



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS  
NATURAIS**

**VICTOR TEIXEIRA NORONHA**

**REVESTIMENTOS DE PRATA SOBRE SUPERFÍCIES SILANIZADAS:  
AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA QUÍMICA E ADESÃO BACTERIANA**

**FORTALEZA, CEARÁ**

**2017**

VICTOR TEIXEIRA NORONHA

REVESTIMENTOS DE PRATA SOBRE SUPERFÍCIES SILANIZADAS: AVALIAÇÃO DE  
RESISTÊNCIA QUÍMICA E ADESÃO BACTERIANA

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.  
Coorientador: Prof. Dr. Antonio Gomes Souza Filho.

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)

---

- N769r Noronha, Victor Teixeira.  
Revestimentos de prata sobre superfícies silanizadas: avaliação de resistência química e adesão bacteriana / Victor Teixeira Noronha. – 2017.  
99 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula.  
Coorientação: Prof. Dr. Antonio Gomes Souza Filho.
1. Nano-rugosidade. 2. Silanização. 3. Nanopartículas de prata. 4. Microscopia Confocal. 5. Processamento de imagens. I. Título.

CDD 660.6

---

VICTOR TEIXEIRA NORONHA

REVESTIMENTOS DE PRATA SOBRE SUPERFÍCIES SILANIZADAS: AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA QUÍMICA E ADESÃO BACTERIANA

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Recursos Naturais. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 16 / 02 / 2017.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Prof. Dr. Odair Pastor Ferreira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

À minha Tia Ilnar (*in memoriam*) por todo  
apoio e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Amauri, pela oportunidade de aprendizado, amizade e orientação científica durante esta etapa.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Odair Ferreira, Prof. Alexandre Paschoal, Prof. Antonio Gomes e Prof. Pierre Fachine pela disponibilidade e pela colaboração.

Aos professores Odair, Gomes e Amauri por terem me possibilitado fazer parte de um ambiente de pesquisa de tanta amizade e cooperatividade.

Ao colega de grupo e amigo Diassis, pela imensa colaboração na realização deste trabalho.

À toda equipe do LaMFA (Camila, Pamella, Roberta Laiz, Laís, Janaína, Fabrícia, Thaiz, Leila, César) e SolBIn (Romana, Viviane, Yasmine, Diassis, Naiara, Cecília, Marcella, Luísa) pela amizade e cooperatividade.

À equipe do Grupo de Química de Materiais Avançados (GQMAT) da UFC, em especial a Afrânio e Prof. Pierre, que realizaram as sínteses das nanopartículas de prata utilizadas neste trabalho.

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

À equipe do Laboratório de Investigação de Osteoartropatias da UFC pelo suporte e colaboração na realização dos ensaios microbiológicos, em especial a Anelise e Prof. Airton.

À equipe da Central Analítica da UFC pelo auxílio e pelos ensinamentos, em especial ao Emílio e à Rosa.

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 Biotecnologia de Recursos Naturais pela oportunidade de aprendizado, em especial ao Renato, secretário do programa, por todo o auxílio.

À minha família, pelo apoio incondicional.

À Funcap, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado.

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

## SÚMULA CURRICULAR

### **Dados pessoais:**

Nome: Victor Teixeira Noronha

E-mail: [victor.tn99@gmail.com](mailto:victor.tn99@gmail.com)

### **Formação acadêmica:**

Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais (Fevereiro/2015 – Fevereiro/2017)

Área: Biotecnologia

Local: Laboratório de Materiais Funcionais Avançados (LAMFA)/ Grupo de Interfaces

Sólido-Biológicas (SolBIN), Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará (UFC),

Fortaleza, Ceará, Brasil.

*Título da dissertação: Revestimentos de prata sobre superfícies silanizadas: avaliação de resistência química e adesão bacteriana.*

Orientador: Prof. Dr. Amauri Jardim de Paula

Bacharelado em Biotecnologia (Fevereiro/2010 – Janeiro/2015)

Local: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brasil.

Graduação-Sanduíche em Bioengenharia (Setembro/2012 – Agosto/2013)

Local: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP), Universidade do Porto, Porto, Portugal.

### **Produção bibliográfica:**

#### **Artigos científicos:**

1. SOUSA, FRANCISCO ; NORONHA, VICTOR ; MACHADO, TEREZINHA ; SILVEIRA, JOSÉ ; CUNHA, FRANCISCO ; FECHINE, PIERRE ; PAULA, AMAURI .

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 (Impresso)*, v. 00, p. 1-11, 2016.



2. COSTA, LUAN F.R. ; DA SILVA, EDUARDO S. ; NORONHA, VICTOR T. ; VAZ-MOREIRA, IVONE ; NUNES, OLGA C. ; ANDRADE, MARCELINO M. DE .

Development of an automatic identification algorithm for antibiogram analysis. *Computers in Biology and Medicine*, v. 67, p. 104-115, 2015.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.” Carl Sagan.

## RESUMO

No presente trabalho, diferentes tipos de superfície foram desenvolvidas, utilizando silício como base. Através de corrosão anisotrópica com KOH, superfícies com distintas rugosidades puderam ser obtidas. Superfícies com valor de rugosidade média de cerca de 7 nm resultaram em maior adesão e crescimento de *Staphylococcus aureus*. Esses resultados foram obtidos com a análise de crescimento *in situ*, utilizando microscopia confocal por varredura à laser (LSCM). A análise das propriedades dos recobrimentos foi desempenhada em escala milimétrica através de imageamento em campo amplo, sendo utilizado algoritmos computacionais para processamento dos dados. Após essa constatação, revestimento de AgNPs foram produzidos a partir da utilização de nanopartículas com quatro diferentes tipos de estabilização e superfícies com diferentes agentes funcionalizantes, com a intenção de gerar superfícies antimicrobianas. O tipo de agente estabilizante empregado nas nanopartículas de prata demonstrou não influenciar na distribuição e formação dos aglomerados de partículas na superfície. Por outro lado, a presença de filme multicamadas de amino-organossilano de cerca de 80 nm de espessura na superfície resultou em um aumento significativo na quantidade relativa de nanopartículas, além de conferir notável estabilidade do recobrimento em meio líquido de alta força iônica. Funcionalizações com outros tipos de silano (fenilsilano e metilfosfonatosilano) não promoveram a adsorção de AgNPs nem estabilidade química, em escala similar ao aminossilano.

**Palavras-chave:** Nano-rugosidade; Silanização; Nanopartículas de prata; Biofilme; *Staphylococcus aureus*; Imageamento em campo amplo; Microscopia confocal; Processamento de imagens.

## ABSTRACT

In the present work, different types of surfaces were developed, using silicon as substrate. By KOH anisotropic etching, surfaces with different roughness could be obtained. Surfaces with roughness values averaging about 7 nm have resulted in increased adhesion and growth of *S. aureus* on solid surfaces. Results were obtained through *in situ* growth analysis by laser scanning confocal microscopy (LSCM). Properties analysis of silver nanoparticle coatings was performed at millimeter scale through large-field imaging by using computational algorithms for data processing. After this, AgNPs coatings were produced from nanoparticles with 4 different types of capping agents, and surfaces with different functionalizing agents. The type of stabilizing capping agent employed on silver nanoparticles did not influence on distribution and formation of particle agglomerates on the surface. On the other hand, the presence of 80 nm thick-multilayered amino-organosilane film on the surface have resulted on a significant increase in the relative amount of nanoparticles, beyond conferring remarkable stability under liquid media of high ionic strength. Functionalizations with other silanes (phenylsilane and methylphosphonatesilane) did not promote AgNPs adsorption, or chemical stability, in a similar scale to the aminosilane.

