para o tempo de 3 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha; c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foi feita também uma análise da quantidade e distância média (em ampla escala) entre os centroides mais próximos dos elementos identificados nas imagens (bactérias, aglomerados e colônias). Para isso, faixas de tamanho de áreas ( $a$ ) foram escolhidas ( $0,55 \leq a < 1,38$ ,  $1,38 \leq a < 3,3$ ,  $3,3 \leq a < 10$ ,  $10 \leq a < 100$ ,  $100 \leq a < 1000$ ,  $1000 \leq a < 5000$  e  $\geq 5000 \mu\text{m}^2$ ), sendo as faixas  $0,55 \leq a < 1,38$  e  $1,38 \leq a < 3,3$  referentes à aproximadamente uma e duas bactérias, respectivamente. Valores de áreas menores que a metade da área para uma única bactéria foram descartados através de uma seleção (“filtro”) no algoritmo. As posições de cada centroide dos elementos presentes nessas faixas de cinco amostras foram extraídas e então foram plotadas todas juntas em um só gráfico, como mostra a Figura 44. Os valores apresentados em vermelho correspondem à soma total dos elementos contidos nessas faixas para os cinco substratos de cada tipo de amostra. Já os resultados apresentados em azul expressam a média e o desvio padrão das médias de distância entre os vizinhos mais próximos para cada amostra, dados em μm.

Figura 44 – Plotagem ( $1190 \times 1190 \mu\text{m}$ ) dos centroides de cinco amostras divididos por faixas de tamanho de área. Os números em vermelhos são as quantidades totais de elementos, enquanto os azuis são as médias e os desvios padrões das distâncias médias dos elementos em cada faixa de cada amostra (em  $\mu\text{m}$ ). As colunas correspondem às amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente



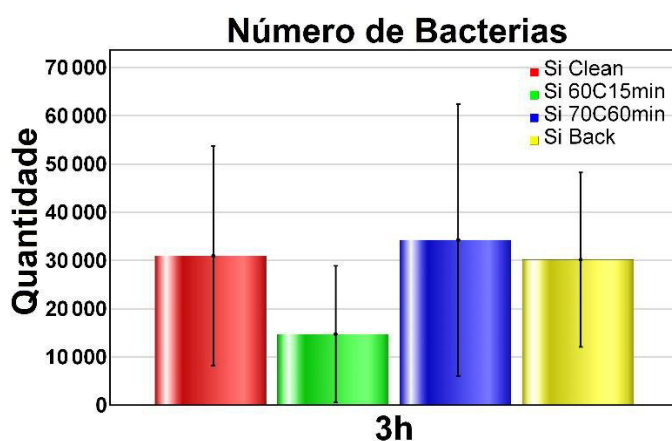
Fonte: Elaborado pelo autor.



Essa abordagem permite uma rápida análise ao longo de várias extensões de tamanhos de áreas, complementando os dados da distribuição de tamanhos apresentados na Figura 43c. Com exceção da última faixa analisadas, todos os valores das quantidades de elementos foram menores para a amostra Si60C15F (2ª coluna), além disso, para as quatro primeiras faixas de áreas (com quantidades de elementos na ordem de milhares), as médias para as distâncias médias foram maiores. É possível observar também que em todos os casos, há uma grande quantidade referente para duas bactérias (2ª faixa), revelando que nesse tempo de 3 h estava ocorrendo uma grande atividade de divisão celular bacteriana. Além disso, para todas as amostras a maior quantidade de elementos encontram-se na faixa  $3,3 \leq a < 10 \mu\text{m}^2$ , que são formadas por aglomerados de poucas bactérias, porém mais de duas.

Uma estimativa do número médio de bactérias presentes nas amostras foi obtida através da divisão da área total ocupada pelo tamanho da bactéria. A Figura 45 mostra um gráfico de barras com essa estimativa. É possível observar que o número médio obtido para as amostras variou cerca de 30 a 35 mil, com exceção da amostra Si60C15F que apresentou um valor médio em torno de 15 mil. Para todas as amostras um grande desvio padrão foi observado.

Figura 45 – Gráfico de barras do número de bactérias presentes nas amostras para o tempo 3 h e área de  $\sim 1,42 \text{ mm}^2$ , onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente

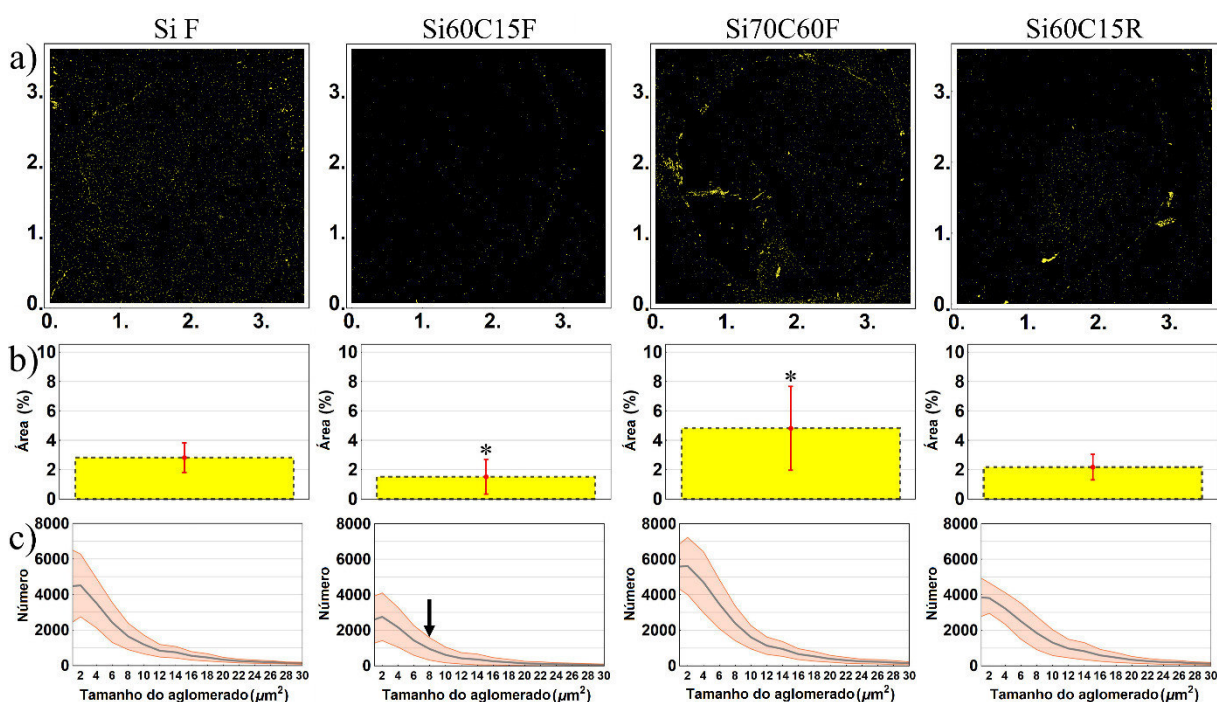


Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos esses resultados das análises das amostras obtidas por LF-CLSM na lente 50× para o tempo de 3h, mostram que apesar das amostras possuírem diferentes topografias e parâmetros ( $R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_{sk}$ ,  $R_k$ ,  $\zeta$  e  $D$ ), estatisticamente não foi evidenciado diferenças significativas na adesão das bactérias quando avaliadas sobre uma área de  $\sim 1,42 \text{ mm}^2$ . Entretanto, é possível observar certa tendência de diferenciação das amostras Si60C15F em relação às demais.

Também para esse tempo de investigação foi analisada a adesão para uma área ainda maior ( $\sim 13 \text{ mm}^2$ ), através das micrografias por LF-CLSM feitas na lente de  $20\times$ . Os resultados são apresentados na Figura 46, onde na Figura 46a é mostrado um exemplo de micrografia para cada tipo de amostra. Assim como no caso anterior, para esse aumento é possível observar que as bactérias estão distribuídas por toda essa região. Além disso, diferentemente da análise nas micrografias feitas na lente de  $50\times$ , para a ocupação de área foi possível observar uma diferença estatística entre as amostras Si60C15F e Si70C60F (indicada por teste Tukey após ANOVA), onde novamente a amostra Si60C15F apresentou a menor média de ocupação de área entre as amostras (ver Figura 46b). Além disso, novamente a análise de distribuição de tamanho dos aglomerados (bactérias) com áreas variando de 1 a  $30 \mu\text{m}^2$  revela um menor número médio de bactérias isoladas (abaixo de 3000) quando comparadas com as demais amostras, bem como, mostra que para pequenos aglomerados da ordem de  $8 \mu\text{m}^2$ , a amostra Si60C15F apresenta um número médio abaixo de 1000, como indica a seta do segundo gráfico da Figura 46c.

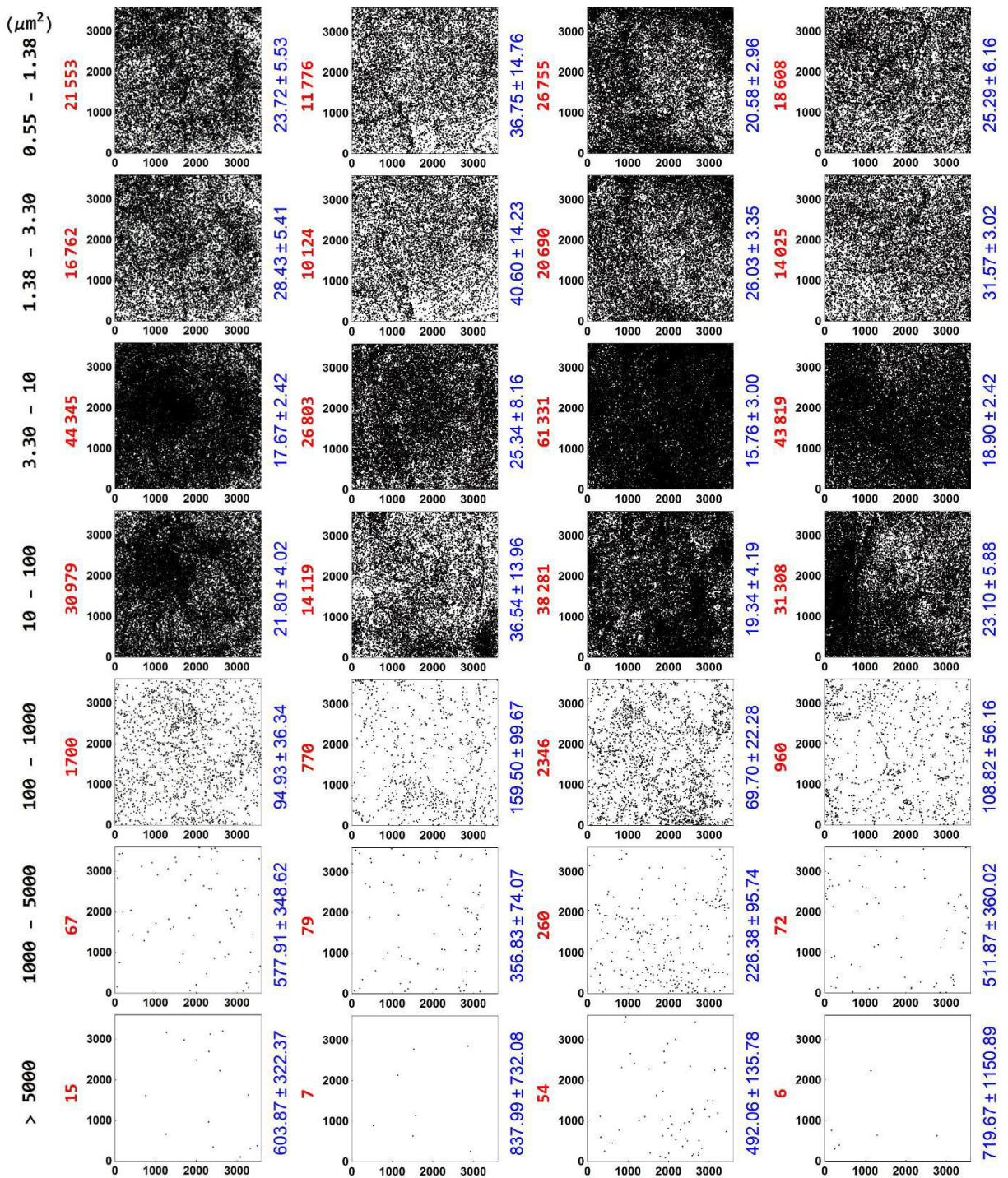
Figura 46 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm), para o tempo de 3 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha, e o asterisco (\*) indica diferença estatística entre essas amostras ( $p < 0,05$ ); c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios



Fonte: Elaborado pelo autor.

Usando a mesma abordagem anterior, foi feita análise da quantidade e distância média entre os centroides nas mesmas faixas de tamanho de área para essas micrografias. Os resultados são apresentados na Figura 47. Em todas as faixas analisadas, todos os valores das quantidades de elementos foram maiores para a amostra Si70C60F (3ª coluna), a mais rugosa, o que resultou nas menores distâncias médias entre os elementos presentes nessas faixas. Além disso, é possível observar que para as cinco primeiras faixas a amostra Si60C15F (2ª coluna) apresentou menor quantidade. Assim como na análise anterior, para todas as amostras a maior quantidade de elementos encontram-se na faixa  $3,3 \leq a < 10 \mu\text{m}^2$ .

Figura 47 – Plotagem ( $3600 \times 3600 \mu\text{m}$ ) dos centroides de cinco amostras divididos por faixas de tamanho de área. Os números em vermelhos são as quantidades totais de elementos, enquanto os azuis são as médias e os desvios padrões das distâncias médias dos elementos em cada faixa de cada amostra (em  $\mu\text{m}$ ). As colunas correspondem às amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente

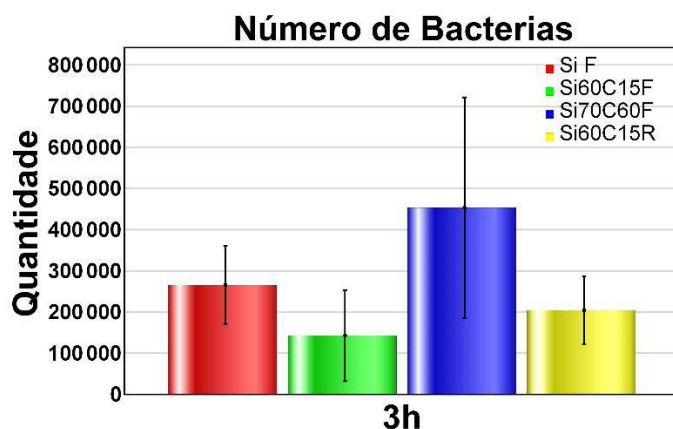


Fonte: Elaborado pelo autor.

Essa análise feita em uma área ainda maior ( $\sim 13 \text{ mm}^2$ ), permitiu observar não apenas maior quantidade de elementos referentes às faixas de elementos de menores áreas, mas possibilitou identificar grandes aglomerados (colônias de bactérias) em todas as amostras (principalmente Si70C60F), os quais alguns não tinham sido detectados anteriormente.

A estimativa do número médio de bactérias presentes nas amostras é apresentada na Figura 48. É possível observar que o número médio obtido para a amostra Si70C60F foi bem maior que as demais ( $\sim 450$  mil). Entretanto, essa amostra apresentou também o maior desvio padrão. A amostra Si60C15F foi a única a apresentar um valor médio abaixo de 200 mil ( $\sim 150$  mil).

Figura 48 – Gráfico de barras do número de bactérias presentes nas amostras para o tempo 3 h e área de  $\sim 13 \text{ mm}^2$ , onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente



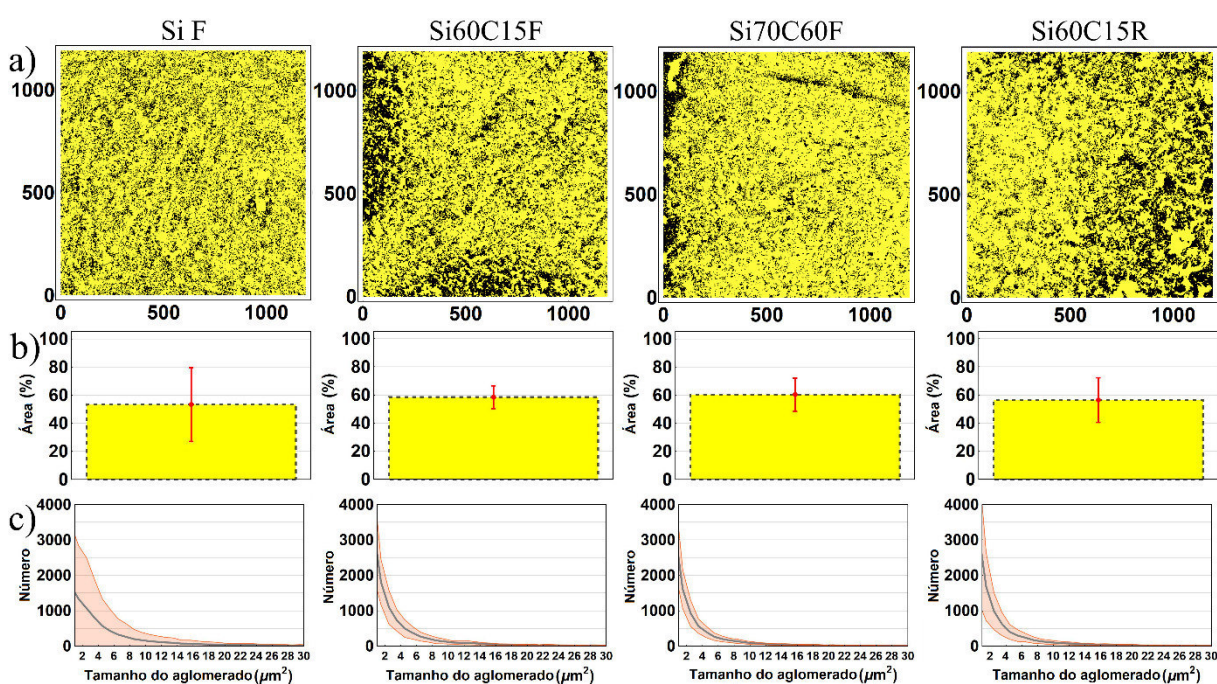
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.2 Análise para o tempo de 5 h de incubação

Para o tempo de 5 h foi possível fazer uma análise do crescimento bacteriano sobre as amostras em estudo. Os resultados obtidos através da LF-CLSM na lente de  $50\times$  (área de  $\sim 1,42 \text{ mm}^2$ ) são apresentados na Figura 49. Na Figura 49a é possível visualizar que para essa escala a ocupação das superfícies de todas as amostras foi bem maior quando comparada com a análise do tempo anterior (ver Figura 43a). Enquanto para o tempo de 3 h a ocupação média da área superficial para todas as amostras nessa escala variou em torno de 2 % (ver Figura 43b), para o tempo de 5 h a média para todas as amostras aumentou consideravelmente, variando em torno de 60 % (ver Figura 49b), sendo que a amostra Si F apresentou maior desvio padrão. No que diz respeito a análise de distribuição de tamanho com áreas variando de 1 a  $30 \mu\text{m}^2$ ,

diferenças significativas não foram observadas, com exceção de um maior desvio padrão para a amostra Si F (ver Figura 49).