**Keywords:** Nanoroughness; Silanization; Silver nanoparticles; Biofilm; *Staphylococcus aureus*; Large-field imaging; Confocal microscopy; Image processing.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de formação de biofilme.....	20
Figura 2 - Energia total de interação entre a célula bacteriana e a superfície, em função da força iônica.....	26
Figura 3 - Resumo dos fenômenos que afetam a dissolução das AgNPs.....	30
Figura 4 - Condensação de um alcóxissilano em uma superfície óxido-metálica.....	32
Figura 5 - Arranjo reacional para corrosão anisotrópica.....	36
Figura 6 - Etapas para corrosão anisotrópica.....	36
Figura 7 - Estrutura química dos organossilanos.....	37
Figura 8 - Exemplo de medida realizada para ângulo de contato.....	41
Figura 9 - Espectros de absorção e emissão de fluorescência para os fluoróforos utilizados nos ensaios de microscopia confocal.....	47
Figura 10 - Etapas do algoritmo de processamento de imagens de EDS.....	48
Figura 11 - Micrografias obtidas por AFM. (a) Substrato de SiO <sub>2</sub> /Si raw; (b) e (c) Si atacado a 60°C por 15 min; (d) Si atacado a 70°C por 15 min; (e) e (f) Si atacado a 70°C por 60 min...	53
Figura 12 - Número de bactérias aderidas em função do tempo para superfícies com diferentes rugosidades.....	53
Figura 13 - Mapas elementares de EDS para substratos funcionalizados com organossilanos.....	58
Figura 14 - Extrato fúngico utilizado para síntese (primeira coluna) e espectros de absorção UV-Vis das AgNPs biogênicas formadas no extrato fúngico depois de 168 horas de síntese (segunda coluna).....	62
Figura 15 - Histogramas dos tamanhos das AgNPs medidas para mais de 200 partículas em imagens de MEV.....	64
Figura 16 - Micrografias obtidas por MEV das AgNPs e distribuição de tamanho das nanopartículas determinadas por DLS (última coluna).....	65
Figura 17 - Espectros cumulativos de raios x para recobrimentos de AgNPs (esquerda) em substratos de SiO <sub>2</sub> /Si e respectivos mapas elementares associados (direita).....	66
Figura 18 - Comparação entre micrografias de campo amplo do substrato de silício completo (5 x 5 mm) obtidas por elétrons secundários (esquerda) e por raios X (direita).....	68
Figura 19 - (a) Mapas elementares utilizados na análise quantitativa dos recobrimentos formados nos substratos brutos; (b) quantidades relativas de Ag na área total do substrato; (c) distribuição de tamanho dos aglomerados de AgNPs na superfície.....	69
Figura 20 - Micrografias eletrônicas das seções transversais dos recobrimentos de AgNPs formados nos substratos de SiO <sub>2</sub> /Si.....	70
Figura 21 - Espectro fotoeletrônico de raios X para o substrato de Si coberto com uma camada de SiO <sub>2</sub> (<5nm).....	71
Figura 22 - (a) e (b) Micrografias eletrônicas de transmissão das Ag-Glutinis (c) Micrografia obtida por MEV (elétrons secundários) de um aglomerado de Ag-Glutinis. (d) Mapa elementar do carbono obtido por EDS das Ag-Glutinis.....	73
Figura 23 - Espectros cumulativos de raios X para recobrimentos de Ag-Glutinis (após lavagem em PBS) em diferentes superfícies (esquerda) e respectivos mapas elementares associados (direita).....	74
Figura 24 - Micrografia da amostra Si - APTMS em alta magnificação mostrando o filme de silano e o recobrimento de Ag-Glutinis formado. Barra de escala representa 10 µm.....	76
Figura 25 - Número de moles de Azul Reativo 19 (ou Remazol Brilliant Blue R) adsorvido em substratos de Si a diferentes pHs.....	76
Figura 26 - Micrografias eletrônicas de varredura de cortes transversais dos recobrimentos de Ag-Glutinis.....	77
Figura 27 - Número de moles de Azul de Metileno adsorvida em substratos de Si a diferentes	

pHs. ....	78
Figura 28 - Espectros fotoeletrônicos de raios X do substrato bruto de SiO <sub>2</sub> /Si (Si) e SiO <sub>2</sub> /Si atacado (Si-ETC). ....	80
Figura 29 - Espectros fotoeletrônicos de raios X dos substratos funcionalizados com silanos e recobertos com Ag-Glutinis, antes (primeira coluna) e após (segunda coluna) a imersão em PBS. ....	81
Figura 30 - (a) Exemplos de mapas elementares utilizados nas análises quantitativas. (b) Quantidade relativa de Ag em diferentes amostras (c) Distribuição de tamanho dos aglomerados de Ag-Glutinis na superfície. ....	83
Figura 31 - Micrografias obtidas por LSCM. S. aureus aderidas em (a) Si, (b) Si negative, (c) Si GS, (d) Si GC, (e) Si RM, (f) Si RG e (g) Si APTMS RG em 24 h de contato. ....	88
Figura 32 - Número de bactérias (S. aureus) mortas e vivas aderidas aos substratos de Si após 24 horas de incubação. ....	89
Figura 33 - Razão entre bactérias vivas e bactérias mortas aderidas aos substratos de Si em 24 horas de incubação. ....	89

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores que influenciam a adesão bacteriana e colonização de superfícies.....	22
Tabela 2 - Recobrimentos com AgNPs (geradas por extrato R. glutinis). ....	40
Tabela 3 - Parâmetros de rugosidade para amostras com diferentes topografias .....	52
Tabela 4 - Resumo dos trabalhos de avaliação de adesão microbiana em escala nanométrica. .....	56
Tabela 5 - Medidas de ângulos de contato para água deionizada em diferentes amostras. ....	60
Tabela 6 - Características físico-químicas das AgNPs.....	64
Tabela 7 - Resumo dos trabalhos de imobilização de AgNPs em superfícies com grupos NH <sub>2</sub> /NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> . ....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNPs	Nanopartículas de Prata
Ag-Glu-Citrate	Amostra com AgNPs reduzidas por glicose e estabilizadas por citrato sobre substrato de SiO <sub>2</sub> /Si
Ag-Glu-SDS	Amostra com AgNPs reduzidas por glicose e estabilizadas por dodecil sulfato em substrato sobre SiO <sub>2</sub> /Si
Ag-Glutinis	Amostra com AgNPs produzidas por extrato de <i>R. glutinis</i> em substrato de SiO <sub>2</sub> /Si
Ag-Mucilaginososa	Amostra com AgNPs produzidas por extrato de <i>R. mucilaginososa</i> sobre substrato de SiO <sub>2</sub> /Si
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
APTMS	3-aminopropiltrietóxisilano
au	Unidades de airy ( <i>Airy unit</i> )
bio-AgNPs	Nanopartículas de prata biogênicas
BHI	Infusão de cérebro e coração
BSE	Elétrons retro-espalhados
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva de raios X
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ICP	Espectrometria de plasma indutivamente acoplado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MGYP	Extrato de malte-Glicose-Extrato de levedura-Peptona
PBS	Tampão fosfato salino
PVP	Polivinilpirrolidona
R <sub>a</sub>	Rugosidade média aritmética
rcf	Força centrífuga relativa
R <sub>g</sub>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
R <sub>m</sub>	<i>Rhodotorula mucilaginososa</i>
RMS ou R <sub>q</sub>	Rugosidade média quadrática
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SE	Elétrons secundários



Si ( <i>raw</i> )	Substrato de SiO <sub>2</sub> /Si apenas limpo, sem qualquer modificação
Si-APTMS	Substrato de SiO <sub>2</sub> /Si atacado e funcionalizado com APTMS
Si-ETC	Substrato de SiO <sub>2</sub> /Si atacado (60 °C, 15 min)
Si APTMS Rg	Amostra com AgNPs produzidas por extrato de <i>R. glutinis</i> em substrato Si-APTMS (utilizado em ensaio biológico)
Si GC	Amostra com AgNPs reduzidas por glicose e estabilizadas por citrato sobre substrato de SiO <sub>2</sub> /Si (utilizado em ensaio biológico)
Si Rg	Amostra com AgNPs produzidas por extrato de <i>R. glutinis</i> em substrato de SiO <sub>2</sub> /Si (utilizado em ensaio biológico)
Si Rm	Amostra com AgNPs produzidas por extrato de <i>R. mucilaginoso</i> sobre substrato de SiO <sub>2</sub> /Si (utilizado em ensaio biológico)
Si-THSPMP	Substrato de SiO <sub>2</sub> /Si atacado e funcionalizado com THSPMP
Si-TMPS	Substrato de SiO <sub>2</sub> /Si atacado e funcionalizado com TMPS
SDS	Dodecil sulfato de sódio
THSPMP	3-(Trihidróxisilil)propil metilfosfonato
TMPS	Trimetóxiifenilsilano
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons por raios X