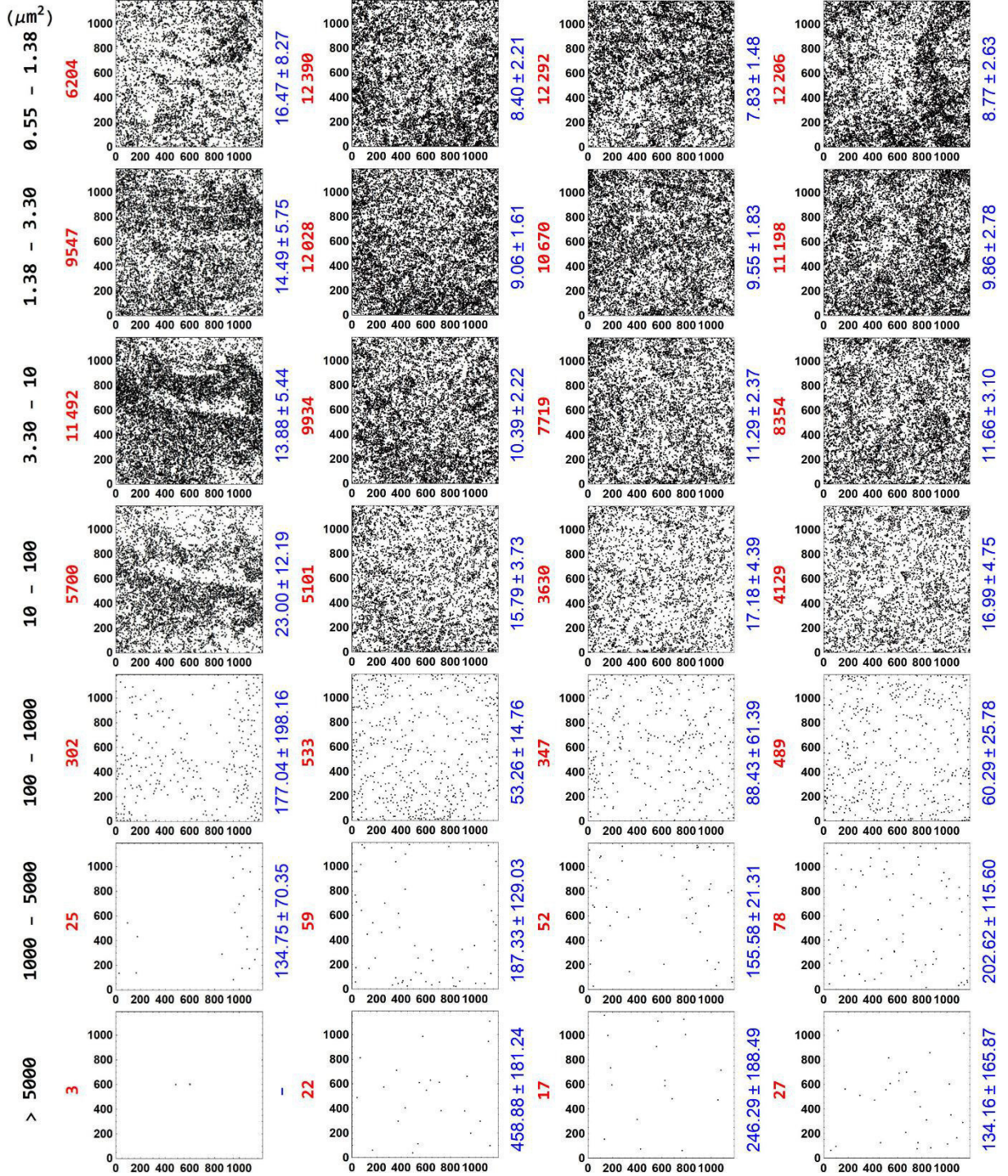
Figura 49 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 50× (1190 × 1190  $\mu\text{m}$ ), para o tempo de 5 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos quatro amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha; c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios



Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise da quantidade e distância médias entre centroides nas mesmas faixas de tamanho de área analisadas para o tempo de 5 h revelam que para a amostra Si F houve um acréscimo na quantidade em suas 3 primeiras faixas, e um decréscimo na distância média, conforme mostra a Figura 50. Diferentemente, para as demais amostras houve um decréscimo na quantidade e um acréscimo na distância média para essas mesmas faixas de tamanho. Entretanto, para as duas últimas faixas (1000 – 5000  $\mu\text{m}^2$  e > 5000  $\mu\text{m}^2$ ) a amostra Si F apresentou as menores quantidade em relação as demais amostras (ver Figura 50).

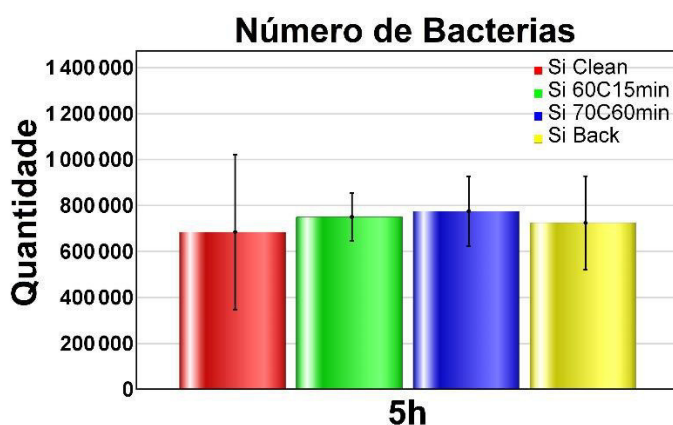
Figura 50 – Plotagem (1190 × 1190 μm) dos centroides de quatro amostras divididos por faixas de tamanho de área. Os números em vermelhos são as quantidades totais de elementos, enquanto os azuis são as médias e os desvios padrões das distâncias médias dos elementos em cada faixa de cada amostra (em μm). As colunas correspondem às amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

A estimativa do número médio de bactérias presentes nas amostras é apresentada na Figura 51. É possível observar que os números médios obtidos para as amostras nessa escala de comprimento foram próximos, limitando-se a faixa de 600 a 800 mil, sendo estatisticamente indiferentes.

Figura 51 – Gráfico de barras do número de bactérias presentes nas amostras para o tempo 5 h e área de  $\sim 1,42 \text{ mm}^2$ , onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o tempo de 5 h também foi analisado o crescimento em uma área  $\sim 13 \text{ mm}^2$ , através das micrografias por LF-CLSM feitas na lente de  $20\times$ . Os resultados são apresentados na Figura 52, onde é possível observar que nessa ampla escala as bactérias cresceram e se espalharam mais sobre as amostras Si F e Si60C15F quando comparadas com as amostras Si70C60F e Si60C15R (ver Figura 52a). Como resultado, uma maior quantidade média de ocupação de área para as amostras Si F e Si60C15F foi observada quando comparada com as demais (ver Figura 52b), embora estatisticamente não apresentaram diferenças. A análise de distribuição de tamanhos entre 1 a  $30 \mu\text{m}^2$  revela maior quantidade nas amostras Si70C60F e Si60C15R, especialmente para aglomerados acima de  $10 \mu\text{m}^2$ , indicado pelas setas nos respectivos gráficos (ver Figura 52c).

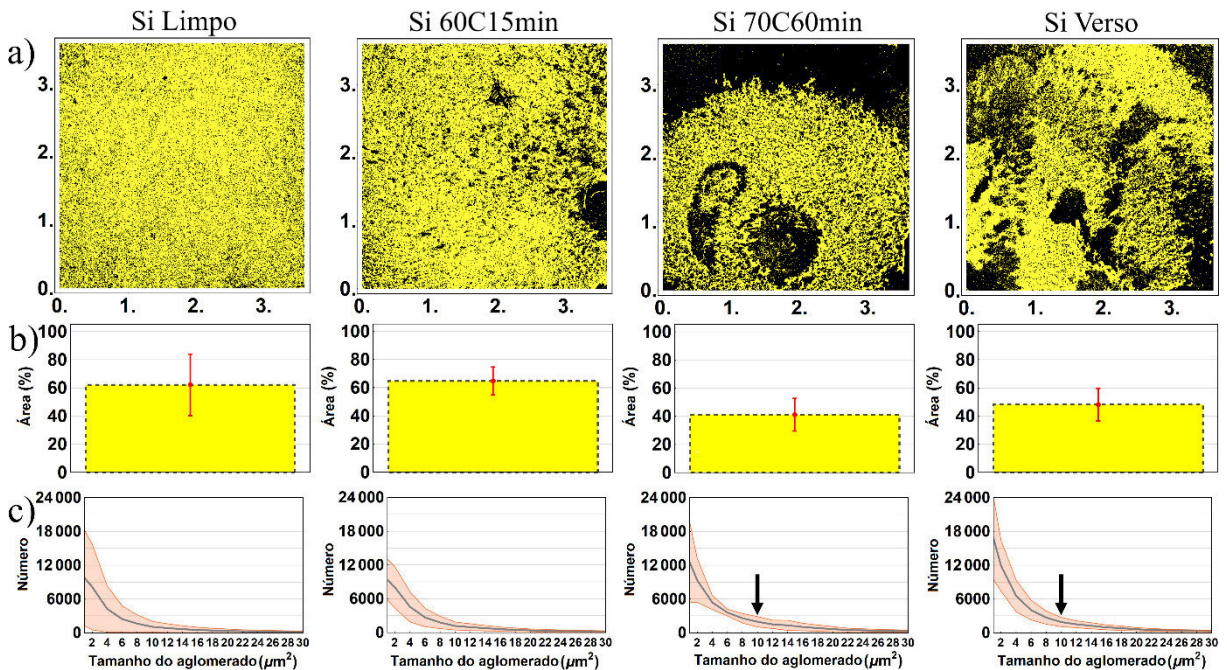
A análise da quantidade e distância médias entre centroides nas faixas de tamanho de áreas analisadas também evidenciam maior quantidade de elementos e menor distância média para as quatro primeiras faixas nas amostras Si70C60F e Si60C15R, quando comparadas com os valores de Si F e Si60C15F (ver Figura 53).

Também foi estimado o número médio de bactérias presentes nas amostras, conforme mostra a Figura 54. Diferentemente da análise na escala menor (lente  $50\times$ ), é possível



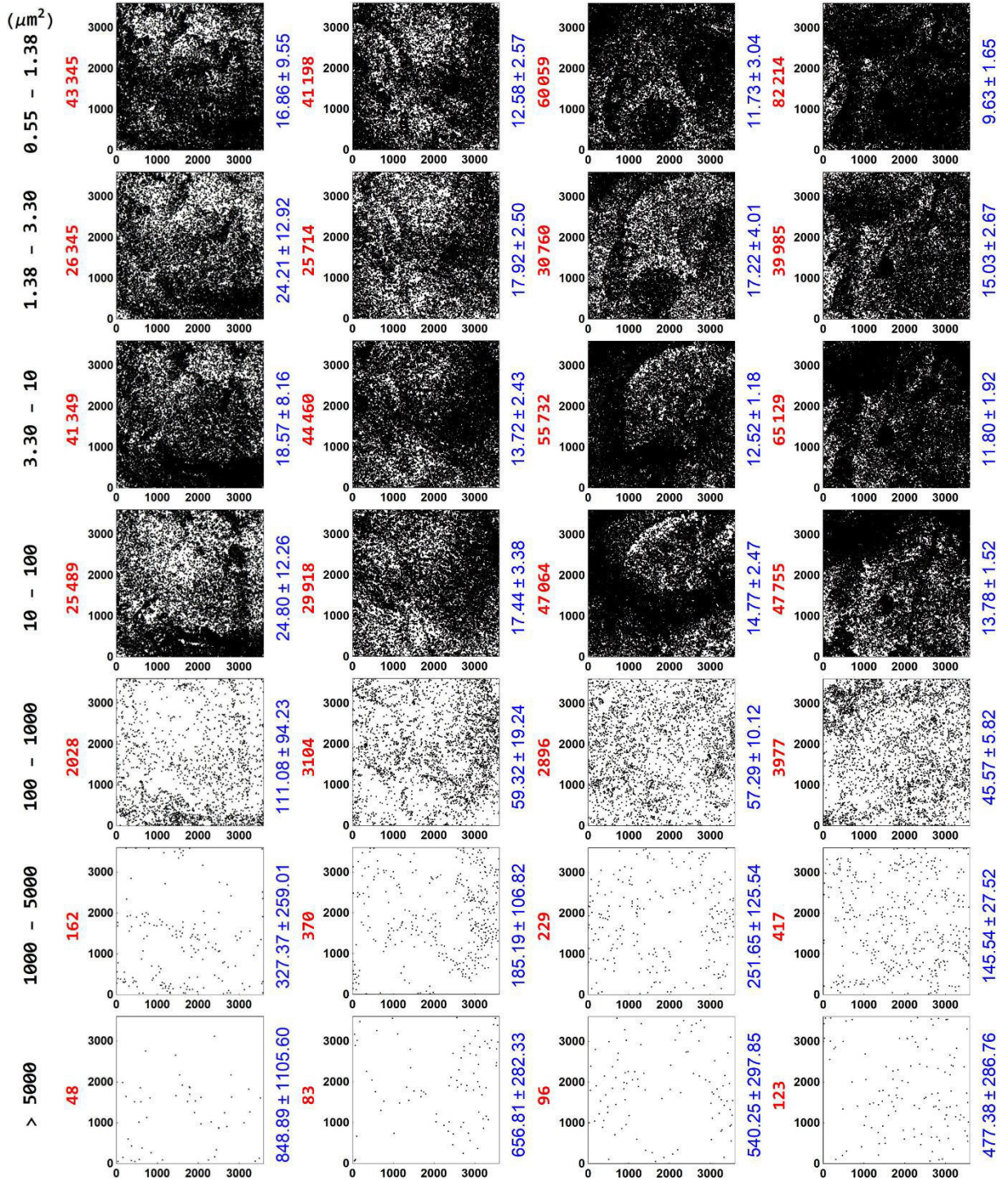
observar uma maior variação nos valores obtidos. Obviamente, assim como os valores de ocupação de área, as amostras Si70C60F e Si60C15R apresentaram uma quantidade média menor quando comparadas com as amostras Si F e Si60C15F, que tiveram valores próximos a  $6 \times 10^6$  bactérias.

Figura 52 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm), para o tempo de 5 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos quatro amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha. c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios



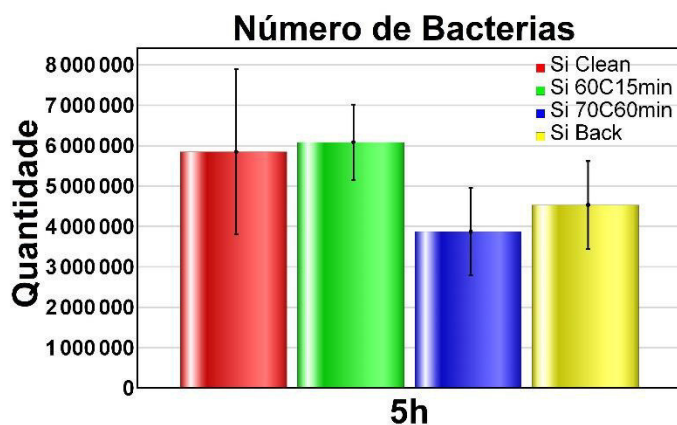
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 53 – Plotagem (3600 × 3600 μm) dos centroides de quatro amostras divididos por faixas de tamanho de área. Os números em vermelhos são as quantidades totais de elementos, enquanto os azuis são as médias e os desvios padrões das distâncias médias dos elementos em cada faixa de cada amostra (em μm). As colunas correspondem às amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 54 – Gráfico de barras do número de bactérias presentes nas amostras para o tempo 5 h e área de  $\sim 13 \mu\text{m}^2$ , onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente



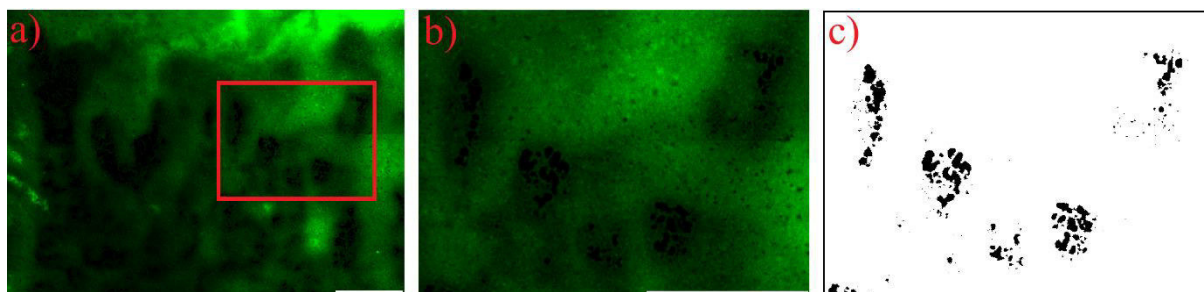
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.3 Análise para o tempo de 18 h de incubação

As micrografias por LF-CLSM feitas na lente de  $20\times$  para as amostras incubadas por 18 h revelaram que todas as amostras de silício, independente da topografia e de todos os parâmetros de superfícies calculados, estavam praticamente cobertas com biofilmes. A Figura 55a mostra parte de uma micrografia por LF-CLSM, na qual é possível ver uma grande quantidade de biofilme, bem como pequenas regiões descobertas. Uma parte ampliada da Figura 55a (correspondente ao retângulo vermelho) é apresentada na Figura 55b. Nesta imagem podemos ver em mais detalhes regiões mais escuras que correspondem ao silício (as amostras de silício não emitem fluorescência). O resultado da binarização (*threshold de 0,003*) dessa região em escala de cinza é mostrada na Figura 55c, onde somente as regiões que não emitem fluorescência ficam com cor preta.

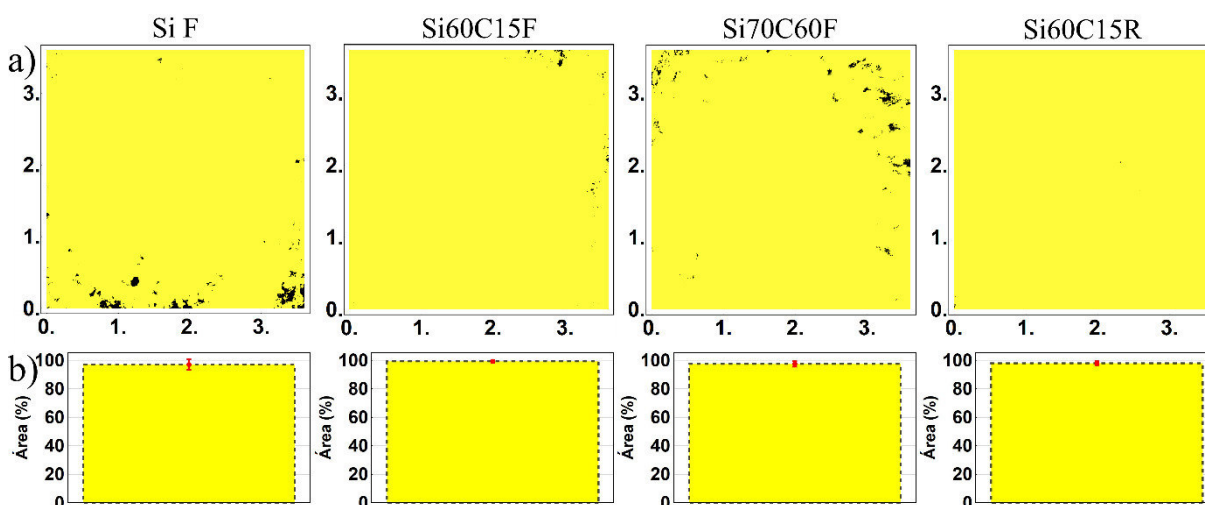
O resultado do processamento dessas micrografias é mostrado na Figura 56. Na Figura 56a é mostrado um exemplo de micrografia para cada tipo de amostra, na qual é possível constatar a presença do biofilme por toda grande área ( $\sim 13 \text{mm}^2$ ), apresentando em cada exemplo apenas pequenas regiões escuras, que correspondem às regiões desocupadas. Os valores da ocupação de área foram próximos de 100 % para todas as amostras, como mostra a Figura 56b, não havendo diferença estatística.