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 Biofilme .....	18
1.2 Adesão microbiana: teoria e fatores que a influenciam.....	21
1.3 Prata como antimicrobiano .....	27
1.4 Silanização .....	31
2 OBJETIVOS .....	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.1 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1 Materiais .....	35
3.2 Corrosão anisotrópica do silício com KOH 1M .....	35
3.3 Silanização dos substratos de silício .....	36
3.4 Síntese de nanopartículas.....	37
3.4.1 Síntese das AgNPs biogênicas a partir de leveduras .....	37
3.4.2 Síntese das AgNPs a partir de glicose .....	38
3.5 Recobrimentos superficiais com nanopartículas de prata e imersão em tampão fosfato salino .....	39
3.6 Caracterização das nanopartículas .....	40
3.7 Caracterização das superfícies com diferentes topografias e funcionalizações.....	40
3.7.1 Microscopia de força atômica (AFM) .....	40
3.7.2 Avaliação de ângulos de contato .....	41
3.7.3 Imageamento de raios X em campo amplo.....	41
3.7.4 Espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS).....	42
3.7.5 Avaliação de adsorção de corantes por espectrofotometria .....	43
3.8 Incubação com suspensão bacteriana .....	43
3.8.1 Avaliação de influência da topografia na adesão bacteriana.....	43
3.8.2 Avaliação de influência do recobrimento com AgNPs na adesão bacteriana .....	44
3.9 Análise por Microscopia Confocal por varredura a laser em campo amplo (LF-CLSM) .....	45
3.10 Processamento de imagens .....	47
3.10.1 Mapas elementares obtidos por EDS.....	47
3.10.2 Micrografias obtidas por LF-CLSM.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
4.1 Caracterização das superfícies de silício .....	51
4.1.1 Superfícies de silício com diferentes topografias.....	51
4.1.2 Superfícies funcionalizadas com organossilanos .....	57
4.2 Caracterização das AgNPs.....	60
4.3 Caracterização dos recobrimentos de AgNPs .....	65
4.3.1 Caracterização dos recobrimentos de AgNPs em superfícies de silício bruto (Si raw) .....	65
4.3.2 Caracterização dos recobrimentos de AgNPs (Ag-Glutinis) em superfícies de silício funcionalizado com organossilanos .....	71
4.3.3 Análise do crescimento microbiano em diferentes superfícies por LF-CLSM.....	83
5 CONCLUSÕES .....	90
6 PERSPECTIVAS .....	92
REFERÊNCIAS .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

O Grupo de pesquisa SolBIn tem como proposta estudar os múltiplos aspectos e fenômenos manifestados na interface entre sólidos e componentes biológicos, empregando sempre uma ótica multidisciplinar. Dentro desse paradigma, de grande relevância para a comunidade científica, as seguintes questões são atualmente exploradas pelo grupo: (i) o modo de adesão e crescimento de células em superfícies sólidas; (ii) a obtenção de colóides e recobrimentos superficiais de nanopartículas inorgânicas que resultem em bio-efeitos potencializados; (iii) interações manifestadas por nanopartículas em fluidos biológicos; (iv) a organização e a ação de nanopartículas em sistemas biológicos em amplas escalas de comprimento. Nesse contexto, o presente Trabalho buscou contribuir para a produção de superfícies estáveis com diferentes características (seja rugosidade, ambiente microquímico ou presença de agentes antimicrobianos), a fim de investigar o processo de adesão bacteriana.

### 1.1 Biofilme

Biofilme pode ser definido como um aglomerado de células microbianas que está irreversivelmente associado (não sendo removido por enxágue brando) com uma superfície e inclusa em uma matriz primordialmente composta de polissacarídeos. Materiais não-celulares como minerais, partículas de corrosão, partículas de argila e lama ou componentes do sangue podem estar presentes no biofilme, dependendo do meio em que este filme se desenvolve. Esses biofilmes podem formar-se nos mais variados tipos de superfícies, como em tecidos vivos, dispositivos médicos permanentes, sistemas de encanamento de água ou sistemas aquáticos naturais (Donlan, 2002).

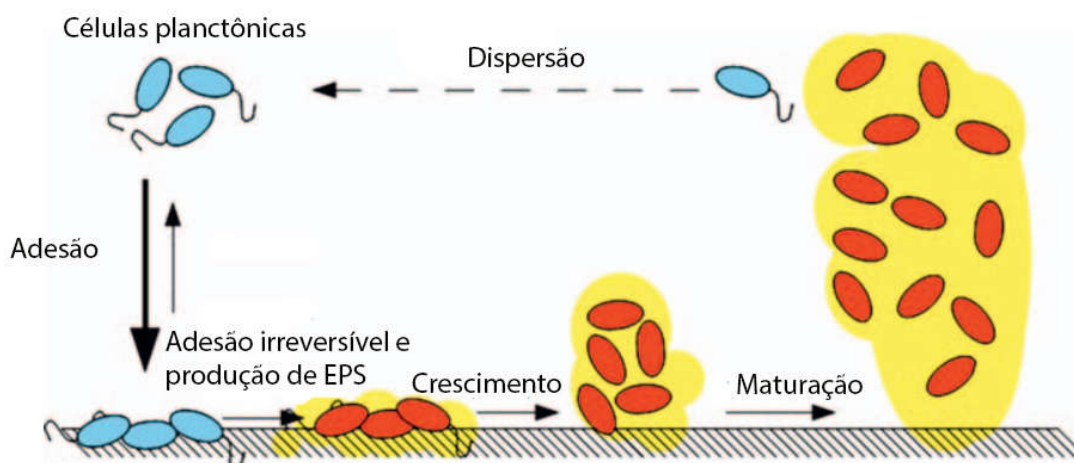
Ecologicamente, os biofilmes representam o nicho preferido onde quase todas as bactérias vivem. O mecanismo evolutivo tornou essa forma de crescimento, como uma comunidade séssil aderente, mais vantajosa que a forma planctônica dispersa. Dentre as inúmeras vantagens que a formação de biofilme pode conferir para as bactérias estão: proteção de antibióticos, desinfetantes, estresses mecanoquímicos ou físicos e ambientes dinâmicos. A comunicação intercelular dentro de um biofilme pode rapidamente estimular ou desestimular a regulação da expressão gênica, permitindo adaptações temporais como variações fenotípicas e a habilidade de sobreviver em condições de déficit nutricional. Cerca de 99% da população bacteriana mundial pode ser encontrada na forma de biofilme em vários estágios de crescimento (Garrett, Bhakoo e Zhang, 2008; Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013).

A adesão bacteriana em superfícies abióticas ocorre em duas etapas: primeiramente, a adesão primária acontece e, em seguida, uma fase de ancoragem (**Figura 1**). Alguns autores incluem ainda uma etapa de condicionamento da superfície anterior a adesão primária. Nessa etapa, moléculas orgânicas (principalmente proteínas e polissacarídeos) e inorgânicas ligariam-se à superfície, seja por força gravitacional ou por movimento do fluido, modificando sua energia superficial e aumentando as possibilidades de colonização bacteriana. Na fase de adesão primária, o primeiro contato entre uma superfície condicionada e os microrganismos acontece. Esse processo é reversível e os microrganismos podem ser removidos da superfície por forças de cisalhamento, antes que uma adesão mais forte ocorra. Muitas forças físicas exercem um papel neste processo de adsorção como o movimento Browniano, forças de atração de van der Waals, interações hidrofóbicas, carga eletrostática e forças gravitacionais. Depois que esta adesão ocorre, o movimento haptotático das bactérias é guiado por fatores químicos de ligação a superfície como aminoácidos, açúcares e oligopeptídeos. A fase de ancoragem, então, começa pela ligação molecular entre adesinas bacterianas e a superfície. Microrganismos que estão frouxamente ligados podem fortalecer sua adesão pela produção de exopolissacarídeos, que são capazes de interagir com a superfície do material, ou por ligantes específicos a receptores localizados no pili, fimbrias e fibrilas (Donlan, 2002; Garrett, Bhakoo e Zhang, 2008; Helbig *et al.*, 2016; Mebert *et al.*, 2016).

Depois que esse processo ocorre, os microrganismos estão irreversivelmente ligados a superfície, a menos que alguma intervenção física ou química ocorra. A densidade e complexidade do biofilme aumentam à medida que organismos ligados à superfície replicam-se ativamente. Este crescimento do biofilme produz 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. Depois de uma fase *lag* inicial, um rápido incremento na população é observado. Excreção de polissacarídeos intercelulares de adesão e a presença de cátions divalentes interagem para formar ligações mais fortes entre as células. Nesta etapa, a expressão gênica diferencial dos organismos bacterianos em forma sésil (em relação a expressão da forma planctônica) é essencial para garantir as necessidades adesivas da população, consolidando a estrutura do biofilme. Na fase estacionária de crescimento, as taxas de divisão e morte celular se igualam. Em altas concentrações celulares, uma série de mecanismos de sinalização são desencadeados no biofilme (*quorum sensing*). Depois da maturação do biofilme, tem-se a fase de dispersão. Esta etapa pode acontecer por soltura de células filhas provenientes de células em crescimento ativo, desprendimento como resultado de níveis nutricionais ou *quorum sensing* ou pode ocorrer em virtude de cisalhamento

dos agregados do biofilme pelo fluido. Enzimas produzidas pelo biofilme catalisam a quebra dos polissacarídeos que unem o filme, liberando bactérias para colonização de outros substratos. Ao mesmo tempo, *operons* codantes para proteínas de flagelo são promovidos, para que os organismos tenham o aparato para motilidade, e genes codantes para porinas, proteínas presentes para a forma de crescimento sésil, têm sua expressão reprimida, completando o ciclo genético para adesão e coesão do biofilme (Donlan, 2002; Garrett, Bhakoo e Zhang, 2008; Katsikogianni e Missirlis, 2004; Mebert *et al.*, 2016).

**Figura 1** - Processo de formação de biofilme



Fonte: Adaptado de Mebert et al (2016).

A estrutura de um biofilme é composta basicamente por células bacterianas e substâncias poliméricas extracelulares (EPS). As EPS compõem de 50 a 90% do total de carbono orgânico do biofilme e pode ser considerado o material matricial primário de um biofilme. Estas matrizes podem variar em propriedades químicas e físicas, mas, em geral, é constituída primariamente por polissacarídeos. As EPS associam-se a cátions divalentes como cálcio e magnésio, contribuindo para o estabelecimento de ligações cruzadas entre cadeias poliméricas, o que reforça a coesão de um biofilme desenvolvido. Além disso, esta matriz possui alta capacidade de hidratação, uma vez que pode incorporar grandes montantes de água em sua estrutura por interações de hidrogênio, prevenindo a desidratação de biofilmes e dificultando a difusão de antibióticos através do filme, por exemplo. Embora cada comunidade microbiana apresente natureza única, algumas características estruturais universais podem ser atribuídas aos biofilmes. Essas comunidades de natureza heterogênea são compostas por

microcolônias de células bacterianas encapsuladas por uma matriz de EPS e separadas das outras microcolônias por vazios intersticiais (canais de água) (Donlan, 2002).

A formação de biofilmes causa prejuízos em diversos setores. No campo da medicina e odontologia, biofilmes podem ser observados em quase todos os tipos de aparatos médicos, como cateteres e implantes, sendo causa de periodontite e infecções crônicas. Em relação à área industrial, contaminações causadas por microrganismos patogênicos durante o processo de manufatura, processamento e embalagem de alimentos e remédios têm grande importância para a saúde pública. O metabolismo microbiano também é capaz de promover a corrosão em superfícies metálicas, como aquelas presentes no maquinário industrial. Além disso, o biofilme representa uma barreira para o transporte de massa e energia, o que resulta em diminuição de capacidade produtiva e aumenta os gastos energéticos. A remoção do biofilme resulta em altos custos de limpeza e manutenção para diversos tipos de indústrias, como marítima, de laticínios, alimentos, sistemas de água, petróleo, papel, óptica, odontológica e hospitais (Garrett, Bhakoo e Zhang, 2008; Hori e Matsumoto, 2010; Mebert *et al.*, 2016; Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013).

A proposição de estratégias para reduzir ou eliminar a formação de biofilmes têm sido encorajada recentemente, muito em virtude da significativa resistência dos biofilmes aos antibióticos convencionais. Estas estratégias baseiam-se em: (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 capacidade de inibir a formação de biofilmes podem ser alcançados tanto pela modificação da superfície do material (conferindo propriedades anti-adesivas, por exemplo) como pela incorporação de agentes biocidas. Grandes esforços têm sido realizados com o objetivo de “engenheirar” superfícies que possam impedir os primeiros estágios de adesão. (Mebert *et al.*, 2016; Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013).

## **1.2 Adesão microbiana: teoria e fatores que a influenciam**

A adesão primária desempenha um papel chave na formação do biofilme microbiano e é influenciada por diferentes fatores em relação à superfície (porosidade, energia livre de superfície, carga eletrostática superficial, hidrofobicidade/hidrofilicidade, topografia (micro e nano-rugosidade), aos microrganismos (presença de apêndices extracelulares, expressão de adesinas, comunicação célula-célula, substâncias poliméricas extracelulares, energia livre de superfície, potencial zeta, forma do microrganismo) e ao meio (força iônica, pH,

disponibilidade de nutrientes, tensão superficial, temperatura, hidrodinâmica, presença de macromoléculas) (Campoccia, Montanaro e Arciola, 2013; Mebert *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015). Um resumo é apresentado na **Tabela 1**.

**Tabela 1** - Fatores que influenciam a adesão bacteriana e colonização de superfícies

Superfície	Porosidade Energia livre de superfície Carga eletrostática Hidrofobicidade/hidrofobicidade Topografia, microrrugosidade, nanorugosidade
Microrganismos	Apêndices extracelulares Expressão de adesinas Comunicação célula-célula Substâncias poliméricas extracelulares Forma do microrganismo Energia livre de superfície Potencial zeta
Condições do meio	Força iônica pH Disponibilidade de nutrientes Tensão superficial Hidrodinâmica Presença de macromoléculas

A influência da energia superficial dos materiais na adesão bacteriana tem sido extensivamente estudada. Superfícies mais hidrofóbicas, com valores entre 20-30 mJ/m<sup>2</sup>, foram relatados na literatura como valores ótimos de energia superficial para inibição de incrustações de microrganismos. Entretanto, diversos autores encontraram resultados opostos: superfícies hidrofílicas apresentando menor tendência para formação de biofilmes do que superfícies mais hidrofóbicas. A redução observada nesses casos pode ser devido ao fato de que estes tipos de superfícies adsorvem menor quantidade de proteínas. As características superficiais dos

microrganismos também têm grande influência neste processo (Mebert *et al.*, 2016).

Além das superfícies convencionais, algumas pesquisas recentes mostram que superfícies superhidrofóbicas e superhidrofílicas 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 (Mebert *et al.*, 2016; Song, Koo e Ren, 2015).

A maioria das células bacterianas possui superfície negativamente carregada (em virtude da presença de fosfatos, carboxilatos, etc.). Dessa forma, uma superfície positivamente carregada é geralmente mais susceptível à adesão bacteriana do que uma superfície negativamente carregada. Entretanto, apenas a carga superficial do material pode não ser suficiente para deter a adesão de bactérias em sistemas estáticos, uma vez que células mortas podem aderir-se e facilitar a adesão de outras bactérias. Bactérias também podem ser capazes de modificar a carga da superfície do substrato, facilitando a adesão por meio de interações eletrostáticas atrativas (Mebert *et al.*, 2016; Song, Koo e Ren, 2015).

A influência da rugosidade das superfícies na adesão bacteriana e formação de biofilmes têm sido estudados desde o início dos anos 80. A nanotecnologia proporcionou técnicas de fabricação com melhores resoluções para o controle de superfícies com nanorugosidade. Estas técnicas incluem corrosão íon-reativa, corrosão química, oxidação anódica e recobrimentos com polímeros. Com o advento destas técnicas, foi possível averiguar o papel da rugosidade com maior acuidade. Sabe-se que superfícies com rugosidade média ( $R_a$ ) menor que  $0,8 \mu\text{m}$  são tipicamente consideradas como 'higiênicas', enquanto aquelas com rugosidade maior que este valor são mais susceptíveis à adesão bacteriana. A maior área superficial das superfícies mais rugosas e a presença de depressões cria sítios favoráveis para colonização nesse tipo de superfície, protegendo também os microrganismos de tensões de cisalhamento. Outros autores, entretanto, consideram que a influência da rugosidade no processo de colonização é negligenciável, mantendo controvérsias no papel da rugosidade (Mebert *et al.*, 2016).

O polimento de superfícies pode reduzir a formação de biofilmes. A rugosidade ( $R_a$ ) de  $0,2 \mu\text{m}$  foi descrita como limiar para máxima redução da adesão bacteriana em superfícies de implantes dentários, por exemplo. Entretanto, os efeitos exatos da rugosidade na adesão bacteriana e formação de biofilme podem variar bastante dependendo do tamanho e formato das bactérias, bem como das condições do microambiente (Song, Koo e Ren, 2015). Autores encontraram uma relação direta entre a rugosidade média superficial ( $R_a$ ) e a adesão de bactérias



marinhas. Outros trabalhos constataram que a diminuição no padrão topográfico resultou em um aumento do número de bactérias aderidas (Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013). Alguns trabalhos mostraram que a adesão de bactérias em superfícies com rugosidade em nível nanométrico acontece em um maior grau do que em superfícies planares ou com rugosidade em escala micrométrica, resultando inclusive em mudanças notáveis na atividade metabólica celular. Outros grupos, entretanto, relataram atividade contra incrustação de microrganismos das superfícies com rugosidade em nanoescala (Graham e Cady, 2014; Mebert *et al.*, 2016).