Figura 55 – a) parte de uma micrografia por LF-CLSM de um biofilme, b) região ampliada referente ao retângulo vermelho e c) binarização dessa região correspondente em escala de cinza. As barras de escala brancas em a) e b) representam 100  $\mu\text{m}$



Fonte: Elaborado pelo autor.

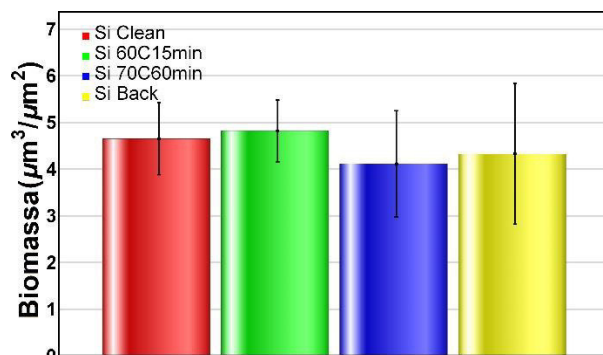
Figura 56 – a) Exemplo de micrografias por LF-CLSM dos biofilmes sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20 $\times$  (3,6  $\times$  3,6 mm), para o tempo de 18 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para avaliar o biofilme foram feitas micrografias com *stacks* de fatias óticas de 1,6  $\mu\text{m}$  ( $dZ$ ) e passos de 1,0  $\mu\text{m}$  sobre uma região de 170  $\times$  170  $\mu\text{m}$ . Então, utilizando a abordagem descrita anteriormente (seção 3.6.1) foi estimado o valor da biomassa média do biofilme para cinco substratos de cada amostra, dada em  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$  (que é igual a espessura média). A Figura 57 apresenta os resultados obtidos dessa estimativa, onde é observado que os valores médios estão dentro da faixa de 4 a 5  $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ . Dessa forma, foi possível constatar que houve pouca variação nessas quantidades, sendo essa variação estatisticamente indiferente.

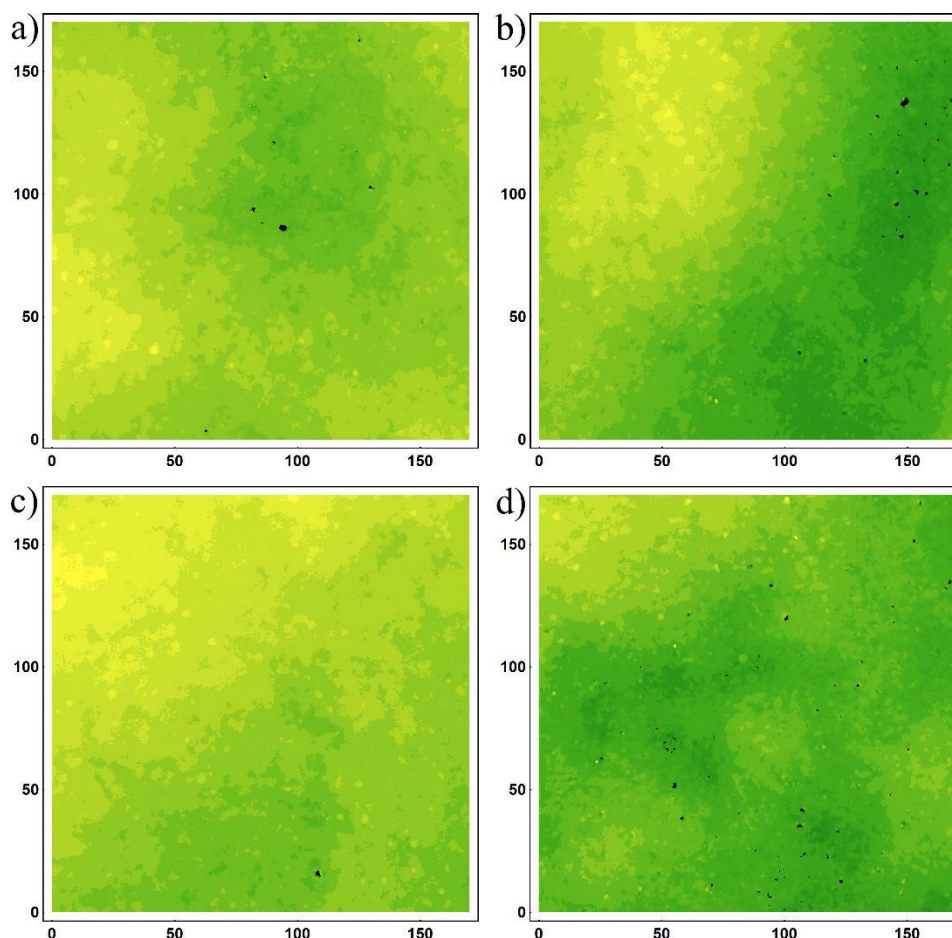
Figura 57 – Gráfico de barras da estimativa da quantidade de biomassa presentes nas amostras para o tempo 18 h, onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

De posse desses *stacks* também foi montada a imagem final da superfície através dos procedimentos descritos anteriormente (seção 3.6.1). A Figura 58 mostra um exemplo para cada tipo de amostra, onde para facilitar a visualização as cores mais claras (tonalidades amarelas), correspondem às fatias óticas mais elevadas dos biofilmes, as cores em verdes mais escuro estão correlacionadas com as regiões mais baixas do biofilme e as regiões em preto representam a superfície de silício devido à ausência do biofilme. Através da matriz dessas superfícies foi possível calcular os parâmetros de rugosidade média, rugosidade média quadrática, assimetria e curtose através de suas respectivas equações na forma discreta, descritas anteriormente (seção 1.3). Os valores médios desses parâmetros juntamente com o seu desvio padrão são apresentados na Tabela 9. A análise por ANOVA mostrou também que não houve diferença estatística para cada parâmetro avaliado, o que indica que as diferentes topografias das superfícies das amostras sobre as quais os biofilmes se formaram não influenciaram de forma significativa na forma da superfície do biofilme, nessa escala de comprimento analisada ( $170 \times 170 \mu\text{m}$ ).

Figura 58 – Exemplos de superfície resultante do processamento dos *stacks* das amostras a) Si F, b) Si60C15F, c) Si70C15F e d) Si60C15R para o tempo de 18 h



Fonte: Elaborado pelo autor.

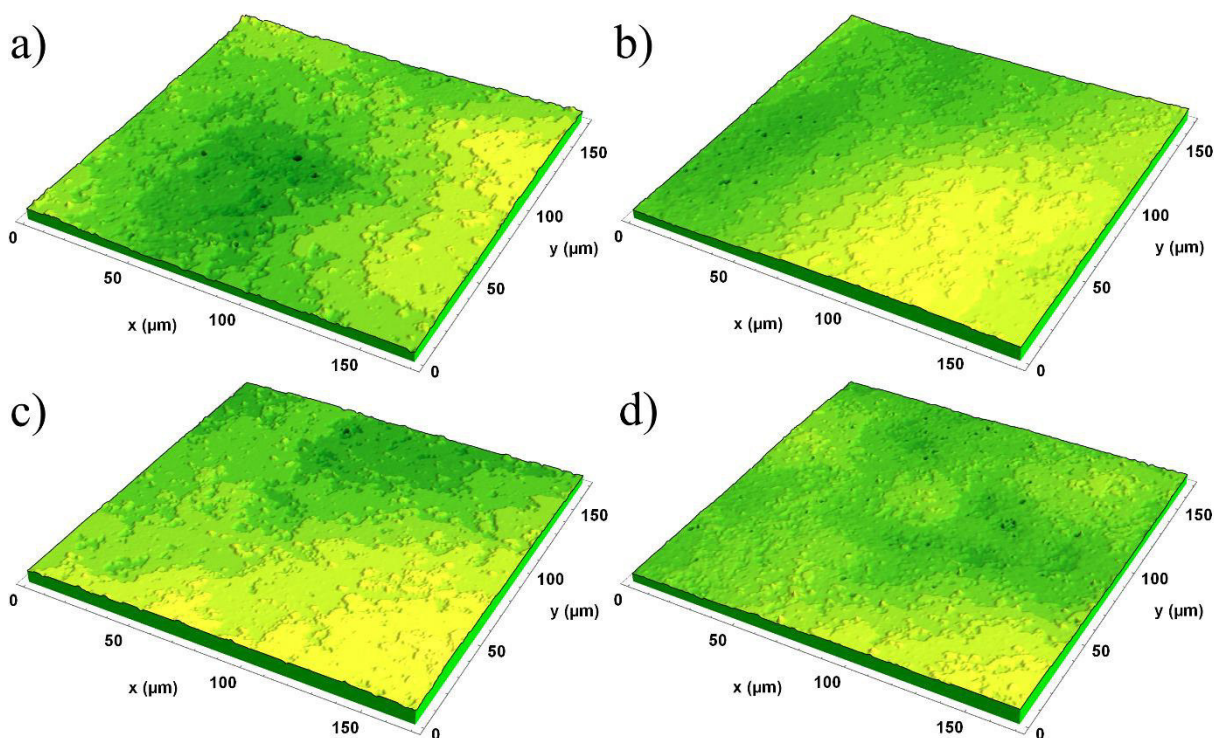
Tabela 9 – Valores médios e seus desvios padrões dos parâmetros das superfícies dos biofilmes formados sobre as amostras de silício com diferentes topografias para o tempo de 18 h

Amostras	$R_a$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_q$ ( $\mu\text{m}$ )	$R_{sk}$	$R_k$
<b>Si F</b>	$0,50 \pm 0,15$	$0,64 \pm 0,17$	$-0,04 \pm 0,65$	$6,37 \pm 6,88$
<b>Si60C15F</b>	$0,74 \pm 0,55$	$0,86 \pm 0,59$	$0,07 \pm 0,17$	$2,62 \pm 0,76$
<b>Si70C60F</b>	$0,76 \pm 0,40$	$0,96 \pm 0,45$	$0,25 \pm 0,20$	$3,93 \pm 2,81$
<b>Si60C15R</b>	$0,58 \pm 0,32$	$0,72 \pm 0,36$	$0,22 \pm 0,45$	$3,33 \pm 1,30$

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para melhor visualização, as imagens das superfícies mostradas na Figura 58 foram plotadas em 3D, conforme mostra a Figura 59.

Figura 59 – Exemplos de biofilmes em 3D resultantes do processamento dos *stacks* das amostras a) Si F, b) Si60C15F, c) Si70C15F e d) Si60C15R para o tempo de 18 h

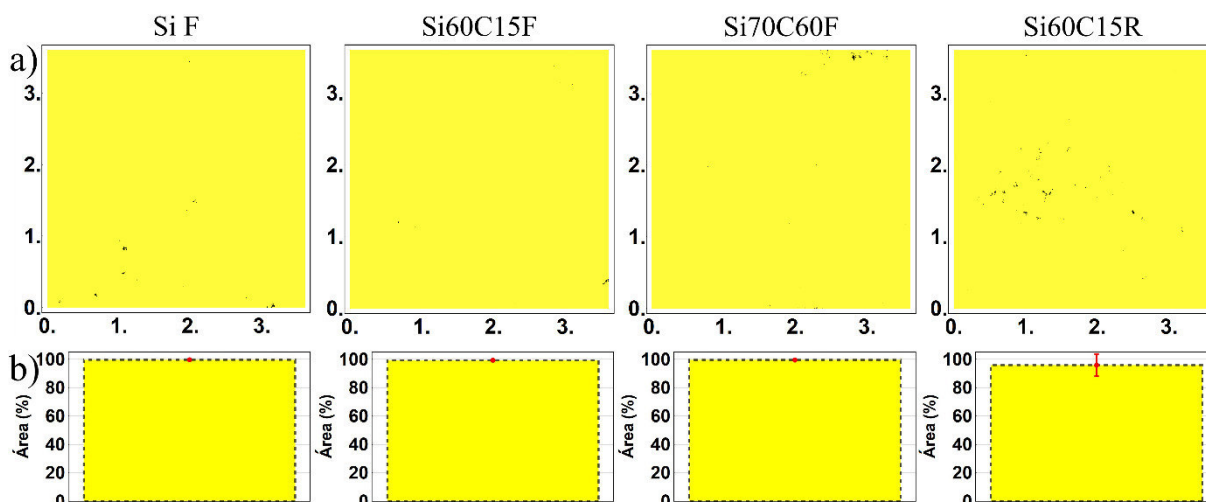


Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.4 Análise para o tempo de 26 h de incubação

Como esperado, as micrografias por LF-CLSM feitas na lente de 20× para as amostras incubadas por 26h também mostram que todas as amostras de silício estavam praticamente cobertas por completa com biofilmes (ver Figura 60). Na Figura 60a é mostrado um exemplo de micrografia para cada tipo de amostra, na qual é possível constatar a presença do biofilme por toda grande área ( $\sim 13 \text{ mm}^2$ ), novamente, apresentando em cada exemplo apenas pequenas regiões escuras, que correspondem às regiões desocupadas. Assim como para o tempo de 18 h, os valores da ocupação de área foram próximos de 100 % para todas as amostras, como mostra a Figura 60b, não havendo diferença estatística.

Figura 60 – a) Exemplo de micrografias por LF-CLSM dos biofilmes sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm), para o tempo de 26 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha

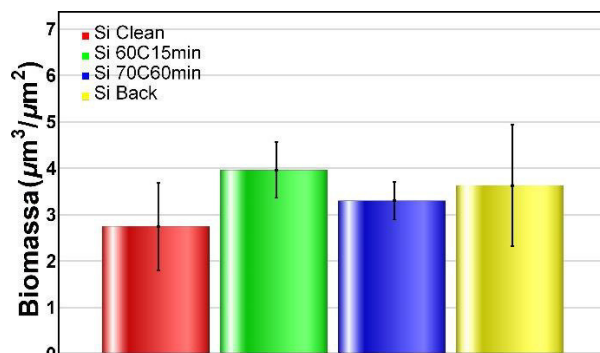


Fonte: Elaborado pelo autor.

Também foram feitas micrografias com *stacks* de fatias óticas nas mesmas condições descritas para o tempo de 18 h. A Figura 61 apresenta os resultados obtidos da estimativa da quantidade de biomassa média dos biofilmes. Novamente, não houve diferença estatística entre as amostras. Todavia, foi observado para todas as amostras uma quantidade um pouco menor quando comparada com os valores obtidos para o tempo de 18 h. Entretanto, essa variação não é significativa, podendo ser considerada dentro do erro intrínseco existente na abordagem utilizada. Alguns fatores como por exemplo a concentração de bactérias podem variar. Há também um pequeno erro introduzido no algoritmo utilizado para estimar o valor da biomassa, conforme exemplificado na seção “3.6.1” do presente trabalho.



Figura 61 – Gráfico de barras da estimativa da quantidade de biomassa presentes nas amostras para o tempo 26h, onde as cores vermelha, verde, azul e amarelo são usadas para as amostras Si F, Si60C15F, Si70C60F e Si60C15R, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor.

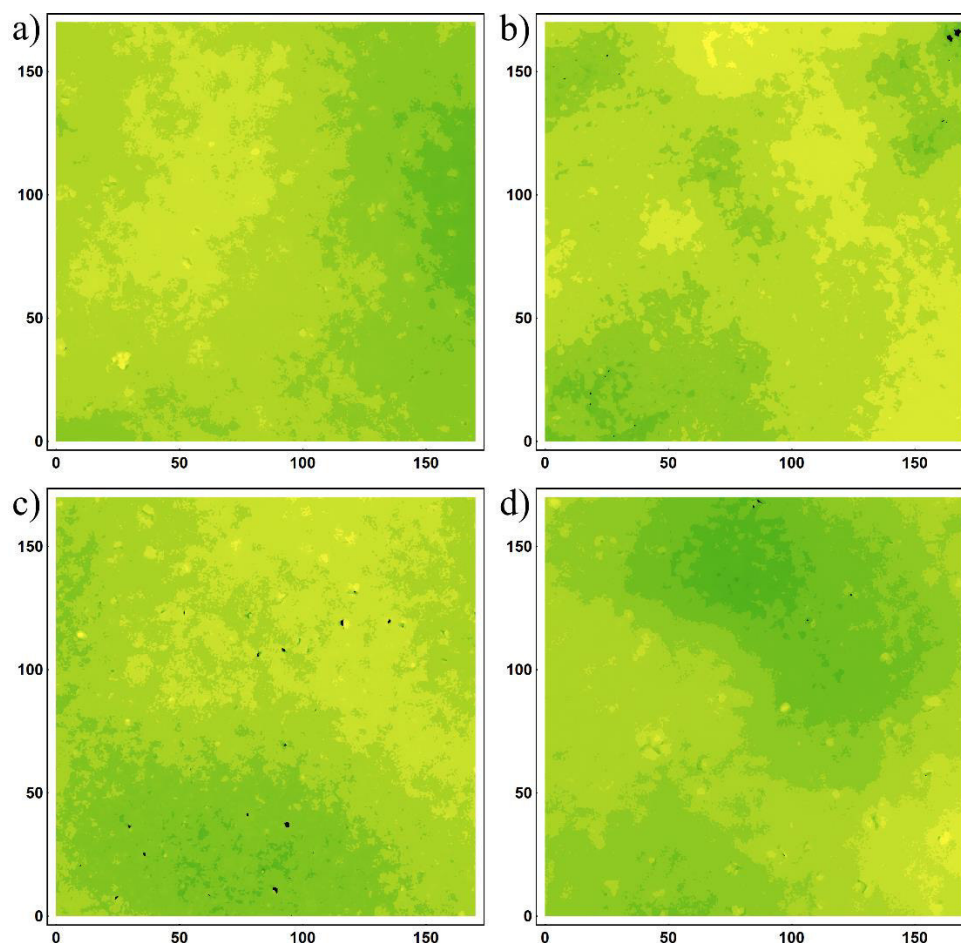
A Figura 62 mostra um exemplo para cada tipo de amostra como resultado do processamento dos *stacks* obtidos. Já a Tabela 10 apresenta os valores médios dos parâmetros de superfície juntamente com os seus desvios padrões. Novamente, a análise por ANOVA mostrou que não houve diferença estatística. Com relação aos valores médios obtidos para  $R_a$  e  $R_q$ , não foi possível obter uma conclusão precisa quando comparados com os valores obtidos para o tempo de 18 h. Algumas amostras apresentaram aumentos (Si F e Si60C15R) enquanto outras diminuições (Si60C15F e Si 70C60F). Porém essas alterações estão nas faixas dos desvios padrões. Com relação ao parâmetro  $R_{sk}$ , é possível observar que houve uma diminuição nos valores obtidos de todas as amostras quando comparados com os valores obtidos no tempo de 18 h. Por outro lado, foi observado um aumento nos valores de todas as amostras para o parâmetro  $R_k$ .

Tabela 10 – Valores médios e seus desvios padrões dos parâmetros das superfícies dos biofilmes formados sobre as amostras de silício com diferentes topografias para o tempo de 26 h

Amostras	$R_a$ (µm)	$R_q$ (µm)	$R_{sk}$	$R_k$
<b>Si F</b>	0,54 ± 0,52	0,69 ± 0,58	-0,81 ± 1,91	11,79 ± 19,35
<b>Si60C15F</b>	0,54 ± 0,20	0,70 ± 0,20	-0,44 ± 0,35	6,34 ± 4,47
<b>Si70C60F</b>	0,47 ± 0,30	0,66 ± 0,28	-1,75 ± 2,12	26,26 ± 28,88
<b>Si60C15R</b>	0,63 ± 0,17	0,93 ± 0,23	-1,25 ± 1,71	11,85 ± 10,30

Fonte: Elaborado pelo autor.

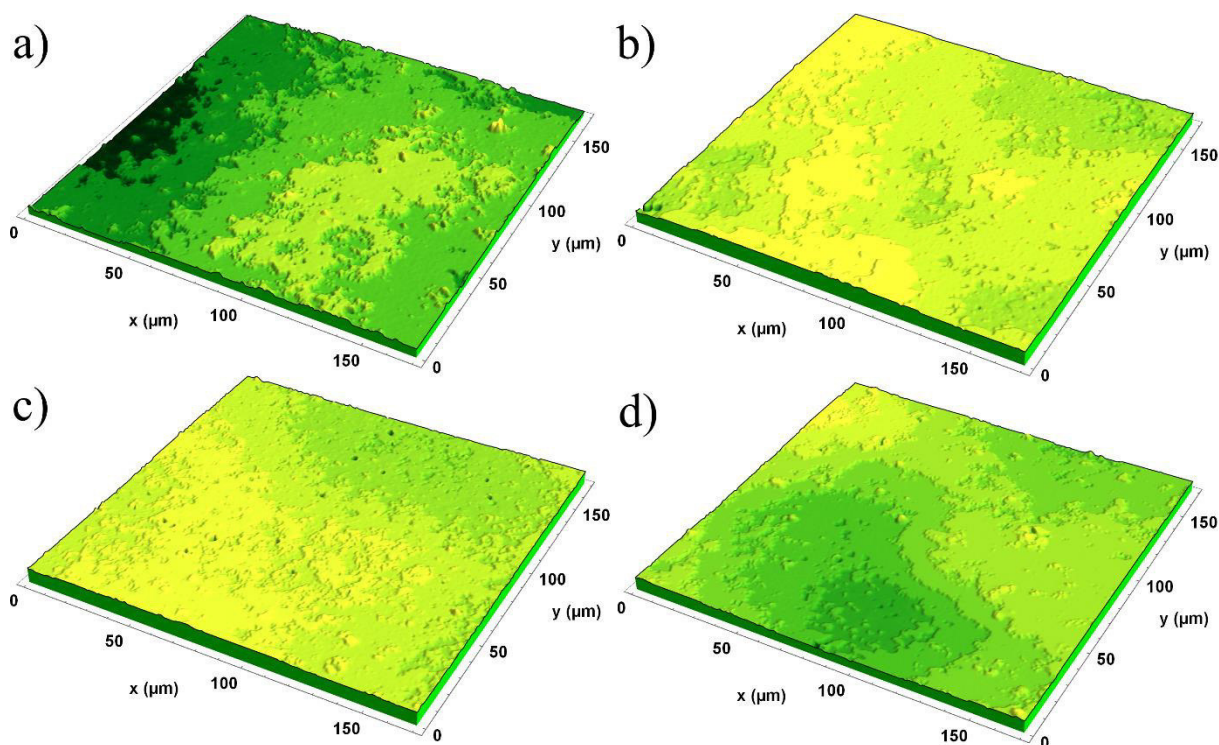
Figura 62 – Exemplos de superfície resultante do processamento dos *stacks* das amostras a) Si F, b) Si60C15F, c) Si70C15F e d) Si60C15R para o tempo de 26 h



Fonte: Elaborado pelo autor.

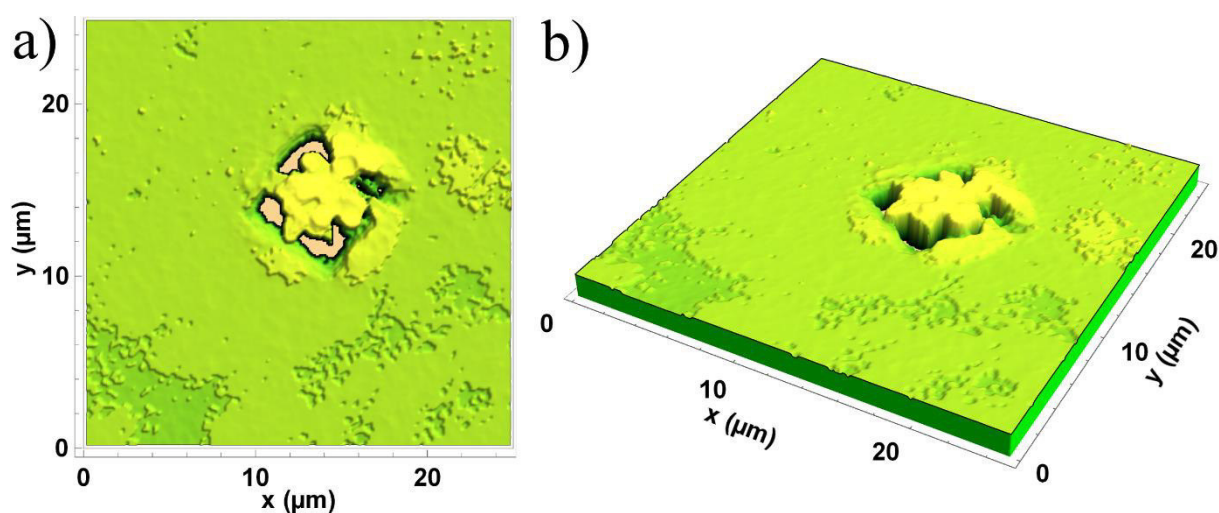
Essas superfícies também foram plotadas em 3D, conforme mostra a Figura 63. Através desse tipo de plotagem é possível observar melhor certas características dos biofilmes. Pode-se constatar que houve cristalização do sal sobre a superfície de algumas amostras de silício. Tal afirmação baseia-se no padrão retangular apresentado por algumas dessas regiões sem fluorescência. Ademais, é possível observar a presença de biofilme sobre partes de algumas dessas regiões em altura mais elevadas, como mostra a Figura 64. Esse exemplo foi extratido de uma região de biofilme formado sobre um amostra Si70C60F. Para essa amostra poderia-se pensar que essa região com “vazio” retangular (sem emissão de fluorescência) pudesse ser parte de alguma das grandes pirâmides observadas para essa topografia. Entretanto, encontra-se alinhada em uma direção diferente das bases das pirâmides, que estão na mesma orientação das bordas das amostras e essa orientação foi mantida tanto na aquisição das imagens de AFM (ver Figura 33) quando de CLSM.

Figura 63 – Exemplos de biofilmes em 3D resultantes do processamento dos *stacks* das amostras a) Si F, b) Si60C15F, c) Si70C15F e d) Si60C15R para o tempo de 26 h



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 64 – Exemplo da formação de cristal de sal sobre a superfície de silício (Si70C60F) sob uma visão a) superior e b) inclinada



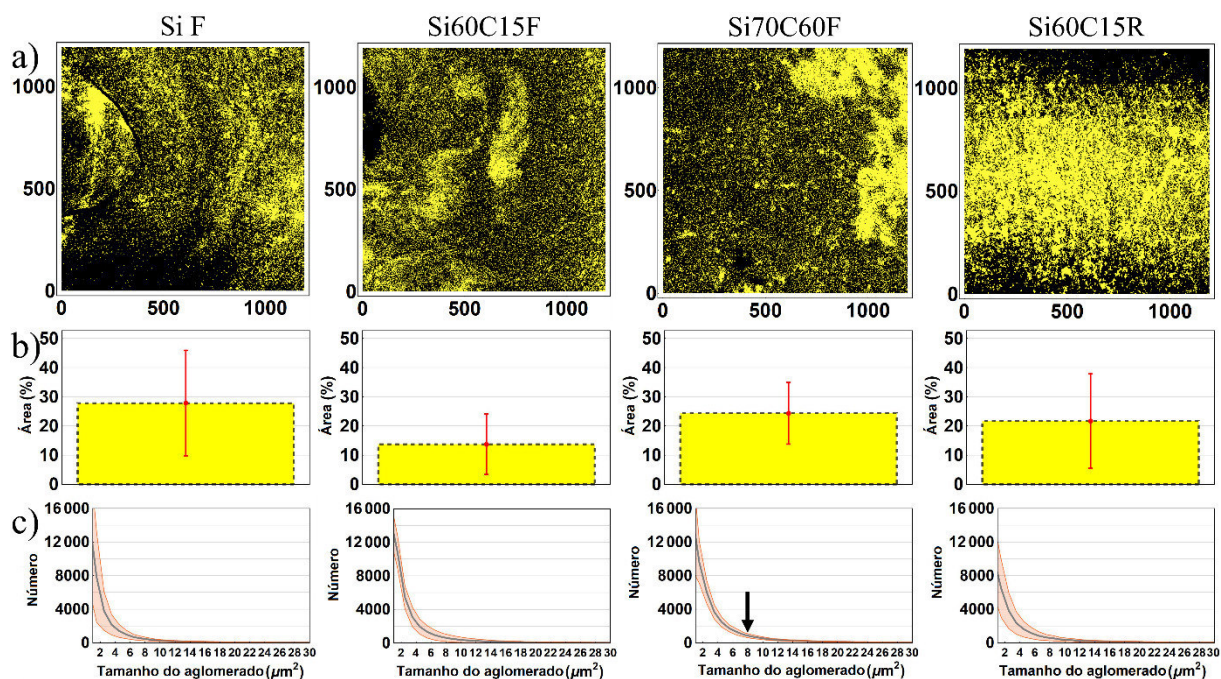
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.2.5 Análise para o tempo de 95 h de incubação

O tempo máximo escolhido para o presente estudo foi 95 h, para o qual também foi

feita uma análise em ampla escala. A Figura 65 apresenta os resultados obtidos através da LF-CLSM na lente de 50× (área de  $\sim 1,42 \text{ mm}^2$ ). Para esse tempo é possível observar que diferentemente das amostras com incubação de 18 e 26 h, parte do biofilme se despreendeu em todas as amostras (ver Figura 65a) durante o processo de lavagem e submissão de tensão de cisalhamento descrito anteriormente (seção 3.4.1). Estatisticamente não houve diferença no cálculo de ocupação de área por bactérias e biofilmes que permaneceram aderidos sobre as amostras (ver Figura 65b). Entretanto, a amostra Si60C15F apresentou o menor valor médio, assim como os resultados obtidos para as micrografias na lente de 50× no tempo de 3 h. Em relação a análise de distribuição de tamanho dos aglomerados entre 1 e  $30 \mu\text{m}^2$  (ver Figura 65c) é possível observar para a amostra Si70C60F (mais rugosa) houve uma maior quantidade de elementos com tamanho de  $8 \mu\text{m}^2$  (indicado pela seta). Além disso, observa-se que a amostra Si60C15R apresentou uma menor quantidade média para o tamanho referente a uma bactéria ( $\sim 8000$ ).

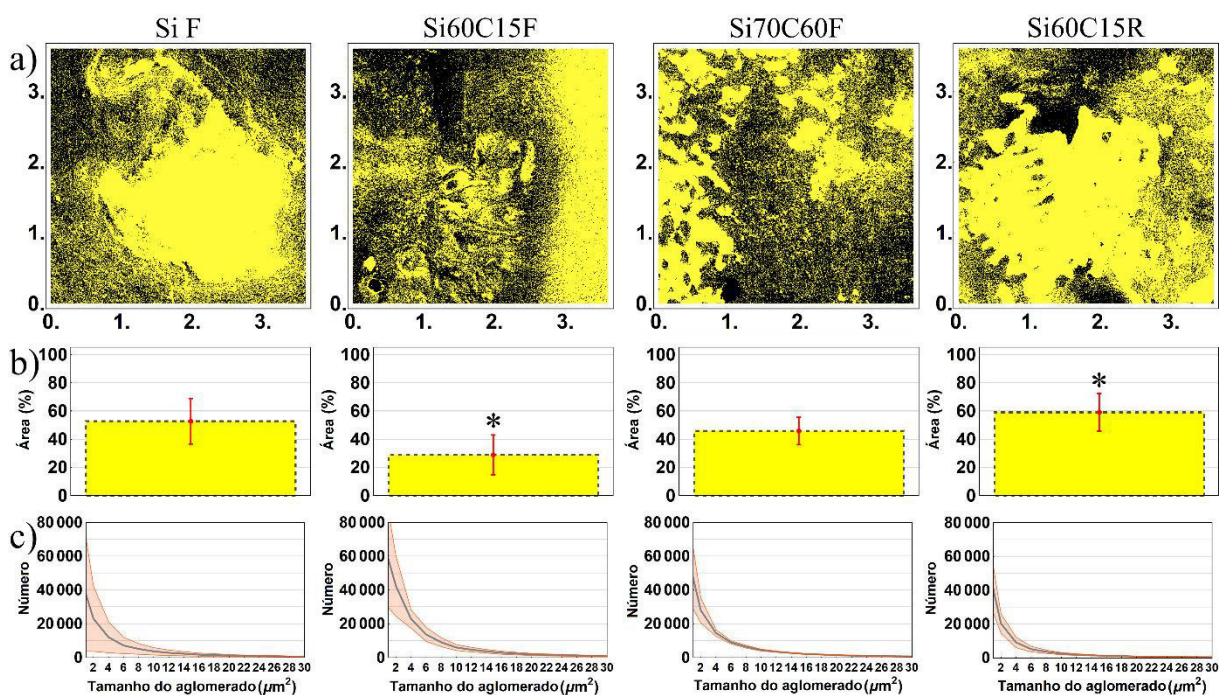
Figura 65 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 50× ( $1190 \times 1190 \mu\text{m}$ ), para o tempo de 95 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha; c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para essas amostras também foi feita análise de áreas maiores ( $\sim 13 \text{ mm}^2$ ) através de micrografias por LF-CLSM feitas na lente de  $20\times$ . Os resultados são apresentados na Figura 66, onde na Figura 66a é mostrado um exemplo de micrografia para cada tipo de amostra. Os cálculos de ocupação de área mostram uma diferença estatística entre as amostras Si60C15F e Si60C15R, onde assim como no tempo de 3 h, a amostra Si60C15F apresentou a menor média (ver Figura 66b). Já na análise de distribuição de tamanho foi possível observar que diferente das demais amostras, as amostras Si60C15F e Si70C60F apresentaram maior quantidade de aglomerados, inclusive para tamanhos a partir de  $8 \mu\text{m}^2$  (essas amostras possuem menores valores de comprimento de correlação  $\xi \sim 3,00$  e  $3,75 \mu\text{m}$ , respectivamente).

Figura 66 – a) Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento  $20\times$  ( $3,6 \times 3,6 \text{ mm}$ ), para o tempo de 95 h; b) média de ocupação de área dada em porcentagem para pelo menos cinco amostras em relação a área avaliada. O desvio padrão é representado pela linha vermelha, e o asterisco (\*) indica diferença estatística entre essas amostras ( $p < 0,05$ ); c) distribuição de tamanho dos aglomerados de bactéria (dados em área) sobre a superfície. A área sombreada nos gráficos representa o desvio padrão enquanto a curva cinza representa os valores médios

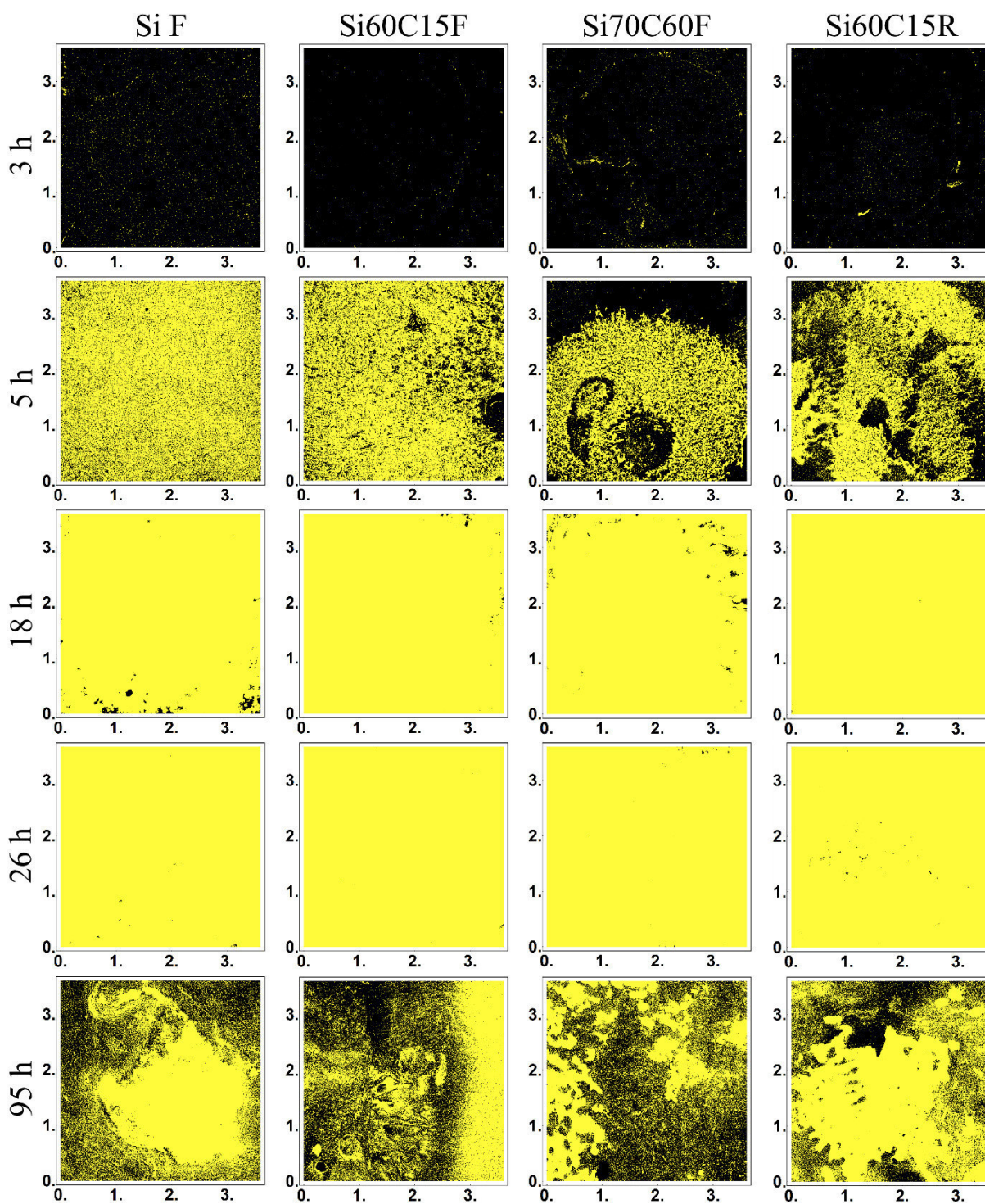


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para melhor comparação, a Figura 67 apresenta um resumo das micrografias por LF-CLSM feitas na lente de  $20\times$  (em ampla escala) para todos os tempos em estudo. As imagens

apresentadas possuem ocupação de área próxima à média de cada tipo de superfície, de modo que as imagens são representativas. Já a Tabela 11 mostra os valores médio e desvio padrão da ocupação de área.