Em superfícies nanoestruturadas com padrões regulares, muitos padrões topográficos diferentes nas escalas micrométrica e nanométrica, com variadas formas e tamanhos, mostraram capacidade de inibir a formação de biofilmes quando comparados ao mesmo material sob a forma de superfícies planas. Tamanho, espaçamento e forma dos padrões topográficos presentes na superfície têm influência significativa na adesão celular. Verificou-se também que pode haver uma relação de 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. A área de contato célula-substrato nas estruturas com tamanho próximo a dimensão da célula é maximizada, resultando em alta retenção celular nestas estruturas. Além disso, essas estruturas fornecem proteção das perturbações externas e facilitam a intercomunicação celular. De forma oposta, topografias com estruturas menores que o tamanho de uma célula bacteriana restringem área de contato entre célula e substrato, resultando em uma redução da retenção celular. Para topografias com estruturas maiores que o tamanho celular, a retenção depende da morfologia da célula. (Graham *et al.*, 2013; Helbig *et al.*, 2016; Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013; Song, Koo e Ren, 2015).

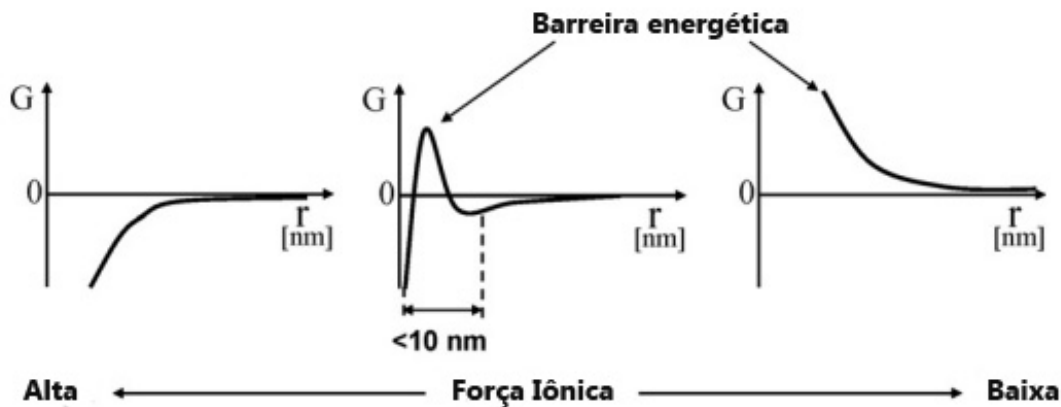
Embora diversos estudos tenham tentado estabelecer uma correlação direta entre nanotopografia e adesão bacteriana, uma explicação definitiva ainda não foi alcançada. Caracterizações físico-químicas e topográficas mais detalhadas das superfícies (através de diversas técnicas complementares), análises sistemáticas com maior validade estatística e abordagens experimentais que possibilitem a investigação dos eventos de interação biológica devem ser adereçadas para conclusões mais precisas acerca do tema. O entendimento de como as bactérias sentem e reagem a diferentes superfícies e elementos presentes é necessário para elaboração de superfícies que apresentem propriedades anti-adesivas para bactérias (Crawford *et al.*, 2012; Hasan, Crawford e Ivanova, 2013; Mebert *et al.*, 2016; Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013).

Tendo em vista a importância e complexidade deste processo de adesão, abordagens físico-químicas são utilizadas para tentar entendê-lo melhor. Em virtude de seu tamanho

próximo ao de partículas em suspensão coloidais (0,5 a 2  $\mu\text{m}$ ), modelos físico-químicos para avaliação de interações entre partículas de natureza coloidal e superfícies têm sido empregados. Três abordagens teóricas têm sido utilizadas: teoria DLVO, abordagem termodinâmica e teoria DLVO estendida (Hori e Matsumoto, 2010; Katsikogianni e Missirlis, 2004).

De acordo com a teoria DLVO, a interação total entre uma superfície e uma partícula ( $V_{\text{TOT}}$ ) é a soma de suas interações de van der Waals ( $V_A$ ), geralmente atrativas, e Coulômbicas ( $V_R$ ), geralmente repulsivas. Uma vez que as forças atrativas de van der Waals são dominantes nas vizinhanças de uma superfície, as partículas não podem ser separadas por movimentos Brownianos, aderindo de forma irreversível. De forma oposta, em distâncias mais longas da superfície, as interações Coulômbicas passam a dominar e as forças de van der Waals decaem rapidamente 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 (**Figura 2**). De forma oposta, em altas forças iônicas essa barreira energética desaparece e as bactérias alcançam a adesão irreversível de forma rápida e fácil. Esta teoria explicaria a relação entre a diminuição da força iônica e a diminuição da adesão encontrada por alguns pesquisadores, além dos baixos níveis de adesão para superfícies negativamente carregadas. Entretanto, não há descrição das várias interações moleculares que viriam à tona quando polímeros presentes na superfície bacteriana entram em contato com grupos moleculares ou filmes condicionantes presentes no substrato. Além disso, não são levados em conta estruturas e moléculas na superfície bacteriana que afetam a distância célula-superfície, o tipo exato de interação, a rugosidade do substrato ou o fato da correlação entre a carga superficial e a adesão não ser tão direta, uma vez que o efeito da carga é mais importante para adesão de células hidrofílicas do que hidrofóbicas (Hori e Matsumoto, 2010; Katsikogianni e Missirlis, 2004).

**Figura 2** - Energia total de interação entre a célula bacteriana e a superfície, em função da força iônica.



Fonte: Adaptado de Hori e Matsumoto (2010).

A abordagem termodinâmica baseia-se nas energias livres de superfícies que interagem, cujo cálculo é feito pela equação abaixo:

$$\Delta G_{adh} = \gamma_{bs} - \gamma_{bl} - \gamma_{sl} \quad (\text{equação 1})$$

Onde  $\gamma_{bs}$ ,  $\gamma_{bl}$ ,  $\gamma_{sl}$ , são as energias livres das interfaces bactéria-sólido, bactéria-líquido, sólido-líquido, respectivamente. Adesão bacteriana é favorecida quando o valor para a energia livre de Gibbs de adesão é negativa. Essa abordagem leva em conta vários tipos de interações atrativas e repulsivas (van der Waals, eletrostáticas e dipolo), expressando-as coletivamente e resultando em energia livre. Entretanto, a abordagem termodinâmica assume que o processo é reversível, o que não é o caso. Esta abordagem depende ainda da formação de uma nova interface microrganismo-substrato, do contrário, não é aplicável. Outra questão é quanto da célula entra efetivamente em contato com o substrato. A abordagem termodinâmica é um modelo de equilíbrio que não permite uma interpretação cinética. Além disso, a teoria termodinâmica aplica-se somente a sistemas fechados e bactérias são organismos termodinamicamente abertos e fora do equilíbrio. Outro ponto é que a obtenção de valores precisos para energias livre de superfícies é geralmente difícil, uma vez que as superfícies bacterianas possuem química de hidratação complexa *in vivo*. Por outro lado, esta abordagem ajuda a explicar uma recorrente observação: bactérias com superfície hidrofóbica preferem materiais com superfícies hidrofóbicas e, bactérias com superfície hidrofílica preferem materiais com superfícies hidrofílicas (Hori e Matsumoto, 2010; Katsikogianni e Missirlis, 2004; Zhang *et al.*, 2015).

Na teoria DLVO estendida, as contribuições das interações atrativas hidrofóbicas e efeitos de hidratação repulsivos são incluídas através do componente  $\Delta G^{AB}$ , que se relacionam com as interações ácido-base. Então, a energia total de adesão pode ser expressa como:

$$\Delta G^{adh} = \Delta G^{vdW} + \Delta G^{dl} + \Delta G^{AB} \quad (\text{equação 2})$$

Onde  $\Delta G^{vdW}$  relaciona-se às interações de van de Waals e  $\Delta G^{dl}$  às interações da dupla camada elétrica. As interações introduzidas pelo último termo são de 10 a 100 vezes mais fortes que as interações de van der Waals de superfícies em contato direto, tornando as predições de resultados de teste de adsorção melhores que aquelas feitas com a teoria DLVO clássica (Hori e Matsumoto, 2010; Katsikogianni e Missirlis, 2004).

### 1.3 Prata como antimicrobiano

A emergência de cepas bacterianas com resistência a antibióticos tem causado a preocupação de agências de saúde mundiais. Em assembleia de maio de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu o combate a resistência a antibióticos como alta prioridade, elaborando um plano de ação global para combatê-la. Dentre os objetivos presentes neste plano, encontram-se a otimização do uso de medicamentos antimicrobianos, bem como o desenvolvimento de novas formas para contra-atacar essa resistência (“WHO Antibiotic Resistance”, 2016). Sistemas que contêm prata, sobretudo nanopartículas de prata, têm grande potencial para preencher este papel, como classe de sistemas antimicrobianos (Ouay, Le e Stellacci, 2015)

É sabido que íons de prata e nanopartículas possuem uma longa história de uso. Sua utilização no tratamento de feridas data do século XVII, quando era empregada no tratamento de úlceras. Esse nanomaterial com importante atividade antibacteriana foi regulamentado pelo FDA para tratamento de feridas nos anos 20, entretanto, maiores investigações acerca da ação antibacteriana das nanopartículas de prata apareceram apenas em 2004, tendo crescimento exponencial desde então. Em virtude da sua efetividade contra uma amplo espectro de micróbios e parasitas, da baixa toxicidade sistêmica para humanos e sua disponibilidade, os sistemas com prata em escala nanométrica apresentam-se como escolhas interessantes para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos (Durán *et al.*, 2015; Ouay, Le e Stellacci, 2015).