Figura 67 – Exemplo de micrografias obtidas por LF-CLSM das bactérias sobre as amostras de silícios obtidas na lente de aumento 20× (3,6 × 3,6 mm) para todos os tempos em estudo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 11 – Valores médios e seus desvios padrões da ocupação de área dados em porcentagem para todos os tempos em estudo

Amostras	3 h	5 h	18 h	26 h	95 h
<b>Si F</b>	2,82 ± 1,01	62,20 ± 21,76	97,01 ± 3,73	99,65 ± 0,60	52,73 ± 16,14
<b>Si60C15F</b>	1,52 ± 1,18	64,73 ± 9,91	99,19 ± 0,94	99,31 ± 0,71	28,86 ± 14,11
<b>Si70C60F</b>	4,82 ± 2,85	41,16 ± 11,51	97,41 ± 1,90	99,49 ± 0,39	45,86 ± 9,66
<b>Si60C15R</b>	2,17 ± 0,87	48,20 ± 11,54	97,95 ± 1,42	95,89 ± 7,78	59,08 ± 13,38

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme dito anteriormente, na literatura é citado que fatores da superfície como topografia de superfície (randômica ou estruturada com nano e microrrugosidade) e hidrofobicidade/hidrofilicidade influenciam na adesão bacteriana em superfícies abióticas (CRAWFORD et al., 2012; HSU et al., 2013; RIZZELLO et al., 2013; MEBERT et al., 2016; HIZAL et al., 2017). Há estudos que relatam a dependência da adesão em relação a nanorugosidade, ressaltando a importância dessas nanocaracterísticas na adesão em superfícies. Todavia, outros trabalhos encontraram uma tendência oposta, ou seja, que uma diminuição do padrão topográfico leva a um aumento no número de bactérias aderidas (RIZZELLO et al., 2013). Contudo, é comumente proposto que a maior área superficial das superfícies mais rugosas e a presença de depressões criam sítios favoráveis para colonização das mesmas, protegendo também os microrganismos de tensões de cisalhamento. Já a topografia superficial em nanoescala pode criar situações energéticas desfavoráveis para a adesão bacteriana e induzir forças de interação superfície-bactéria repulsivas que prejudicam a adesão e subsequente formação de biofilme (ANSELME et al., 2010; FENG et al., 2015; MEBERT et al., 2016).

Tais afirmações corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho para o tempo inicial de 3 h analisados em ampla escala, onde a amostra Si60C15F ( $R_q = 31,65$  nm), que possui pirâmides e vales de ordem de grandezas de dezenas ou poucas centenas de nanômetros (ver Figura 33f), apresentou menor quantidade de bactérias, menor inclusive que a amostra menos rugosa Si F ( $R_q = 0,80$  nm). Por outro lado, a amostra Si70C60F ( $R_q = 329,42$  nm), que possui estruturas que variam de centenas de nanômetros a poucos micrômetros (ver Figura 33f), resultando em maior área superficial e maior  $R_q$ , apresentou maior quantidade de bactérias aderidas quando comparada com as demais amostras. Através da análise de distribuição de tamanho dos aglomerados com áreas variando de 1 a 30  $\mu\text{m}^2$ , foi possível observar menor número médio de bactérias isoladas (abaixo de 3000) para a amostra Si60C15F quando comparadas com as demais amostras. Ademais, é possível observar menor quantidade

de pequenos aglomerados da ordem de  $8 \mu\text{m}^2$  (ver Figura 46c). Por sua vez, a análise da quantidade e distância média entre os centroides mostram maiores valores em todas as faixas para a amostra Si70C60F (3ª coluna), o que resultou nas menores distâncias médias entre os elementos presentes nessas faixas, sendo também possível observar que para as cinco primeiras faixas a amostra Si60C15F (2ª coluna) apresentou menor quantidade (ver Figura 47).

Há na literatura alguns trabalhos que observaram comportamento semelhante para tempos mais longos em rugosidades próximas às avaliadas no presente trabalho. O trabalho realizado por SINGH *et al.* (2011) em filmes finos de titânia sugerem uma relação entre a rugosidade da superfície e a ligação bacteriana: a medida que  $R_q$  aumentou para 20 nm a adesão também aumentou, acima de 20 nm foram observada inibições significativas de ligação e formação de biofilme. MEI *et al.* (2011) testaram a força de adesão de duas cepas de *Streptococcus* (*S. sanguinis* e *S. mutans*) em compósitos ortodônticos com diferentes rugosidades (20, 150 e 350 nm). Os resultados mostraram uma relação direta da força de adesão entre as bactérias e os compósitos com a rugosidade, sendo maior em resinas mais rugosas. A resposta de duas espécies de bactérias (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) foi avaliada em superfícies de Ti com rugosidades médias ( $R_a$ ) variando entre 0,6 e 14 nm. Para ambos os casos, observou-se uma preferência na adesão em superfícies de titânio com rugosidade próximas de 0,6 quando comparadas com rugosidades mais elevadas (TROUNG *et al.*, 2010). Em termos de estruturas, FENG *et al.* (2015) mostraram que superfícies de alumina anódicas com poros de diâmetro de 15 e 25 nm podiam efetivamente minimizar a ligação bacteriana ou a formação de biofilme dos microrganismos *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, analisados em um tempo de 48 h, apresentando melhores resultados quando comparados com poros de diâmetro 50 e 100 nm e superfície de controle (sem poros e com rugosidade de poucos nanômetros). Além disso, usando uma abordagem físico-química com base na teoria XDLVO, atribuíram os efeitos observados em grande parte às forças repulsivas, principalmente eletrostáticas e forças ácido-base, as quais foram bastante elevadas pela grande área superficial proveniente dos poros de alta densidade e pequeno diâmetro.

Os valores de ocupação de área apresentados na Tabela 11 para o tempo de 5 h mostram que houve um grande acréscimo quando comparado com o tempo anterior de 3 h. Interessantemente, a amostra Si70C60F que apresentou maior valor de ocupação de área, e consequentemente maior adesão no tempo de 3 h, passou a apresentar no entanto menor valor de ocupação, seguida pela amostra Si60C15R (segunda amostra mais rugosa). Este fato pode ser explicado devido a presença das microestruturas presentes em sua superfície. Em superfícies microestruturadas a motilidade das bactérias pode ser prejudicada e, eventualmente, pode exigir



mais energia do que o movimento em uma superfície não estruturada. Isso atrapalha a formação de grandes aglomerados e promove o isolamento de bactérias (DÍAZ et al., 2010, 2012, 2015). A análise de distribuição de tamanhos entre 1 a 30  $\mu\text{m}^2$  reforça essa afirmação, pois revela maior quantidade de elementos nas amostras Si70C60F e Si60C15R, especialmente para pequenos aglomerados, acima de 10  $\mu\text{m}^2$  (indicado por setas nos respectivos gráficos, ver Figura 52c). Além disso, na análise da quantidade e distância médias entre centroides é evidenciado maior quantidade de elementos e menor distância média para as quatro primeiras faixas de tamanho de áreas tomados nas amostras Si70C60F e Si60C15R, quando comparadas com os valores de Si F e Si60C15F (ver Figura 53).

Apesar das superfícies das amostras do presente trabalho apresentarem um conjunto de parâmetros topográficos ( $R_a$ ,  $R_q$ ,  $R_{sk}$ ,  $R_k$ ,  $\zeta$  e  $D$ ) e elementos com tamanhos diferentes (de poucos nanômetros a poucos micrômetros) nenhuma diferença estatística significativa pôde ser observada para os tempos de 18 e 26 h, quando há formação de biofilmes. Essas diferenças topográficas não impediram o crescimento e a formação de biofilmes, resultando em uma ocupação de área média próxima de 100 % para todas as amostras nesses dois tempos de estudo. Ademais, as quantidades de biomassas para as amostras nesses dois tempos foram próximas, não apresentando, portanto, diferença significativa.

## 5. CONCLUSÕES

Os ataques com KOH das amostras de silício nas condições descrita anteriormente produziram diferentes topografias de superfícies com boa reprodutibilidade. Os algoritmos FAPS, FASA e FACA desenvolvidos para calcular as dimensões fractais, mostraram-se eficiente quando avaliados em superfícies geradas no Gwyddion com fractalidade definidas. Entretanto, os valores obtidos pelo método FARMS estavam em maior acordo apenas para baixos valores de dimensão fractal. Todavia, esses valores estão bem próximos dos valores obtidos no próprio Gwyddion (RMS G) através do método “*Particionamento*”, que também usa a RMS da superfície, considerando diferentes tamanhos de áreas.

Através do processamento de micrografias feitas por LF-CLSM foi possível, pela primeira vez, usar uma nova abordagem para fazer uma comparação quantitativa da distribuição e ocupação de área por bactérias, aglomerados, colônias e biofilme, em uma ampla escala de comprimento ( $3,6 \times 3,6$  mm), sobre amostras devidamente caracterizadas em termos de seus parâmetros topográficos, tais como rugosidade média, rugosidade média quadrática, assimetria, curtose, comprimento de correlação e dimensão fractal, em diferentes tempos de avaliação (3 h, 5 h, 18 h, 26 h e 95h). Através das micrografias obtidas por LF-CLSM feitas com a lente de  $20\times$  foi possível observar, em uma ampla escala, diferentes respostas topográficas que não tinham sido observadas (ou estatisticamente comprovadas) nas micrografias obtidas usando a lente de  $50\times$ , portanto, em uma área menor.

Constatou-se que as bactérias aderiram em todas as superfícies. Entretanto foi averiguado que houve menor adesão na amostra Si60C15F e maior adesão para a amostra Si70C60F para o tempo de 3 h. Este fato indica que para a amostra Si60C15F as condições topográficas foram mais desfavoráveis para a adesão bacteriana. Todavia, para o tempo de 5 h observou-se o oposto, a amostra Si70C60F apresentou menor quantidade quando comparada com as demais. Tal fato deve-se à presença de microestruturas que dificultam a motilidade das bactérias, exigindo assim mais energia para tal propósito nesse tipo de superfície do que em superfícies que não apresentam tais microestruturas.

Contudo, para tempos maiores de 18 e 26 h foi evidenciado que as superfícies em estudo foram incapazes de impedir a colonização bacteriana e, conseqüentemente, a formação de biofilmes, os quais foram observados em praticamente toda a área avaliada ( $3,6 \times 3,6$  mm), para todas as amostras. Além disso, apesar das superfícies apresentarem hidrofobicidade diferentes, topografias diferentes, bem como um conjunto de parâmetros diferentes, os valores

médios de ocupação de área para todas as amostras foram próximos de 100 %. Ademais, os algoritmos desenvolvidos para processar os *stacks* permitiram fazer um comparativo entre os biofilmes formados sobre os substratos nos tempos de 18 e 26 h. Os resultados mostraram que não houve grandes diferenças nas quantidades de biomassas presentes nas superfícies com diferentes topografias, não apresentando também grandes diferenças entre os diferentes tempos (18 e 26 h).

Também através dos algoritmos foi possível estimar a superfície dos biofilmes (plotadas em 2D e 3D) e então calcular parâmetros topográficos dos mesmos formados sobre as amostras nesses tempos. Não foi possível observar relação entre os valores de  $R_a$  e  $R_q$  dos biofilmes avaliados com seus tempos de formação (18 e 26 h). Entretanto foi evidenciado menores valores para  $R_{sk}$  e maiores valores de  $R_k$  das amostras no tempo de 26 h quando comparados com os valores obtidos num tempo de avaliação de 18 h. Já as análises das micrografias do tempo mais longo de investigação de 95 h apresentou maior soltura para a amostra Si60C15F, entretanto, maior validação estatística se faz necessário para comprovar tal observação.

Por fim, a abordagem apresentada no presente trabalho pode ser utilizada para diversos tipos de bactérias em diversos tipos de superfícies com diferentes tipos de topografias e ambientes físico-químicos que possuem importância científica ou tecnologia, podendo auxiliar na compreensão e desenvolvimento de novas estratégias para tratamentos e prevenção de problema relacionados às bactérias e a formação de biofilmes.

## 6. PERSPECTIVAS

De posse dessa nova abordagem quantitativa em ampla escala de comprimento, estudos em outras amostras de alto interesse e utilização (por exemplo aço inoxidável, policloreto de vinila (PVC) e alumínio) devem ser realizados com diferentes bactérias, principalmente àquelas que são motivos de preocupação tanto a nível industrial como de saúde humana. Tais estudos devem ser feitos com maiores grupos amostrais para obtenção de resultados com maior poder estatístico. Além disso, essa abordagem pode auxiliar nos estudos da eficácia de antibióticos em conjunto com as topografias de superfícies, uma vez que permite a observação de quantidades de bactérias e pequenos aglomerados, os quais são mais predispostos ao efeito desses antibióticos.

Melhorias nos algoritmos desenvolvidos devem ser exploradas, especialmente no que diz respeito a maior automatização, menor tempo de tratamento e demanda de memória computacional para os processamentos das micrografias por LF-CLSM. Desenvolvimento de outros algoritmos para caracterização tanto da topografia de superfície como para processamento de micrografias por LF-CLSM podem ser obtidos, bem como melhoramento dos processamentos dos *stacks* aliados a otimização de parâmetros de aquisição das micrografias no microscópico confocal, tais como espessura da fatia ótica, tamanho do passo, entre outros. Com isso, a estimativa para a quantidade de biomassa, juntamente com os cálculos dos parâmetros de superfície dos biofilmes podem tornar-se mais precisos.

## REFERÊNCIAS

- ACRES, R. G.; ELLIS, A. V.; ALVINO, J.; et al. Molecular structure of 3-aminopropyltriethoxysilane layers formed on silanol-terminated silicon surfaces. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 10, p. 6289–6297, 2012.
- ANDRESA, J. S. **Formação e Reatividade de Filmes Finos de Macro-cíclicos de Ferro sobre Silício Monocristalino**. 2007. 172 f. Universidade de São Paulo. 2007.
- ANGUIANO, E.; PANCORBO, M.; AGUILAR, M. Fractal characterization by frequency analysis. I. Surfaces. **Journal of Microscopy**, v. 172, n. 3, p. 223–232, 1993a.
- ANGUIANO, E.; PANCORBO, M.; AGUILAR, M. Fractal characterization by Frequency Analysis. II. A new method. **Journal of Microscopy**, v. 172, p. 233–238, 1993b.
- ANSELME, K.; BIGERELLE, M. Modelling approach in cell/material interactions studies. **Biomaterials**, v. 27, n. 8, p. 1187–1199, 2006.
- ANSELME, K.; DAVIDSON, P.; POPA, A. M.; et al. The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 3824–3846, 2010.
- BAGHERIFARD, S.; HICKEY, D. J.; LUCA, A. C. DE; et al. The influence of nanostructured features on bacterial adhesion and bone cell functions on severely shot peened 316L stainless steel. **Biomaterials**, v. 73, p. 185–197, 2015.
- BAKKER, D. P. Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after conditioning film formation in the marine environment. **Microbiology**, v. 150, n. 6, p. 1779–1784, 2004.
- BAZARGAN, A.; YAN, Y.; HUI, C. W.; MCKAY, G. A Review: Synthesis of Carbon-Based Nano and Micro Materials by High Temperature and High Pressure. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 36, p. 12689–12702, 2013.
- BEAN, K. E. Anisotropic etching of silicon. **IEEE Transactions on Electron Devices**, v. 25, n. 10, p. 1185–1193, 1978.
- BENNETT, J. M.; DANCY, J. H. Stylus profiling instrument for measuring statistical properties of smooth optical surfaces. **Applied Optics**, v. 20, n. 10, p. 1785, 1981.
- BEYENAL, H.; DONOVAN, C.; LEWANDOWSKI, Z.; HARKIN, G. Three-dimensional biofilm structure quantification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, n. 3, p. 395–413, 2004.
- BONETTO, R. D.; LADAGA, J. L.; PONZ, E. Measuring Surface Topography by Scanning Electron Microscopy. II. Analysis of Three Estimators of Surface Roughness in Second Dimension and Third Dimension. **Microscopy and Microanalysis**, v. 12, n. 2, p. 178–186,

2006.

BRAMOWICZ, M.; KULESZA, S.; RYCHLIK, K. A Comparison Between Contact and Tapping AFM Mode in Surface Morphology Studies. **Technical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 307–318, 2012.

CALDERÓN-JIMÉNEZ, B.; JOHNSON, M. E.; MONTORO BUSTOS, A. R.; et al. Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. 6, 2017.

CHAUHAN, A. K.; ASWAL, D. K.; KOIRY, S. P.; et al. Self-assembly of the 3-aminopropyltrimethoxysilane multilayers on Si and hysteretic current-voltage characteristics. **Applied Physics A: Materials Science and Processing**, v. 90, n. 3, p. 581–589, 2008.

CHEN, Y.; LUO, T.; MA, C.; HUANG, W.; GAO, S. Spectral Analysis of Irregular Roughness Artifacts Measured by Atomic Force Microscopy and Laser Scanning Microscopy. **Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada**, v. 20, n. 6, p. 1–10, 2014.

CRAWFORD, R. J.; WEBB, H. K.; TRUONG, V. K.; HASAN, J.; IVANOVA, E. P. Surface topographical factors influencing bacterial attachment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 179–182, p. 142–149, 2012.

DABROWSKI, J.; MUSSING, H.-J. **Silicon Surfaces and Formation of Interfaces: Basic Science in the Industrial World**. New Jersey: World Scientific Publishing Company, 2000.

DECARLO, L. T. On the Meaning and Use of Kurtosis. , v. 2, n. 3, p. 292–307, 1997.

DEMIREL, G.; BIRLIK, G.; ÇAKMAK, M.; ÇAYKARA, T.; ELLIALTIOĞLU, Ş. An ab initio study of 3-aminopropyltrimethoxysilane molecule on Si(111)-(1 $\times$ 1) surface. **Surface Science**, v. 601, n. 18, p. 3740–3744, 2007.

DÍAZ, C.; FERNÁNDEZ LORENZO DE MELE; SCHILARDI, P. L. Comment on “The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale.” **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 4, p. 1934–1935, 2011.

DÍAZ, C.; MIÑÁN, A.; LORENZO, M. F.; SCHILARDI, P. Surface topography hindering of bacterial organization. Disponível em: <<http://www.materialstoday.com/surface-science/comment/surface-topography/>>. Acesso em: 8/12/2016.

DÍAZ, C.; MIÑÁN, A.; SCHILARDI, P. L.; FERNÁNDEZ LORENZO DE MELE, M. Synergistic antimicrobial effect against early biofilm formation: micropatterned surface plus antibiotic treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 3, p. 221–226, 2012.