A eficácia da ação deste antimicrobiano está diretamente relacionada a dois fatores: (i)

o comportamento do antimicrobiano no ambiente de interesse e (ii) a forma que as espécies que contém prata interagem com as bactérias e desencadeiam a morte celular. Vários trabalhos presentes na literatura preocuparam-se em tentar esclarecer a forma de ação das AgNPs no processo de desinfecção, entretanto o modo exato de sua ação ainda não é totalmente conhecido (Ouay, Le e Stellacci, 2015).

Em virtude da observação da acumulação e agregação das AgNPs na membrana bacteriana, acarretando diminuição da integridade celular da membrana e morte bacteriana, muitos pesquisadores atribuíram a capacidade de ação antimicrobiano ao núcleo (*core*) de  $Ag^0$ . Entretanto, verificou-se que partículas com diferentes tamanhos eram capazes de exercer a mesma ação, o que evidenciaria que o mecanismo de ação deve ser baseada pelo menos parcialmente em uma espécie secundária. De fato, vários estudos observaram que células expostas a AgNPs apresentaram um alto nível de estresse oxidativo, sugerindo que a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um mecanismo primário no papel citotóxico das AgNPs (Ouay, Le e Stellacci, 2015).

Outras observações, entretanto, conferem o papel principal às espécies  $Ag^+$ . Íons  $Ag^+$ , liberados das nanopartículas através de dissolução oxidativa, exercem efetivamente a ação antibacteriana, enquanto a nanopartícula atua como um reservatório dessas espécies. Uma vez que possuem alta afinidade por aminas orgânicas, fosfatos e mais notavelmente por tióis (formando uma ligação com características covalentes, com energia de ligação de cerca de 65 kcal/mol), os íons prata têm papel chave nesta ação. Dessa forma, espécies  $Ag^+$  podem causar a inativação de sistemas biológicos através da aglutinação irreversível de moléculas como DNA, peptídeos ou cofatores. Ao contrário dos antibióticos, a ação dos íons  $Ag^+$  não possui seletividade: eles irão adsorver em qualquer parte que possuam grande afinidade, sendo improvável então que uma única via específica seja responsável pela morte celular. Acredita-se que a ação das AgNPs contra um amplo espectro de microrganismos seja em virtude dessa capacidade de agir em uma grande variedade de vias. Testes em que a presença de atividade antimicrobiana dependeria exclusivamente deste processo de dissolução oxidativa puderam ratificar esse mecanismo.

Outros autores consideram a geração de EROs como modo de ação antibacteriana das AgNPs. Entretanto, em virtude da confirmação de atividade antibacteriana mesmo em condições onde EROs não podem ser geradas (ambiente anaeróbico e no escuro), essa hipótese é desfavorecida. Devido à sua alta afinidade com tióis e selenóis, os íons  $Ag^+$  devem interagir com as enzimas redutases ou com a glutatona, rompendo o sistema de regulação de EROs, resultando no aumento da concentração intracelular destas espécies. Embora todo o mecanismo

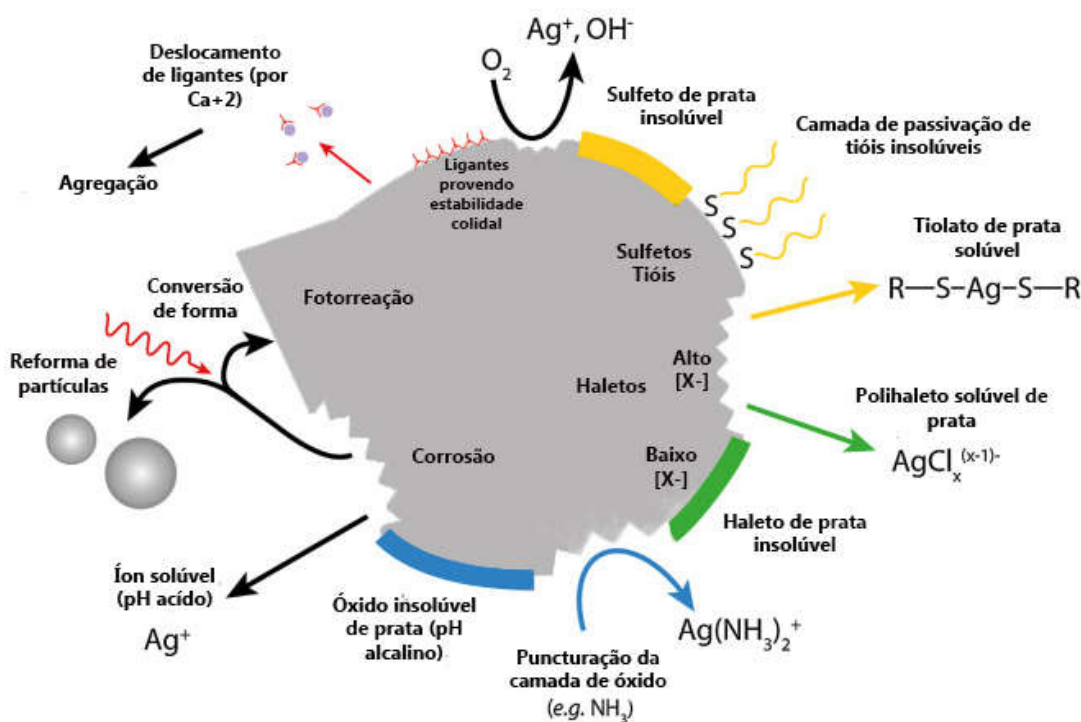
de ação proposto relacione a atividade do íon  $\text{Ag}^+$ , a presença da nanopartícula confere vantagens que melhoram a potência do sistema. Ao atuar como um reservatório dos íons, as nanopartículas proveem alta concentração de espécies antibacterianas nas redondezas de forma contínua, mantendo a atividade por períodos maiores. Além disso, uma nanopartícula que esteja imobilizada próximo a uma bactéria (ou até mesmo aderida em sua membrana celular) pode liberar milhares de íons em suas vizinhanças, produzindo uma alta concentração local destes (Ouay, Le e Stellacci, 2015).

AgNPs são sistemas complexos e sua atividade é dependente de diversos processos. As reações que acontecem na superfície da partícula têm vital importância para explicar seu comportamento, ação, destino e atividade antibacteriana. Em virtude da necessidade de dissolução para atividade antibacteriana da nanopartícula (através da liberação de íons  $\text{Ag}^+$ ), o tamanho e forma das partículas podem influenciar em sua ação. Para nanopartículas de formato esférico ou *quasi*-esférico, as menores apresentaram maior atividade, uma vez que a superfície destas partículas menores é mais ativa, tornando-as mais propensas a dissolução, quando comparadas às partículas maiores.

O processo de dissolução oxidativa das AgNPs envolve a reação de  $\text{O}_2$  na superfície da partícula, seguida pela formação de uma camada de  $\text{AgO}_x(\text{OH})_y$ . Esta camada de óxido, que abrange uma ou duas camadas atômicas de Ag, causa passivação da superfície e sua dissolução é necessária para permitir a oxidação do núcleo de  $\text{Ag}^0$ . Em pHs levemente ácidos, a solubilidade desta camada é aumentada, permitindo maior liberação de  $\text{Ag}^+$  e potencializando a atividade antibacteriana. A presença de moléculas de amônia ou de aminas primárias ou secundárias pode contribuir para o processo de dissolução da camada de óxido, caso elas estejam em sua forma desprotonada. A presença de outros ânions em solução pode resultar na formação de outro tipo de material em volta das AgNPs, mudando sua reatividade. Isto pode resultar em uma passivação mais forte, ou em diminuição da estabilidade coloidal, impactando fortemente a atividade antibacteriana. Sulfetos e haletos são ânions que causam grande interferência na camada de passivação. Precipitações de sais de prata na superfície ou em solução é um fenômeno que deve ser levado em conta, assim como a potencial passivação que envolve. Além da passivação, fenômenos de agregação também podem afetar a atividade antibacteriana das nanopartículas. A agregação é resultado da coalescência de diversas nanopartículas, resultando em um objeto maior com menor área de superfície exposta e, conseqüentemente, com menor atividade. AgNPs são frequentemente preparadas com a utilização de ligantes como citrato e polivinilpirrolidona (PVP) para estabilização. Estes compostos não se ligam de forma tão forte à superfície de Ag, de modo que podem ser

facilmente deslocados por ligantes moleculares (aminas, fosfinas, tióis, etc) ou aniônicos (óxidos, haletos, sulfetos, etc). Estes ligantes geralmente proveem menor estabilidade coloidal para as partículas, acarretando em agregação. A presença de cátions bivalentes em solução também podem causar agregação de AgNPs estabilizadas com citrato, uma vez que estes íons são capazes de quelar o citrato, removendo estes estabilizantes das nanopartículas, resultando em agregação. Os fenômenos físico-químicos que podem afetar a dissolução das AgNPs estão representados na **Figura 3** (Ouay, Le e Stellacci, 2015).