DÍAZ, C.; SALVAREZZA, R. C.; FERNÁNDEZ LORENZO DE MELE, M. A.; SCHILARDI,

- P. L. Organization of *Pseudomonas fluorescens* on Chemically Different Nano/Microstructured Surfaces. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 9, p. 2530–2539, 2010.
- DÍAZ, C.; SCHILARDI, P. L.; SANTOS CLARO, P. C. DOS; SALVAREZZA, R. C.; MELE, M. A. F. L. DE. Submicron trenches reduce the *Pseudomonas fluorescens* colonization rate on solid surfaces. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 1, p. 136–143, 2009.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.
- ELWENSPOEK, M.; LINDBERG, U.; KOK, H.; SMITH, L. Wet Chemical Etching of Silicon. **IEEE Workshop Micro-Electro Mechanical Systems**, p. 223–228, 1994.
- FANG, S. J.; HAPLEPETE, S.; CHEN, W.; HELMS, C. R.; EDWARDS, H. Analyzing atomic force microscopy images using spectral methods. **Journal of Applied Physics**, v. 82, n. 12, p. 5891, 1997.
- FENG, G.; CHENG, Y.; WANG, S.-Y.; et al. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 1, n. August, p. 15022, 2015.
- GADELMAWLA, E. S.; KOURA, M. M.; MAKSOUD, T. M. A.; ELEWA, I. M.; SOLIMAN, H. H. Roughness parameters. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 123, n. 1, p. 133–145, 2002.
- GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.
- GENTILE, F.; MEDDA, R.; CHENG, L.; et al. Selective modulation of cell response on engineered fractal silicon substrates. **Scientific reports**, v. 3, p. 1461, 2013.
- GENTILE, F.; TIRINATO, L.; BATTISTA, E.; et al. Cells preferentially grow on rough substrates. **Biomaterials**, v. 31, n. 28, p. 7205–7212, 2010.
- GISIGER, T. Scale invariance in biology: coincidence or footprint of a universal mechanism? **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 76, n. 2, p. 161–209, 2001.
- GLEMBOCKI, O. J.; STAHLBUSH, R. E. Bias-dependent etching of silicon in aqueous KOH. **Journal of Electrochemical Society**, v. 132, n. 1, p. 145–151, 1985.
- GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. Chapter 4 - Filtering in the Frequency Domain. **Digital Image Processing**. 3rd ed., p.954, 2008.
- GONZALEZ MARTINEZ, J. F.; NIETO-CARVAJAL, I.; ABAD, J.; COLCHERO, J. Nanoscale measurement of the power spectral density of surface roughness: how to solve a difficult experimental challenge. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 1, p. 174, 2012.
- HEYDORN, A.; HEYDORN, A.; NIELSEN, A. T.; et al. Quantification of biofilm structures by

- the novel computer program. **Image Processing**, , n. 2000, p. 2395–2407, 2000.
- HIZAL, F.; RUNGRAENG, N.; LEE, J.; et al. Nanoengineered Superhydrophobic Surfaces of Aluminum with Extremely Low Bacterial Adhesivity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 13, p. 12118–12129, 2017.
- HOCHBAUM, A. I.; AIZENBERG, J. Bacteria pattern spontaneously on periodic nanostructure arrays. **Nano Letters**, v. 10, n. 9, p. 3717–3721, 2010.
- HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424–434, 2010.
- HOU, S.; GU, H.; SMITH, C.; REN, D. Microtopographic patterns affect escherichia coli biofilm formation on poly(dimethylsiloxane) surfaces. **Langmuir**, v. 27, n. 6, p. 2686–2691, 2011.
- HOWARTER, J. A.; YOUNGBLOOD, J. P. Optimization of silica silanization by 3-aminopropyltriethoxysilane. **Langmuir**, v. 22, n. 26, p. 11142–11147, 2006.
- HSU, L. C.; FANG, J.; BORCA-TASCIUC, D. A.; WOROBO, R. W.; MORARU, C. I. Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 8, p. 2703–2712, 2013.
- IEVA, A. DI; ESTEBAN, F. J.; GRIZZI, F.; KLONOWSKI, W.; MARTÍN-LANDROVE, M. Fractals in the neurosciences, Part II: clinical applications and future perspectives. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 30–43, 2015.
- IEVA, A. DI; GRIZZI, F.; JELINEK, H.; PELLIONISZ, A. J.; LOSA, G. A. Fractals in the Neurosciences, Part I: General Principles and Basic Neurosciences. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 20, n. 4, p. 403–417, 2014.
- IVANOVA, E. P.; TRUONG, V. K.; WEBB, H. K.; et al. Differential attraction and repulsion of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on molecularly smooth titanium films. **Scientific reports**, v. 1, p. 165, 2011.
- JAKŠA, G.; ŠTEFANE, B.; KOVAČ, J. Influence of different solvents on the morphology of APTMS-modified silicon surfaces. **Applied Surface Science**, v. 315, n. 1, p. 516–522, 2014.
- JAMES, J. F. **A Student's Guide to Fourier Transforms**. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2011.
- JIANG, Y.; ZHANG, X.; WANG, F.; ZHAO, Y. Optimization of a silicon wafer texturing process by modifying the texturing temperature for heterojunction solar cell applications. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 5, n. 85, p. 69629–69635, 2015.



- JÚNIOR, J. P. DE O. **Desenvolvimento De Software Corrosão Anisotrópica Do Silício**. 2008. 126 f. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 2008.
- KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, v. 8, p. 37–57, 2004.
- KENDALL, D. L. Vertical etching of silicon at very high aspect ratios. **Annual Review of Materials Science**, v. 9, p. 373–403, 1979.
- KOLEWE, K. W.; PEYTON, S. R.; SCHIFFMAN, J. D. Fewer Bacteria Adhere to Softer Hydrogels. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 35, p. 19562–19569, 2015.
- KOO, H.-J.; KIM, Y. J.; LEE, Y. H.; et al. Nano-embossed Hollow Spherical TiO<sub>2</sub> as Bifunctional Material for High-Efficiency Dye-Sensitized Solar Cells. **Advanced Materials**, v. 20, n. 1, p. 195–199, 2008.
- KOVALEV, A. E.; DENING, K.; PERSSON, B. N. J.; GORB, S. N. Surface topography and contact mechanics of dry and wet human skin. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1341–1348, 2014.
- KUEHN, M.; HAUSNER, M.; BUNGARTZ, H.-J.; et al. Automated Confocal Laser Scanning Microscopy and Semiautomated Image Processing for Analysis of Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4115–4127, 1998.
- LIU, C.; ZHAO, Q.; LIU, Y.; WANG, S.; ABEL, E. W. Reduction of bacterial adhesion on modified DLC coatings. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 182–187, 2008.
- LIU, X.; COXON, P. R.; PETERS, M.; et al. Black silicon: fabrication methods, properties and solar energy applications. **Energy Environmental Science**, v. 7, n. 10, p. 3223–3263, 2014.
- LÜDECKE, C.; ROTH, M.; YU, W.; et al. Nanorough titanium surfaces reduce adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* via nano adhesion points. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 145, p. 617–625, 2016.
- MA, K.; ZENG, X.; LEI, Q.; et al. Texturization and rounded process of silicon wafers for heterojunction with intrinsic thin-layer solar cells. **Frontiers of Optoelectronics**, v. 7, n. 1, p. 46–52, 2014.
- MACDONALD, W.; CAMPBELL, P.; FISHER, J.; WENNERBERG, A. Variation in surface texture measurements. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 70, n. 2, p. 262–269, 2004.
- MANDELBROT, B. B. **The Fractal Geometry of Nature**. New York: W.H. Freeman and Company, 1982.
- MANDELBROT, B. B.; PASSOJA, D. E.; PAULLAY, A. J. Fractal character of fracture

surfaces of metals. **Nature**, v. 308, p. 721–722, 1984.

MANNELQUIST, A.; ALMQVIST, N.; FREDRIKSSON, S. Influence of tip geometry on fractal analysis of atomic forcemicroscopy images A.Mannelquist,. **Applied Physics A**, v. 66, p. 891–895, 1998.

MARTIN, M.; CUNGE, G. Surface roughness generated by plasma etching processes of silicon. **Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures**, v. 26, n. 4, p. 1281, 2008.

MEBERT, A. M.; VILLANUEVA, M. E.; CATALANO, P. N.; et al. Chapter 5 - Surface chemistry of nanobiomaterials with antimicrobial activity\*. **Surface Chemistry of Nanobiomaterials**. p.265–300, 2016.

MEDILANSKI, E.; KAUFMANN, K.; WICK, L. Y.; WANNER, O.; HARMS, H. Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion. **Biofouling**, v. 18, n. 3, p. 193–203, 2002.

MEI, L.; BUSSCHER, H. J.; MEI, H. C. VAN DER; REN, Y. Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. **Dental Materials**, v. 27, n. 8, p. 770–778, 2011.

MORI, V.; SANTOS, R.; SOBRAL, L. **Metalurgia do Silício: Processos de obtenção e impactos ambientais**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007.

MORIARTY, T. F.; POULSSON, A H. C.; ROCHFORD, E. T. J.; RICHARDS, R. G. **Bacterial Adhesion and Biomaterial Surfaces**. Elsevier Ltd., 2011.

NEČAS, D.; KLAPETEK, P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. **Open Physics**, v. 10, n. 1, p. 181–188, 2012.

NEU, T. R.; MANZ, B.; VOLKE, F.; et al. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 72, n. 1, p. 1–21, 2010.

NORONHA, V. T. **Revestimentos de prata sobre superfícies silanizadas: Avaliação de resistência química e adesão bacteriana**. 2017. 95 f. Universidade Federal do Ceará. 2017.

NORONHA, V. T.; SOUSA, F. A.; SOUZA FILHO, A. G.; et al. Influence of Surface Silanization on the Physicochemical Stability of Silver Nanocoatings: A Large Length Scale Assessment. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 21, p. 11300–11311, 2017.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. **The Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1–20, 2014.

O'NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, p. 1–84, 2016.

- PASTERNAK, R. M.; AMY, S. R.; CHABA, Y. J. Attachment of 3- Aminopropyl triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. **Langmuir**, v. 24, n. 9, p. 12963–12971, 2008.
- PEITGEN, H.-O.; HARTMUT, J.; SAUPE, D. Chaos and Fractals: New Frontiers of Science. **New Frontiers of Science**. 2nd ed., v. 25, p.864, 2004.
- PEIXOTO, E. M. A. Silício. **Química Nova na Escola**, v. 14, p. 1, 2001.
- PERCIVAL, S. L.; MALIC, S.; CRUZ, H.; WILLIAMS, D. W. Introduction to Biofilms. **Biofilms and Veterinary Medicine**. v. 6, p.41–68, 2011.
- PERSSON, B. N. J. On the fractal dimension of rough surfaces. **Tribology Letters**, v. 54, n. 1, p. 99–106, 2014.
- PERSSON, B. N. J.; ALBOHR, O.; TARTAGLINO, U.; VOLOKITIN, A I.; TOSATTI, E. On the nature of surface roughness with application to contact mechanics, sealing, rubber friction and adhesion. **Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal**, v. 17, n. 1, p. R1–R62, 2005.
- PONZ, E.; LADAGA, J. L.; BONETTO, R. D. Measuring Surface Topography with Scanning Electron Microscopy. I. EZEImage: A Program to Obtain 3D Surface Data. **Microscopy and Microanalysis**, v. 12, n. 2, p. 170–177, 2006.
- POWELL, O.; HARRISON, H. B. Anisotropic etching of {100} and {110} planes in (100) silicon. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 11, n. 3, p. 217, 2001.
- PRICE, J. B. Anisotropic Etching of Silicon with KOH-H<sub>2</sub>O-Isopropyl Alcohol. **Semiconductor Silicon**. p.339–353, 1973.
- PROVDER, T.; KUNZ, B. Application of profilometry and fractal analysis to the characterization of coatings surface roughness. **Progress in Organic Coatings**, v. 27, n. 1–4, p. 219–226, 1996.
- PULIT-PROCIAK, J.; BANACH, M. Silver nanoparticles - A material of the future...? **Open Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 76–91, 2016.
- PUT, A.; VERTES, A.; WEGRZYNEK, D.; TREIGER, B.; GRIEKEN, R. Quantitative characterization of individual particle surfaces by fractal analysis of scanning electron microscope images. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 350, n. 7–9, p. 440–447, 1994.
- QUADROS, M. E.; MARR, L. C. Environmental and Human Health Risks of Aerosolized Silver Nanoparticles. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 60, n. 7, p. 770–781, 2010.
- RAMPELOTTO, P. H. A química da vida como nós não conhecemos. **Química Nova**, v. 35, n.

8, p. 1619–1627, 2012.

RASMUSSEN, B. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. **Nature**, v. 405, n. 6787, p. 676–679, 2000.

RIZZELLO, L.; CINGOLANI, R.; POMPA, P. P. Nanotechnology tools for antibacterial materials. **Nanomedicine**, v. 8, n. 5, p. 807–821, 2013.

RONNOW, D.; LINDSTROM, T.; ISIDORSSON, C.; RIBBING, G. Surface roughness of oxidised copper films studied by atomic force microscopy and spectroscopic light scattering. **Thin solid films**, v. 325, p. 92–98, 1998.

RUSSEL, J. B. **Química geral Vol. 2**. 2nd ed. São Paulo: Pearson, 1994.

SAUL, C. K. Corrosão Anisotrópica de Silício em Soluções Alcalinas Fundamentos e Aplicações. **Sensores y Microsistemas - Tecnologias de Fabricacion**. v. 1, p.45–76, 2004.

SAURÍ, J.; SUNE-NEGRE, J. M.; DÍAZ-MARCOS, J.; et al. Relationships between surface free energy, surface texture parameters and controlled drug release in hydrophilic matrices. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 1, p. 328–340, 2015.

SCHEUERMAN, T.; CAMPER, A.; HAMILTON, M. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. **Journal of colloid and interface science**, v. 208, p. 23–33, 1998.

SCHRÖDER, H.; OBERMEIER, E.; STECKENBORN, A. Micropyramidal hillocks on KOH etched {100} silicon surfaces: formation, prevention and removal. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 9, n. 2, p. 139–145, 1999.

SEIDEL, H. The mechanism of anisotropic, electrochemical silicon etching in alkaline solutions. **Solid-State Sensor and Actuator Workshop, 1990. 4th Technical Digest., IEEE**, 1990.

SEIDEL, H.; CSEPREGI, L.; HEUBERGER, A.; BAUMGARTEL, H. Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline Solutions I. Orientation Dependence and Behavior of Passivation Layers. **Journal of Electrochemical Society**, v. 137, n. 11, p. 3612–3626, 1990a.

SEIDEL, H.; CSEPREGI, L.; HEUBERGER, A.; BAUMGARTEL, H. Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline Solutions II. Influence of Dopants. **Journal of Electrochemical Society**, v. 137, n. 11, p. 3626–3632, 1990b.

SENTHILKUMAR, M.; SAHOO, N. K.; THAKUR, S.; TOKAS, R. B. Characterization of microroughness parameters in gadolinium oxide thin films : A study based on extended power spectral density analyses. **Applied Surface Science**, v. 252, p. 1608–1619, 2005.

SILVA, F. J. F. S. **Estudos da corrosão anisotrópica do silício frente soluções de KOH e sais metálicos**. 2008. 52 f. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. 2008.

SINGH, A. V.; VYAS, V.; PATIL, R.; et al. Quantitative characterization of the influence of the

nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation.

**PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

SMITH, K.; HUNTER, I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 966–973, 2008.

SOMMARGREN, G. E. Optical heterodyne profilometry. **Applied optics**, v. 20, n. 4, p. 610–618, 1981.

SONG, F.; KOO, H.; REN, D. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 8, p. 1027–1034, 2015.

SOUSA, F.; NORONHA, V.; MACHADO, T.; et al. Silver Nanocoatings at Large Length Scales: Influence of the AgNPs Morphology and Capping Agents on the Coating Chemical Stability and Antimicrobial Effect. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 9, p. 1639–1649, 2017.

STACK EXCHANGE, M. Graphics`Mesh`FindIntersections[ ]. Disponível em: <<https://mathematica.stackexchange.com/questions/41496/graphicsmeshfindintersections-fails-to-detect-intersections>>. Acesso em: 20/6/2017.

TONG, W. M.; WILLIAMS, R. S. Kinetics of Surface Growth: Phenomenology, Scaling, and Mechanisms of Smoothing and Roughening. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 401–438, 1994.

TROUNG, V. K.; WANG, J.; LAPOVOK, R.; et al. Bacterial Attachment Response on Titanium Surfaces with Nanometric Topographic Features. **Trends in Colloid and Interface Science XXIII**. v. 137, p.41–45, 2010.

TRUONG, V. K.; LAPOVOK, R.; ESTRIN, Y. S.; et al. The influence of nano-scale surface roughness on bacterial adhesion to ultrafine-grained titanium. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3674–3683, 2010.

VASUDEVAN, R.; KENNEDY, A. J.; MERRITT, M.; CROCKER, F. H.; BANEY, R. H. Microscale patterned surfaces reduce bacterial fouling-microscopic and theoretical analysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 225–232, 2014.

WESTFALL, P. H. Kurtosis as Peakedness, 1905 - 2014. R.I.P. **The American statistician**, v. 68, n. 3, p. 191–195, 2014.

WHITEHEAD, K. A.; COLLIGON, J.; VERRAN, J. Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 41, n. 2–3, p. 129–138, 2005.

WHITEHOUSE, D. Chapter 3 - Profile and areal (3D) parameter characterization. **Surfaces and Their Measurement**. p.48–95, 2002.

- WILLYARD, C. Drug-resistant bacteria ranked. **Nature**, v. 543, p. 15, 2017.
- WU, Y.; ZITELLI, J. P.; TENHUISEN, K. S.; YU, X.; LIBERA, M. R. Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 951–960, 2011.
- WYANT, J. C.; KOLIOPOULOS, C. L.; BHUSHAN, B.; GEORGE, O. E. An Optical Profilometer for Surface Characterization of Magnetic Media. **ASLE Transactions**, v. 27, n. 2, p. 101–113, 1984.
- XIU, Y.; ZHU, L.; HESS, D. W.; WONG, C. P. Hierarchical silicon etched structures for controlled hydrophobicity/ superhydrophobicity. **Nano Letters**, v. 7, n. 11, p. 3388–3393, 2007.
- XU, C.; TIAN, H.; REECE, C. E.; KELLEY, M. J. Enhanced characterization of niobium surface topography. **Physical Review Special Topics - Accelerators and Beams**, v. 14, n. 12, p. 123501, 2011.
- XU, C.; TIAN, H.; REECE, C. E.; KELLEY, M. J. Topographic power spectral density study of the effect of surface treatment processes on niobium for superconducting radio frequency accelerator cavities. **Physical Review Special Topics - Accelerators and Beams**, v. 15, n. 4, p. 43502, 2012.
- YANG, X.; BEYENAL, H.; HARKIN, G.; LEWANDOWSKI, Z. Quantifying biofilm structure using image analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 39, n. 2, p. 109–119, 2000.
- ZHANG, X.; ZHANG, Q.; YAN, T.; et al. Quantitatively Predicting Bacterial Adhesion Using Surface Free Energy Determined with a Spectrophotometric Method. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 10, p. 6164–6171, 2015.
- ZHOU, Z.-F.; ZHANG, T.; ZHOU, W.; LI, W. Profilometer for measuring superfine surfaces. **Optical Engineering**, v. 40, p. 1646, 2001.
- ZUBEL, I.; BARYCKA, I. Silicon anisotropic etching in alkaline solutions I. The geometric description of figures developed under etching Si (100) various solutions. **Sensors and Actuators A**, v. 70, p. 250–259, 1998.

## APÊNDICE A – ALGORITMOS PARA FUNÇÃO DE CORRELAÇÃO E COMPRIMENTO DE CORRELAÇÃO

### Importando a imagem

```
diretorio = NotebookDirectory[]
NomeDaAmostra = "SiVerso80um5";
Imagem = Import[FileNameJoin[
  {diretorio, "Novas imagens", StringJoin[NomeDaAmostra, ".tiff"]}], "Image"]
```

### ACF para uma única linha (perfil) da imagem

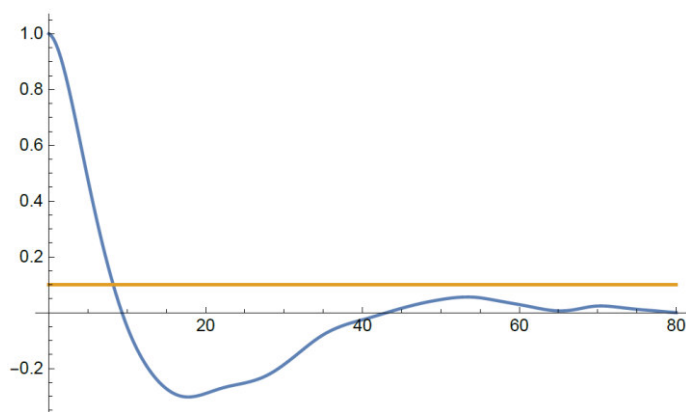
```
Dados = ImageData[Imagem][[All, All, 1]];
Perfil = Dados[[256]];
posições = Range[0, Length[Perfil] - 1];
ACF = CorrelationFunction[Perfil, #] & /@ posições;
Pontos = Transpose[{{(posições / 511) * 80, ACF}}];
ListPlot[Pontos, Joined → True, PlotRange → All]
```

### ACF média de todas ACFs dos perfis

```
Linhas = Flatten[Transpose[Thread[List[Dados, #]] & /@ posições], 1];
ACFs = Partition[CorrelationFunction[#[[1]], #[[2]]] & /@ Linhas, 512];
ACFmédia = Mean[ACFs];
posições = Range[0, 511];
Pontos = Transpose[{{(posições / 511) * 80, ACFmédia}}];
ListPlot[Pontos, Joined → True, PlotRange → All]
```

### Cálculo do comprimento de correlação e plotagem

```
maximoX = 80;
valor1 = First[ACFmédia] / 10;
LinhaReta =
  {{0, valor1}, {maximoX/4, valor1}, {maximoX/2, valor1}, {maximoX, valor1}};
plot = ListLinePlot[{{Pontos, LinhaReta}, Joined → True, PlotRange → All]
PontodeInterceção = Graphics`Mesh`FindIntersections@plot
```



```
{{8.21695, 0.1}}
```

## APÊNDICE B – ALGORITMOS PARA PSD E RMS, E CÁLCULO DA FRACTALIDADE PELOS MÉTODOS FAPS, FASA, FACA E FARMS

### Importando a imagem e máscaras

```

diretorio = NotebookDirectory[];
NomeDaAmostra = "H_0,5_G";
Mascara1 = ImageResize[Import[
  FileNameJoin[{diretorio, StringJoin["Mascara1", ".jpg"]}], "Image"], {1024, 1024}];

Mascara2 = ColorConvert[ImageResize[ImageTake[ColorNegate[
  
],
  {1, 198}, {51, 249}], {1024, 1024}], "Grayscale"];

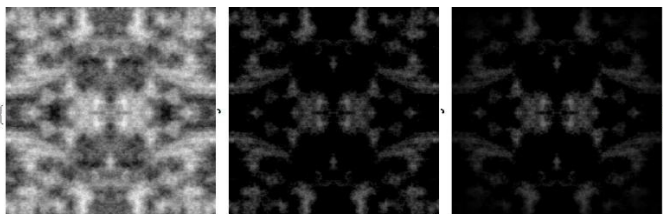
Img1 = ImageResize[Import[FileNameJoin[
  {diretorio, StringJoin[NomeDaAmostra, ".tiff"]}]], "Image"], {512, 512}];

Img2 = ImageResize[ImageAssemble[{
  {Img1,
    ImageReflect[Img1, Left -> Right]},
  {ImageReflect[Img1, Top -> Bottom],
    ImageReflect[ImageReflect[Img1, Top -> Bottom], Left -> Right]}}], {1024, 1024}];

d1 = ImageData[Img2];
d2 = d1[[All, All, 1]];

d3 = (d2 - Mean[Flatten[d2]]);
Img3 = Image[d3];
Img4 = ImageMultiply[Img3, Mascara2];
d4 = ImageData[Img4];
{Img2, Img3, Img4}

```



### Power spectrum

```

ps1 = PeriodogramArray[d4, FourierParameters -> {1, 1}];
ps2 = (1 / (2 * Pi) ^ 2) * ps1;
fudgeFactor1 = 1;
abs1 = fudgeFactor1 * ps2;
Img5 = Image[abs1];

```



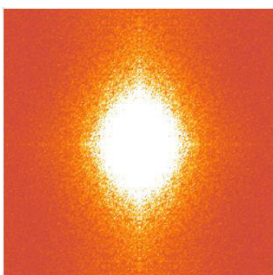
```

{{Img51, Img52}, {Img53, Img54}} = ImagePartition[Img5, {512}];
Img6 = ImageAssemble[ {
  {ImageRotate[Img51, Pi], ImageRotate[Img52, Pi]},
  {ImageRotate[Img53, Pi], ImageRotate[Img54, Pi]}}];

Img7 = ImageMultiply[Img6, Mascara1];

Transformada = ListDensityPlot[ImageData[ImageResize[Img6, {256, 256}]],
  ColorFunction -> "SunsetColors", Frame -> False]

```

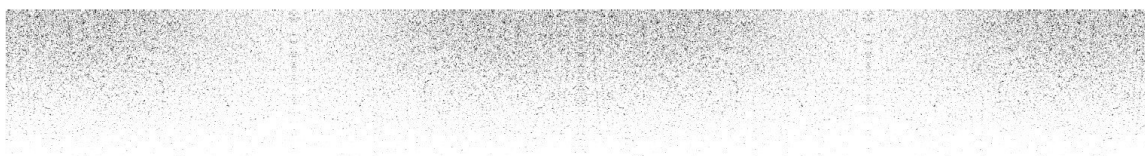


## Power spectrum em coordenadas polares

```

{center, radius} = ComponentMeasurements [
  MorphologicalComponents[Img6, 0], {"Centroid", "EquivalentDiskRadius"}][[1, 2]];
radius1 = 512;
f1[x_, y_] := {Cos[x] * y, Sin[x] * y}
polar = ImageTransformation[Img7, center + f1[#[[1]], #[[2]]] &,
  {2 Pi radius1, radius1}, DataRange -> Full, PlotRange -> {{0, 2 Pi}, {0, radius1}}]

```



## CÁLCULO DA DIMENSÃO FRACTAL (FD)

### FACA - Fractal Analysis by Circular Average

```

C1 = (1 / (2 * Pi)) * ImageData[polar];
C2 = Mean[Transpose[C1]];
P1 = N@
  Transpose[ {Table[i, {i, qmin, qmax, (qmax - qmin) / (Length[C2] - 1)}], Reverse[C2]}];
{ListPlot[P1, PlotRange -> All], ListLogLogPlot[P1, PlotRange -> All]};

P2 = Log10[P1[[All, 1]]];
P3 = Log10[P1[[All, 2]]];
P1f1 = Transpose[{P2, P3}];
P1f2 = Take[P1f1, {1, Length[P1f1]}];
F1 = Fit[Take[P1f2, {7, Length[P1f2] - 260}], {1, x1}, x1]
b = Coefficient[F1, x1]
FD = SetAccuracy[(8 + b) / 2, 3]

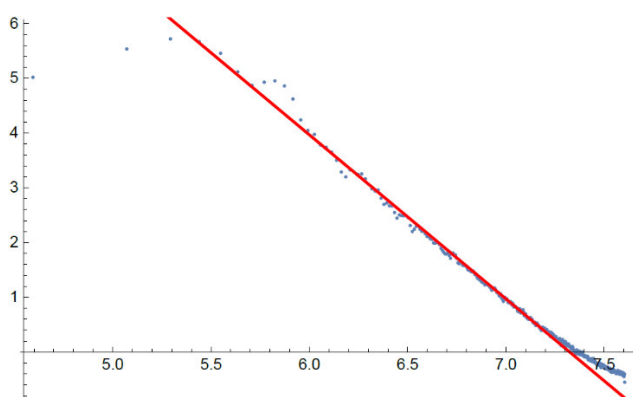
Img8 = Show[ListPlot[P1f2, PlotRange -> All, Joined -> False],
  Plot[F1, {x1, 4.6, 16}, PlotStyle -> Red]]

```

21.9473 – 2.9965 x1

–2.9965

2.50



### FASA - Fractal Analysis from Section Average

```
ImageDimensions[polar][[1]];
LinhasAngulos = Cases[Table[x, {x, 0, ImageDimensions[polar][[1]], 24}], Except[0]];
D1 = (1 / (2 * Pi)) * ImageData[polar];
D2 = Mean[D1[[All, #]] & /@ LinhasAngulos];
O1 = Transpose[
  {Table[i1, {i1, qmin, qmax, (qmax - qmin) / (Length[D2] - 1)}], Reverse[D2]}];
{ListPlot[O1, PlotRange -> All], ListLogLogPlot[O1, PlotRange -> All]};

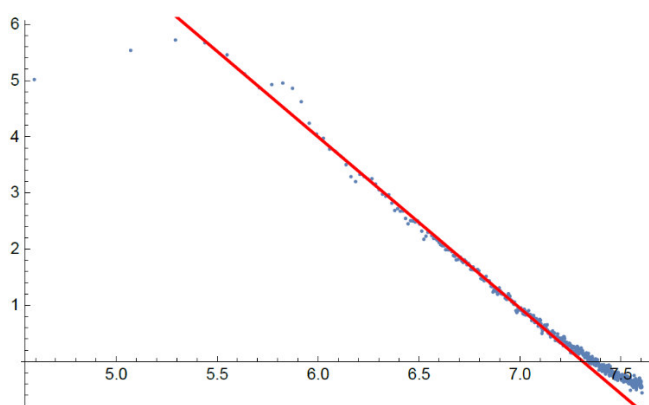
O2 = Log10[O1[[All, 1]]];
O3 = Log10[O1[[All, 2]]];
O1f1 = Transpose[{O2, O3}];
O1f2 = Take[O1f1, {1, Length[O1f1]}];
G1 = Fit[Take[O1f2, {5, Length[O1f2] - 300}], {1, x1}, x1]
b = Coefficient[G1, x1]
FD = SetAccuracy[(8 + b) / 2, 3]
```

```
Img9 = Show[ListPlot[O1f2, PlotRange -> All], Plot[G1, {x1, 4.6, 16}, PlotStyle -> Red]]
```

22.2772 – 3.04687 x1

–3.04687

2.48



## FAPS - Fractal Analysis from Power Spectrum

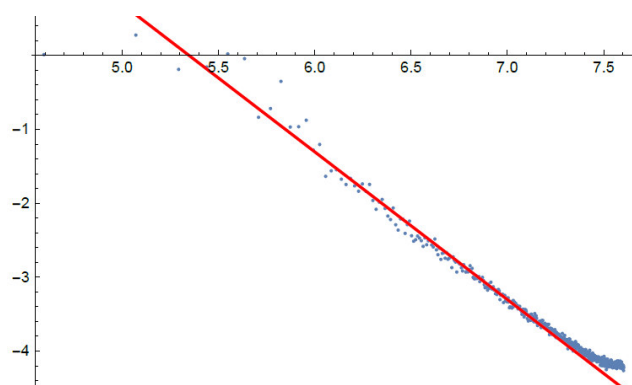
```

E1 = Mean[Map[PeriodogramArray, d4]];
Q1 = Transpose[{Table[i1, {i1, qmin, qmax, (qmax - qmin) / ((Length[E1] - 1) / 2)}],
  Take[E1, {1, 512}]}];
{ListPlot[Q1, PlotRange → All], ListLogLogPlot[Q1, PlotRange → All]};
Q2 = Log10[Q1[[All, 1]]];
Q3 = Log10[Q1[[All, 2]]];
Q1f1 = Transpose[{Q2, Q3}];
Q1f2 = Take[Q1f1, {1, Length[Q1f1]}];
H1 = Fit[Take[Q1f2, {6, Length[Q1f2] - 280}], {1, x1}, x1]
b = Coefficient[H1, x1]
FD = SetAccuracy[(7 + b) / 2, 3]
Img10 = Show[ListPlot[Q1f2, PlotRange → All], Plot[H1, {x1, 4.6, 16}, PlotStyle → Red]]
10.6923 - 1.99948 x1

```

-1.99948

2.50



## FARMS - Fractal Analysis by Root Mean Square

### Importando a imagem

```

diretorio = NotebookDirectory[];
NomeDaAmostra = "H_0,5_G";
Img = Import[FileNameJoin[{diretorio, StringJoin[NomeDaAmostra, ".tiff"}], "Image"];

```

### Cálculo para uma linha (perfil) da imagem

```

Img1 = Image[Img];
d1 = ImageData[Img1][[All, All, 1]];
d2 = d1[[256, All]];
{imagewidth, imagelength} = ImageDimensions[Img1];
Lmin = 3;
sizefactor1 = 3;
Lmax = imagewidth / sizefactor1;

```

```

p1[h_] := Partition[d2, h, 1]
d4 = Table[p1[h], {h, Lmin, Lmax}];
d5 = Map[Mean, d4, {2}];
rms1[e_] := (d4[[e]] - d5[[e]])
rms2 = Table[rms1[e], {e, 1, Length[d4], 1}];
rms3 = Map[RootMeanSquare, rms2, {2}];
sizemax = 80 * 10^(-6) / sizefactor1;
sizemin = (80 * 10^(-6) / (imagewidth)) * Lmin;
Gen1[a_, b_] := ConstantArray[(sizemax - a), b]
d6 =
  Table[Gen1[a, b], {a, 0, sizemax - sizemin, (sizemax - sizemin) / (Length[rms3] - 1)},
    {b, Length[rms3][[-1]]}, Length[Flatten[rms3][[1]]]};
MatrixForm[d6];
d7[c_] := Take[d6[[c, c]]]
d8 = Table[d7[c], {c, 1, Length[d6]}];

rms4 = Map[Mean, rms3, {1}];
d9 = Table[d, {d, sizemin, sizemax, (sizemax - sizemin) / (Length[rms4] - 1)}];
Plot21 = Transpose[
  {Flatten[d9], Flatten[rms4]}];
Grafico = ListLogLogPlot[Plot21, PlotRange -> All];

```

## Cálculo da média de perfis da imagem usando linhas e colunas

```

IntervaloLinhas = 16;
d1 = ImageData[Img1][[All, All, 1]];
ImageDimensions[Img][[1]];
LinhasAvaliadas =
  Cases[Table[x, {x, 0, ImageDimensions[Img][[1]], IntervaloLinhas}], Except[0]];
d2 = d1[#[, All] & /@ LinhasAvaliadas;
imagewidth = First[Length[#] & /@ d2];
Lmin = 3;
sizefactor1 = 3;
Lmax = imagewidth / sizefactor1;
p1[h_] := Partition[#, h, 1] & /@ d2
d4 = Transpose[Table[p1[h], {h, Lmin, Lmax}]];
d5 = Map[Mean, #, {2}] & /@ d4;
rms1[e_] := (d4[[e]] - d5[[e]])
rms2 = Table[rms1[e], {e, 1, Length[d4], 1}];
rms3 = Map[RootMeanSquare, #, {2}] & /@ rms2;
sizemax = 80 * 10^(-6) / sizefactor1;
sizemin = (80 * 10^(-6) / (imagewidth)) * Lmin;
Gen1[a_, b_] := ConstantArray[(sizemax - a), b]
d6 = Table[Gen1[a, b],
  {a, 0, sizemax - sizemin, (sizemax - sizemin) / (First[Length[#] & /@ rms3] - 1)},
  {b, First[Length[#[[-1]]] & /@ rms3], First[Length[Flatten[#[[1]]] & /@ rms3]}];
d7[c_] := Take[d6[[c, c]]]
d8 = Table[d7[c], {c, 1, Length[d6]}];

```

```

rms4 = Map[Mean, #, {1}] & /@ rms3;
d9 =
  Table[d, {d, sizemin, sizemax, (sizemax - sizemin) / (First[Length[#] & /@ rms4] - 1)}];
d10 = ConstantArray[d9, Length[d2]];
PontosdaLinha =
  Partition[Transpose[{Flatten[d10], Flatten[rms4]}], First[Length[#] & /@ rms3]];

PontosdaMediaLinhas = Mean[PontosdaLinha];
Grafico1 = ListLogLogPlot[PontosdaMediaLinhas, PlotRange -> All];

d1 = ImageData[Img1][[All, All, 1]];
ImageDimensions[Img][[1]];
LinhasAvaliadas =
  Cases[Table[x, {x, 0, ImageDimensions[Img][[1]], IntervaloLinhas}], Except[0]];
d2 = d1[[All, #]] & /@ LinhasAvaliadas;
imagewidth = First[Length[#] & /@ d2];

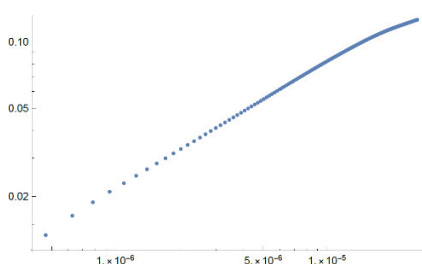
Lmax = imagewidth / sizefactor1;
p1[h_] := Partition[#, h, 1] & /@ d2
d4 = Transpose[Table[p1[h], {h, Lmin, Lmax}]];
d5 = Map[Mean, #, {2}] & /@ d4;
rms1[e_] := (d4[[e]] - d5[[e]])
rms2 = Table[rms1[e], {e, 1, Length[d4], 1}];
rms3 = Map[RootMeanSquare, #, {2}] & /@ rms2;
sizemax = 80 * 10^(-6) / sizefactor1;
sizemin = (80 * 10^(-6) / (imagewidth)) * Lmin;
Gen1[a_, b_] := ConstantArray[(sizemax - a), b]
d6 = Table[Gen1[a, b],
  {a, 0, sizemax - sizemin, (sizemax - sizemin) / (First[Length[#] & /@ rms3] - 1)},
  {b, First[Length[#][[-1]]] & /@ rms3, First[Length[Flatten[#][[1]]] & /@ rms3]}];

d7[c_] := Take[d6[[c, c]]]
d8 = Table[d7[c], {c, 1, Length[d6]}];
rms4 = Map[Mean, #, {1}] & /@ rms3;
d9 =
  Table[d, {d, sizemin, sizemax, (sizemax - sizemin) / (First[Length[#] & /@ rms4] - 1)}];
d10 = ConstantArray[d9, Length[d2]];
PontosdaLinha =
  Partition[Transpose[{Flatten[d10], Flatten[rms4]}], First[Length[#] & /@ rms3]];

PontosdaMediaColunas = Mean[PontosdaLinha];
Grafico2 = ListLogLogPlot[PontosdaMediaColunas, PlotRange -> All];

PontosdaMediaGeral = Mean[{PontosdaMediaLinhas, PontosdaMediaColunas}];
Grafico3 = ListLogLogPlot[PontosdaMediaGeral, PlotRange -> All]

```



## Plotagem da média de todas as imagens

```

diretorio = NotebookDirectory[];

NomeDaAmostra = "H_0,5_G";
primeiro = 1;
ultimo = 2;

amostras = ParallelTable[Import[
  FileNameJoin[{diretorio, StringJoin[NomeDaAmostra, ToString[numero1], ".xlsx"]}],
  "Data"], {numero1, primeiro, ultimo}];

MediadeTodas = Partition[Mean[Flatten@# & /@ amostras], 2];
Grafico = ListLogLogPlot[MediadeTodas, PlotRange -> All]

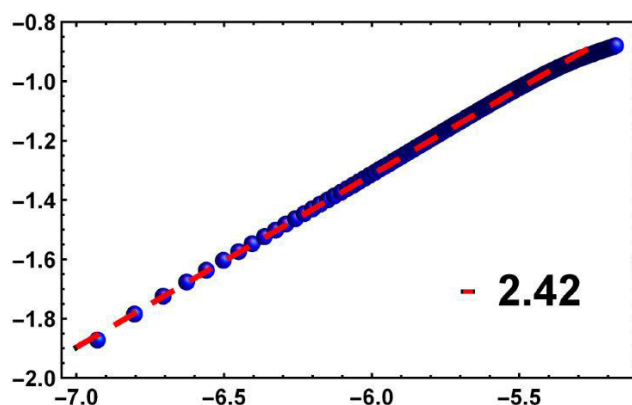
Plot1 = Log10[MediadeTodas[[All, 1]]];
Plot2 = 1 * Log10[MediadeTodas[[All, 2]]];
Plotf = Transpose[{Plot1, Plot2}];
Plotmedia = Take[Plotf, {1, Length[Plotf]}];

Fitmedia = Fit[Take[Plotmedia, {1, Length[Plotmedia] - 60}], {1, x1}, x1];
b1media = Coefficient[Fitmedia, x1];
FDmedia = SetAccuracy[(3 - b1media), 3];

BlueBall =
  Graphics3D[{Blue, Specularity[White, 20], Sphere[]}, Boxed -> False, ImageSize -> 15];

Grafico2 = Show[ListPlot[Plotmedia,
  PlotLabel -> Style["", Black, 20], PlotRange -> {{-7.05, -5.1}, {-2.0, -0.8}},
  PlotMarkers -> BlueBall], Plot[Fitmedia, {x1, -7, -5.25},
  PlotStyle -> {AbsoluteDashing[{15, 15 - 5}], Darker[Red, .01], Thickness[0.01]},
  PlotLegends -> Placed[LineLegend[{SetAccuracy[FDmedia, 3]},
    LabelStyle -> {25, Bold}, LegendMarkerSize -> 8], {0.8, 0.25}], Frame -> True,
  LabelStyle -> {{13, Black, Thickness[0.1], Bold}, {13, Black, Thickness[0.1], Bold}},
  FrameStyle -> {{Thickness[0.004], Black}, {Thickness[0.004], Black},
    {Thickness[0.004], Black}, {Thickness[0.004], Black}}]