**Figura 3** - Resumo dos fenômenos que afetam a dissolução das AgNPs.



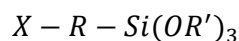
Fonte: Adaptado de Le Ouay e Stelacci (2015).

Superfícies bactericidas à base de prata podem ser preparadas através do dopamento, recobrimento, utilização de polímeros contendo prata, AgNPs ou filmes finos contendo prata (Hasan, Crawford e Ivanova, 2013). A fabricação de recobrimentos com prata pode ser feita através do aprisionamento de cátions  $\text{Ag}^+$  em matrizes poliméricas funcionalizadas, seguida pela redução através da utilização de agentes redutores convencionais. Este tipo de abordagem *in situ* melhora a dispersão das AgNPs, através das cadeias macromoleculares de polímeros e evita os fenômenos de agregação. As propriedades físico-químicas das cadeias poliméricas determinam, então, a distribuição de tamanho e forma das nanopartículas. Polímeros sintéticos

como poliuretano, poli(metil metacrilato) e materiais baseados em poliéster, bem como biopolímeros (polietileno glicol, gelatina, celulose funcionalizada, alginato) foram empregados com sucesso na elaboração de matrizes para abrigar AgNPs (Gallo *et al.*, 2016; Mebert *et al.*, 2016; Rizzello *et al.*, 2011). Outra forma de gerar recobrimento de prata envolve a modificação de superfícies sólidas a fim de se criar ambientes microquímicos favoráveis ao ‘ancoramento’ das AgNPs. Nesse contexto, o processo de silanização oferece ótimas perspectivas.

#### 1.4 Silanização

Compostos monoméricos de silício são nomeados silanos. Silanos que contenham uma ligação carbono-silício (Si-C) em sua estrutura são conhecidos como organossilanos. A estrutura de molécula de organossilanos, apresentada abaixo, compreende três elementos-chave:



X: porção orgânica. Essa fração orgânica não-hidrolizável pode ser reativa com outros químicos (ex.: amino, epóxi, vinil, metacrilato, enxofre) ou não reativa (ex.: alquil);

R: um espaçador, que pode ser uma cadeia aril ou alquil (tipicamente propil);

OR': um grupo hidrolisável, como um grupo álcool (ex.: metóxi, etóxi, isopropóxi) ou um grupo acetóxi que pode reagir com várias formas de grupos hidroxil presentes no substrato, liberando álcoois (metanol, etanol, propanol) ou ácido (ácido acético), realizando a ligação com substratos orgânicos e inorgânicos (Materne, Buyl, de e Witucki, 2012).

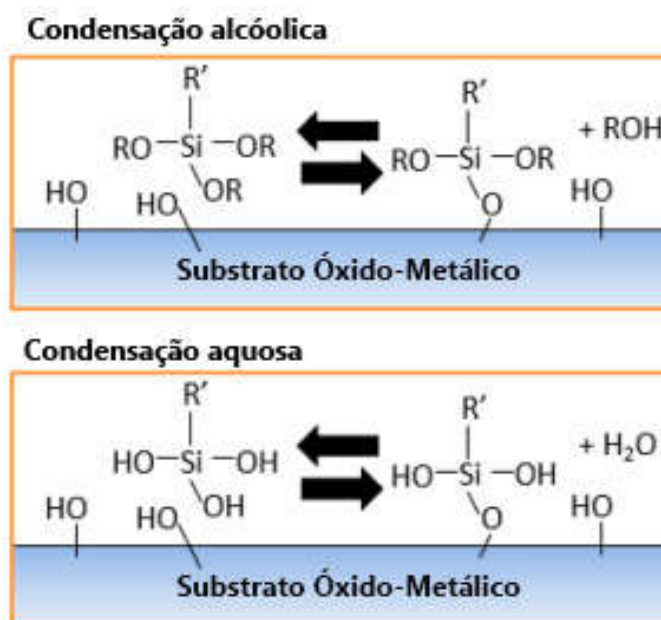
Em virtude de sua reatividade, os organossilanos servem como ponte entre substratos inorgânicos ou orgânicos e matrizes poliméricas orgânicas, contribuindo para uma substancial melhoria da adesão entre as partes. Silanos são comumente utilizados como agentes de ligação (acoplando polímeros orgânicos a materiais inorgânicos), promotores de adesão (promovem adesão em tintas, pinturas, recobrimentos, adesivos e selantes), agente dispersante, agente de reticulação (Materne, Buyl, de e Witucki, 2012).

O processo de silanização é bem estabelecido e ocorre em quatro passos: no primeiro passo ocorre a fisissorção. Nesta etapa, as moléculas de silano são fisissorvidas na superfície do substrato hidratado. No segundo passo, os grupos hidrolisáveis Si-(OR')<sub>3</sub> (ou *head-groups*) aproximam-se do substrato e se hidrolisam na presença da água adsorvida na superfície, gerando um grupo silanotriol altamente polar Si(OH)<sub>3</sub>. Na terceira etapa, os grupos polares Si(OH)<sub>3</sub> formam ligações covalentes com os grupos silanol (Si-OH, no caso dos substratos de



silício) na superfície do substrato (condensação) e com grupos silanol das moléculas vizinhas, criando uma rede de polissiloxano na superfície do substrato. Em condições anidras (i.e. sem a presença de água), a hidrólise antes da condensação não ocorre, e a silanização ocorrerá através de condensação alcóolica (**Figura 4**). Durante o período inicial, poucas moléculas quimissorvem sobre a superfície do substrato. Nessa fase a monocamada encontra-se em um estado desordenado (ou líquido) sobre a superfície. Para períodos mais longos, a cobertura da superfície eventualmente atinge um ponto em que uma monocamada compacta e bem ordenada é obtida (passo 4) (Chauhan *et al.*, 2008; Deetz, Ngo e Faller, 2016).

**Figura 4** - Condensação de um alcóossilano em uma superfície óxido-metálica.



Fonte: Adaptado de Deetz, Ngo e Faller (2016).

Visando diminuir o risco de exposição desnecessária às AgNPs, preparações em que as partículas se encontrem firmemente imobilizadas em superfície apropriada são preferíveis. O objetivo, neste caso, seria impedir a colonização e formação de biofilme através de uma atividade biocida de contato. Além de aumentar a estabilidade das AgNPs através da imobilização, prevenindo agregações e oxidações e prolongando o efeito antimicrobiano (Lv *et al.*, 2010), essa forma reduziria também o montante de biocida necessário para o efeito antibacteriano (Taglietti *et al.*, 2014). Para este fim, diversos estudos na literatura apresentam a funcionalização química de superfícies sólidas para uma maior eficiência do recobrimento. A maioria das abordagens baseia-se em interações eletrostáticas entre a superfície e as nanopartículas para potencialização da adesão e da estabilidade do filme formado. Neste

contexto, a adesão de AgNPs em filmes de organossilanos se apresenta como uma estratégia interessante na obtenção destas superfícies (Lv *et al.*, 2009; Morrill *et al.*, 2009; Sidorov *et al.*, 2012). Embora diversos trabalhos explorem a utilização deste tipo de recobrimento, sua caracterização é limitada a pequenas escalas (nanômetros a microns), sendo comumente realizadas através de técnicas de imageamento como microscopia eletrônica em alta magnificação (Durán *et al.*, 2007; Eby, Luckarift e Johnson, 2009; Enders *et al.*, 2006; Faria, de *et al.*, 2014; Geng *et al.*, 2012; Huo *et al.*, 2006; Jo *et al.*, 2014; Kyaw *et al.*, 2015; Pallavicini *et al.*, 2010; Sileika *et al.*, 2011; Taglietti *et al.*, 2014; Wei e Wang, 2015; Zhang *et al.*, 2012). As propriedades que o recobrimento pode manifestar em escalas maiores (e.g milímetros), no que diz respeito à sua composição, topografia e estereoquímica, não podem ser previstas através do conhecimento das propriedades da superfície e da partícula em escala nanométrica. Além disso, também não há relatos da influência do ambiente microquímico da superfície na formação dos recobrimentos de AgNPs ou da influência dos filmes de silano na distribuição destas partículas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Produzir superfícies com diferentes ambientes microquímicos, recobrimentos de prata e avaliar a adesão e o crescimento microbiano nestas superfícies.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Alterar e controlar o padrão de rugosidade das superfícies de silício através do processo de corrosão anisotrópica.
- Funcionalizar as superfícies de silício com diferentes silanos, obtendo diferentes químicas de superfície.
- Avaliar a estabilidade de filmes de AgNPs em diferentes ambientes microquímicos.
- Obter filmes de silano e recobrimentos de AgNPs resistentes à degradação em meio fisiológico de alta força iônica.
- Caracterizar os recobrimentos em escalas de milímetros.
- Verificar o crescimento bacteriano em superfícies com diferentes topografias.
- Verificar o crescimento bacteriano em superfícies funcionalizadas com diferentes tipos e concentrações de nanopartículas de prata.
- Estabelecer algoritmos computacionais para análise e quantificação química e biológica.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