```



## APÊNDICE C – ALGORITMOS PARA CÁLCULOS DAS IMAGENS DE CLSM

### CÁLCULO DAS ÁREAS

#### Importando grupo de amostras

```

diretorio = NotebookDirectory[];
Grupo = "95h50x";
Novodiretorio = FileNameJoin[{diretorio, "Binarizadas S.aureus", Grupo}];

LocaldasImagens = FileNames["*.tif", Novodiretorio];
NomesdasAmostras = FileNameTake[#, & /@ LocaldasImagens];
NumerodeAmostras = Length[NomesdasAmostras];
SequenciadeAmostras = Range[1, NumerodeAmostras];

imgBin = ImageResize[Import[FileNameJoin[{Novodiretorio, #}], "Image"], All] & /@
  NomesdasAmostras;

```

#### Cálculo da área de cada elemento, filtragem, área total ocupada e lista dos valores obtidos

```

m = MorphologicalComponents[#, & /@ imgBin];
mNumber = Union[Flatten[#, 1] & /@ m];
areas = ComponentMeasurements[#, "Area"] & /@ m;
data = MapThread[ReplaceAll, {mNumber, areas}];
areadata = ComponentMeasurements[#, "Area"][[All, 2]] & /@ m;
areaMin = Min[areadata];
fitNoise = # -> Which[# < (areaMin + 0.0001) * 20, 0, True, #] & /@ # & /@ areadata;
imgFit = MapThread[ReplaceAll, {data, fitNoise}];
areadataNew = Cases[#, Except[0]] & /@ imgFit;
estimates = # -> Which[# < 50, Blue, # < 120, Red, True, Green] & /@ # & /@ areadataNew;
{single, double, tripleMore, elementstotal, coveredarea} =
  {blue = Count[#[[All, 2]], Blue] & /@ estimates,
   red = Count[#[[All, 2]], Red] & /@ estimates,
   green = Count[#[[All, 2]], Green] & /@ estimates,
   blue + red + green, Total[#, 2] & /@ areadataNew};
NomesdasAmostras2 = FileBaseName[#, & /@ NomesdasAmostras];
Valores = Transpose[{single, double, tripleMore, elementstotal, coveredarea}];

```

#### Exportação dos valores das áreas totais ocupadas e lista dos valores para histogramas

```

Export[diretorio <> StringJoin["S.aureus/Valores/"], StringJoin[Grupo, "/"],
  StringJoin["Si", Grupo, NomesdasAmostras2[[#]], ".xlsx"]],
  Valores[[#]] & /@ SequenciadeAmostras;

Export[diretorio <> StringJoin["S.aureus/Valores Histogramas/"], StringJoin[Grupo, "/"],
  StringJoin["Hist", Grupo, NomesdasAmostras2[[#]], ".txt"]],
  areadataNew[[#]] & /@ SequenciadeAmostras;

```

## CÁLCULO DAS DISTÂNCIAS E QUANTIDADES POR FAIXAS

### Importando e binarizando imagens

```

diretorio = NotebookDirectory[];
Grupo = "95h50x";
Nomedamostra = "R";
primeiro = 1;
ultimo = 5;
TamanhoPixel = 0.16602957589285713` ;
AreaPixel = 0.027565820071162008` ;
amostra = ParallelTable [
  ImageResize[Import[FileNameJoin[{diretorio, StringJoin["Binarizadas S.aureus/",
    StringJoin[Grupo, "/"], Nomedamostra, ToString[numero1], ".tif"]}],
    "Image"], All], {numero1, primeiro, ultimo}];

```

### Gerando mapas de localização

```

areas3 = ComponentMeasurements[#, "Area"] & /@ amostra;
areaMin1 = Min[Values[#]] & /@ areas3;
m5 = Map[Which[# < ((0 + 0.0001) * 20), 0, True, #] &, Association[#] & /@ areas3, {2}];
areas4 = Normal[#] & /@ m5;
centroid1 = ComponentMeasurements[#, "Centroid"] [[All, 2]] * TamanhoPixel & /@ amostra;
m6 = MapThread[List, {centroid1[[#]], Values[areas4][[#]] * AreaPixel}, 1] & /@
  Range[1, Length@centroid1];

```

### Dividindo os elementos das imagens por faixas de tamanhos

```

rep1[a_] := Which[a[[2]] > 1.38, {{0, 0}, 0}, a[[2]] < 0.55, {{0, 0}, 0}, True, a];
rep2[b_] := Which[b[[2]] > 3.3, {{0, 0}, 0}, b[[2]] < 1.38, {{0, 0}, 0}, True, b];
rep3[c_] := Which[c[[2]] > 10, {{0, 0}, 0}, c[[2]] < 3.3, {{0, 0}, 0}, True, c];
rep4[d_] := Which[d[[2]] > 100, {{0, 0}, 0}, d[[2]] < 10, {{0, 0}, 0}, True, d];
rep5[e_] := Which[e[[2]] > 1000, {{0, 0}, 0}, e[[2]] < 100, {{0, 0}, 0}, True, e];
rep6[f_] := Which[f[[2]] > 5000, {{0, 0}, 0}, f[[2]] < 1000, {{0, 0}, 0}, True, f];
rep7[g_] := Which[g[[2]] < 5000, {{0, 0}, 0}, True, g];

n11 = Map[rep1, m6, {2}];
n1 = Cases[#, Except[{{0, 0}, 0}]] & /@ n11;
n21 = Map[rep2, m6, {2}];
n2 = Cases[#, Except[{{0, 0}, 0}]] & /@ n21;
n31 = Map[rep3, m6, {2}];
n3 = Cases[#, Except[{{0, 0}, 0}]] & /@ n31;
n41 = Map[rep4, m6, {2}];
n4 = Cases[#, Except[{{0, 0}, 0}]] & /@ n41;
n51 = Map[rep5, m6, {2}];
n5 = Cases[#, Except[{{0, 0}, 0}]] & /@ n51;
n61 = Map[rep6, m6, {2}];
n6 = Cases[#, Except[{{0, 0}, 0}]] & /@ n61;
n71 = Map[rep7, m6, {2}];
n7 = Cases[#, Except[{{0, 0}, 0}]] & /@ n71;

```



## Cálculo das distâncias entre vizinhos, médias e desvios padrões

```

Nearn1 =
  ParallelTable[(EuclideanDistance[#, Last@Nearest[n1[[num1]][[All, 1]], #, 2]]) & /@
    n1[[num1]][[All, 1]], {num1, 1, 5}];
Nearn2 =
  ParallelTable[(EuclideanDistance[#, Last@Nearest[n2[[num1]][[All, 1]], #, 2]]) & /@
    n2[[num1]][[All, 1]], {num1, 1, 5}];
Nearn3 =
  ParallelTable[(EuclideanDistance[#, Last@Nearest[n3[[num1]][[All, 1]], #, 2]]) & /@
    n3[[num1]][[All, 1]], {num1, 1, 5}];
Nearn4 =
  ParallelTable[(EuclideanDistance[#, Last@Nearest[n4[[num1]][[All, 1]], #, 2]]) & /@
    n4[[num1]][[All, 1]], {num1, 1, 5}];
Nearn5 =
  ParallelTable[(EuclideanDistance[#, Last@Nearest[n5[[num1]][[All, 1]], #, 2]]) & /@
    n5[[num1]][[All, 1]], {num1, 1, 5}];
Nearn6 =
  ParallelTable[(EuclideanDistance[#, Last@Nearest[n6[[num1]][[All, 1]], #, 2]]) & /@
    n6[[num1]][[All, 1]], {num1, 1, 5}];
Nearn7 =
  ParallelTable[(EuclideanDistance[#, Last@Nearest[n7[[num1]][[All, 1]], #, 2]]) & /@
    n7[[num1]][[All, 1]], {num1, 1, 5}];

Mediasn1 = Mean[Which[# == {}, {0}, True, #]] & /@ Nearn1;
Med1 = Mean[Cases[Mediasn1, Except[0]]];
STDn1 = StandardDeviation[Cases[Mediasn1, Except[0]]];
MedSTD1 = SetAccuracy[Text[Med1 ± STDn1], 3];

Mediasn2 = Mean[Which[# == {}, {0}, True, #]] & /@ Nearn2;
Med2 = Mean[Cases[Mediasn2, Except[0]]];
STDn2 = StandardDeviation[Cases[Mediasn2, Except[0]]];
MedSTD2 = SetAccuracy[Text[Med2 ± STDn2], 3];

Mediasn3 = Mean[Which[# == {}, {0}, True, #]] & /@ Nearn3;
Med3 = Mean[Cases[Mediasn3, Except[0]]];
STDn3 = StandardDeviation[Cases[Mediasn3, Except[0]]];
MedSTD3 = SetAccuracy[Text[Med3 ± STDn3], 3];

Mediasn4 = Mean[Which[# == {}, {0}, True, #]] & /@ Nearn4;
Med4 = Mean[Cases[Mediasn4, Except[0]]];
STDn4 = StandardDeviation[Cases[Mediasn4, Except[0]]];
MedSTD4 = SetAccuracy[Text[Med4 ± STDn4], 3];

Mediasn5 = Mean[Which[# == {}, {0}, True, #]] & /@ Nearn5;
Med5 = Mean[Cases[Mediasn5, Except[0]]];
STDn5 = StandardDeviation[Cases[Mediasn5, Except[0]]];
MedSTD5 = SetAccuracy[Text[Med5 ± STDn5], 3];

Mediasn6 = Mean[Which[# == {}, {0}, True, #]] & /@ Nearn6;
Med6 = Mean[Cases[Mediasn6, Except[0]]];
STDn6 = StandardDeviation[Cases[Mediasn6, Except[0]]];
MedSTD6 = SetAccuracy[Text[Med6 ± STDn6], 3];

```

```

Mediasn7 = Mean[Which[# == {}, {0}, True, #] & /@Nearn7;
Med7 = Mean[Cases[Mediasn7, Except[0]]];
STDn7 = StandardDeviation[Cases[Mediasn7, Except[0]]];
MedSTD7 = SetAccuracy[Text[Med7 ± STDn7], 3];

```

## Plotagem todas juntas

```

aa = Max[centroid1];
{Faixa1, Faixa2, Faixa3, Faixa4, Faixa5, Faixa6, Faixa7} =
ListPlot[Flatten[#, 1][[All, 1]], AspectRatio → 1, PlotRange → {{0, aa}, {0, aa}},
PlotStyle → Darker[Green, 1], PlotMarkers → {Automatic, 2},
Frame → {True, True},
FrameStyle → {{Thickness[0.003], Black, 12, Bold}, {Thickness[0.003], Black,
12, Bold}, {Thickness[0.003], Black, 0}, {Thickness[0.003], Black, 0}},
ImageSize → Small] & /@ {n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7}
{TotalFaixa1, TotalFaixa2, TotalFaixa3, TotalFaixa4, TotalFaixa5,
TotalFaixa6, TotalFaixa7} =
Total@Table[Length[#] & /@ {n1[[num2]], n2[[num2]], n3[[num2]], n4[[num2]],
n5[[num2]], n6[[num2]], n7[[num2]]}, {num2, 1, 5}];

```

```

PainelIndividual3 = Rasterize[Grid[{
{Rotate[Style[TotalFaixa1, Bold, 18, Red], Pi/2],
Faixa1, Rotate[Style[MedSTD1, Bold, 18, Blue], Pi/2]},
{Rotate[Style[TotalFaixa2, Bold, 18, Red], Pi/2], Faixa2,
Rotate[Style[MedSTD2, Bold, 18, Blue], Pi/2]},
{Rotate[Style[TotalFaixa3, Bold, 18, Red], Pi/2], Faixa3,
Rotate[Style[MedSTD3, Bold, 18, Blue], Pi/2]},
{Rotate[Style[TotalFaixa4, Bold, 18, Red], Pi/2], Faixa4,
Rotate[Style[MedSTD4, Bold, 18, Blue], Pi/2]},
{Rotate[Style[TotalFaixa5, Bold, 18, Red], Pi/2], Faixa5,
Rotate[Style[MedSTD5, Bold, 18, Blue], Pi/2]},
{Rotate[Style[TotalFaixa6, Bold, 18, Red], Pi/2], Faixa6,
Rotate[Style[MedSTD6, Bold, 18, Blue], Pi/2]},
{Rotate[Style[TotalFaixa7, Bold, 18, Red], Pi/2], Faixa7,
Rotate[Style["-", Bold, 18, Blue], Pi/2]}},
ItemSize → Automatic, BaselinePosition → Top, Frame → False,
Alignment → Left, FrameStyle → {Thickness[2], Black}], ImageSize → 750,
RasterSize → 1000]

```

## APÊNDICE D – ALGORITMOS PARA PROCESSAMENTO DOS STACKS DOS BIOFILMES

### Importando, filtrando e binarizando os *stackings*

```
ClearAll["Global`*"]

diretorio = NotebookDirectory[];
NomedaAmostra = "R5";
Novodiretorio = FileNameJoin[{diretorio, NomedaAmostra}];

LocaldasImagens = FileNames["*.tif", Novodiretorio, 1];
NomesdasAmostras = FileNameTake[#] & /@ LocaldasImagens;
NumerodeAmostras = Length[NomesdasAmostras];
SequenciadeAmostras = Range[1, NumerodeAmostras];

Imagens = ImageTrim[Import[#, "Image"], {{1, 1}, {2048, 2048}}] & /@ LocaldasImagens;
listaOriginal = GaussianFilter[#, 3] & /@ Imagens;
imagBinarizada = Binarize[#, 0.001] & /@ listaOriginal;
```

### Seleção dos *stackings*

```
DadosdaImagem = ImageData[#] & /@ imagBinarizada;
Totais = Total[Flatten[#]] & /@ DadosdaImagem;
Porcentagens = N[(Total[Flatten[#]] & /@ DadosdaImagem * 100) / Max[Totais]];
SeleçãoPorcentagens = Which[# < 0.17, 0, True, #] & /@ Porcentagens;
Posição = Position[SeleçãoPorcentagens, 0];
PosiçãoSeleção = Delete[Range[1, Length@Totais], Posição];
ImagensSelecionadas = imagBinarizada[[#]] & /@ PosiçãoSeleção;
DadosSelecionados = ImageData[imagBinarizada[[#]]] & /@ PosiçãoSeleção;
```

### Cálculo dos primeiros e últimos elementos diferentes de zero

```
lista = listaOriginal[[#]] & /@ PosiçãoSeleção;
DadosdasImagens = ImageData[#] & /@ lista;
DadosdasImagensBin = ImageData[#] & /@ ImagensSelecionadas;
EixoVertical = Transpose[Flatten[#] & /@ DadosdasImagens];
EixoVertical2 = Transpose[Flatten[#] & /@ DadosdasImagensBin];
EixoNormalizados =
  EixoVertical[[#]] / Max[EixoVertical[[#]]] & /@ Range[1, Length@EixoVertical];
EixosEmEscala = EixoNormalizados[[#]] + Reverse@Range[1, Length@lista] & /@
  Range[1, Length@EixoNormalizados];
EixosEmEscala2 = EixosEmEscala * EixoVertical2;
PrimeirosElementos = First@Cases[#, Except[0.]] & /@ EixosEmEscala2;
DadosdaImagemFinalSN = PrimeirosElementos /. {First[{}]} → 0;
UltimosElementos = Last@Cases[#, Except[0.]] & /@ EixosEmEscala2;
DadosdaImagemFinal2SN = UltimosElementos /. {Last[{}]} → 0;
```

```

UltimosElementos2 = (IntegerPart[DadosdaImagemFinal2SN[ [#]]] + 1) -
  (DadosdaImagemFinal2SN[ [#]] - IntegerPart[DadosdaImagemFinal2SN[ [#]]) & /@
  Range[1, Length@UltimosElementos];
EspessurasSN = DadosdaImagemFinalSN[ [#]] - UltimosElementos2[ [#]] & /@
  Range[1, Length@UltimosElementos];
Max@DadosdaImagemFinalSN;
Passo = 1;
dZ = 1.6;
Nplanos = Length@PosiçãoSeleção;
TR = Nplanos * Passo - dZ;
DadosdaImagemFinal = (DadosdaImagemFinalSN / Max@DadosdaImagemFinalSN) * TR;

```

## Cálculo dos parâmetros da superfície

```

Ra = SetAccuracy[Total[Abs[DadosdaImagemFinal - Mean[DadosdaImagemFinal]]] /
  (Length@DadosdaImagemFinal), 4];
Rq = SetAccuracy[N[StandardDeviation@DadosdaImagemFinal], 4];
Rsk = SetAccuracy[Total[(DadosdaImagemFinal - Mean[DadosdaImagemFinal])^3] /
  (Length@DadosdaImagemFinal * Rq^3), 4];
Rk = SetAccuracy[Total[(DadosdaImagemFinal - Mean[DadosdaImagemFinal])^4] /
  (Length@DadosdaImagemFinal * Rq^4), 4];
Parâmetros = {Ra, Rq, Rsk, Rk};

```

## Cálculo da espessura média e volume

```

TamanhoPixel = 169.96 / 2048;
areadopixel = TamanhoPixel^2;
Espessuras = (EspessurasSN / Max@DadosdaImagemFinalSN) * TR;
EspessuraMedia = SetAccuracy[Mean@Espessuras, 4];
VolumeBiofilme = SetAccuracy[Total@Espessuras * areadopixel, 2];
DadosdoVolume = {EspessuraMedia, VolumeBiofilme}

```

## Imagens do Biofilme

```

ImagemFinal1 =
  ArrayPlot[Partition[DadosdaImagemFinal, Sqrt@Length@DadosdaImagemFinal],
    ColorFunction -> "AvocadoColors", FrameTicks -> {{True, None}, {True, None}},
    FrameStyle -> {{Thickness[0.003], Black, 12, Bold},
      {Thickness[0.003], Black, 12, Bold}, {Thickness[0.003], Black, 0},
      {Thickness[0.003], Black, 0}}, DataRange -> {{0, 170}, {0, 170}}];

DadosImagem = Partition[DadosdaImagemFinal, Sqrt@Length@DadosdaImagemFinal] /
  Max@Flatten@DadosdaImagemFinal;

ImagemFinal2 = Image[DadosImagem];

```

## Imagens do Biofilme em 3D

```
DadosImagem2 = GaussianFilter[DadosImagem[[1 ;; 2048, 1 ;; 2048]], 5];
```

```
DadosImagem3 = Reverse[#] & /@DadosImagem2;
```

```
ImagemFinal3D = ListPlot3D[DadosImagem3, Mesh → None, ColorFunction → "AvocadoColors",  
  Filling → Bottom, FillingStyle → {Opacity[0.5], Green},  
  BoxRatios → {1, 1, .08}, Boxed → Bottom, PlotLabel → Style["", Black, 15],  
  Axes → {True, True, False}, AxesLabel → {"x (μm)", "y (μm)", "z (μm)"},  
  LabelStyle → {10, Black, Thickness[0.1], Bold},  
  DataRange → {{0, 170}, {0, 170}, Automatic}];
```