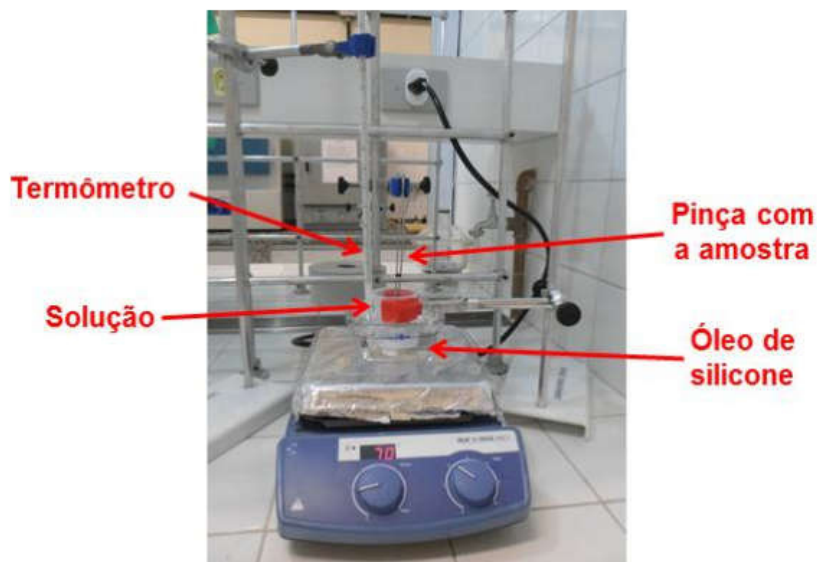
#### 3.1 Materiais

Os substratos de silício foram adquiridos da TedPella (EUA). Os tampões biftalato de potássio/hidróxido de sódio, fosfato dissódico/fosfato de potássio monobásico e ácido bórico/cloreto de potássio foram comprados da Neon Comercial Ltda (Brasil). Glicose, citrato de sódio e cloreto de sódio foram adquiridos da Dinâmica (Brasil). Dodecil sulfato de sódio (SDS) foi comprado da Vetec (Brasil). Extrato de malte, extrato de levedura, meio ágar Mueller-Hinton, batata-glicose ágar e peptona foram adquiridos da Himedia (Índia). 3-aminopropiltriétoxissilano (APTMS); trimetóxiifenilsilano (TMPS); 3-(Trihidróxisilil)propil metilfosfonato (THSPMP), tolueno e tampão fosfato salino (PBS) em tabletes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Hidróxido de potássio em escamas, etanol e acetona foram obtidos junto à Synth (Brasil). Nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi adquirido da Merck (Brasil).

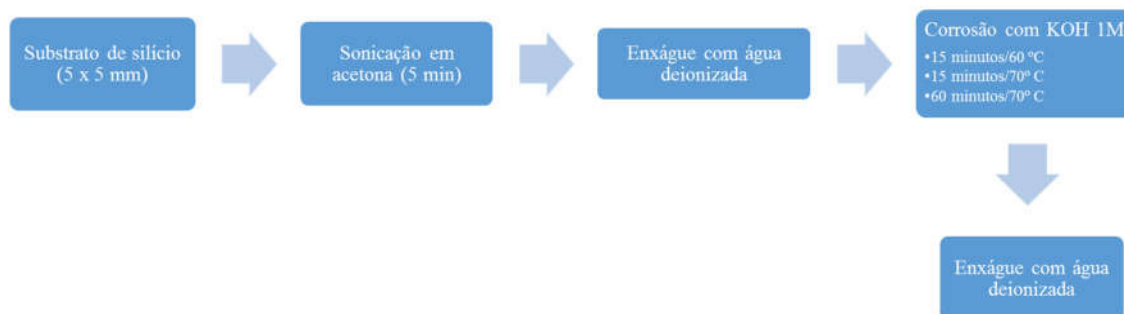
#### 3.2 Corrosão anisotrópica do silício com KOH 1M

Os substratos de silício de 5 mm x 5 mm pré-cortados (orientação  $\langle 111 \rangle$ ; camada de  $\text{SiO}_2 < 20$  nm, tipo *p*, dopado com boro) foram primeiramente limpos por sonicação a alta frequência (40 kHz) em acetona por 5 min e, então, extensivamente enxaguados com água ultrapura tipo 2 produzida por um sistema Direct-Q<sup>®</sup>3 UV (Millipore, EUA). Depois da etapa de limpeza, as amostras foram então submetidas à corrosão (ou ‘ataque’) anisotrópica com solução de hidróxido de potássio 1 mol L<sup>-1</sup>. Esta solução foi previamente preparada a partir da diluição de 10 mL de solução estoque 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 5**. Para avaliação do efeito da topografia na adesão microbiana três diferentes combinações de tempo de ataque e temperatura foram avaliados: 60 °C e 15 min, 70 °C e 15 min, 70 °C e 60 min. Após o ‘ataque’, as amostras foram lavadas com água ultrapura em abundância e submetidos à sonicação em água ultrapura por 5 minutos. A sequência de etapas para corrosão anisotrópica com KOH está representada na **Figura 6**.

**Figura 5** - Arranjo reacional para corrosão anisotrópica



**Figura 6** - Etapas para corrosão anisotrópica

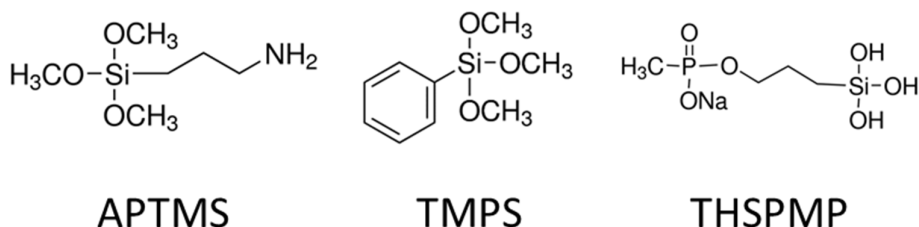


### 3.3 Silanização dos substratos de silício

Nesta etapa, amostras previamente atacadas a 60° C por 15 minutos foram imersas em posição vertical por pinças e mantidas por uma hora sob agitação em três diferentes soluções de silanização: 3-aminopropiltriéoxisilano (APTMS) 2% em tolueno a 80 °C; trimetóxiifenilsilano (TMPS) 2% em tolueno a 80 °C; 3-(Trihidróxisilil)propil metilfosfonato (THSPMP) 4% em etanol a 60 °C. Após uma hora, as amostras foram retiradas da solução e gotejadas com 10 uL da solução de silanização e submetidas a secagem em uma placa de Petri sob chapa aquecedora a 100°C por 4 horas. Com a utilização do TMPS, APTMS e THSPMP, três recobrimentos com características físico-químicas distintas puderam ser gerados. O TMPS provê uma superfície de caráter hidrofóbico; o APTMS induz a formação de cargas superficiais positivas em pH ácido (devido a protonação de amins primárias); e o THSPMP induz a

formação de cargas negativas em pH alcalino devido a presença de grupos fosfonato desprotonados. As estruturas dos organossilanos utilizados estão representadas na **Figura 7**.

**Figura 7** - Estrutura química dos organossilanos.



### 3.4 Síntese de nanopartículas

#### 3.4.1 Síntese das AgNPs biogênicas a partir de leveduras

As leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram isoladas de amostras de solo coletadas na Universidade Federal do Ceará (Campus do Pici: 3°44'20.832"S, 38°34'12.483"O para *R. glutinis* e 3°44'21.750"S, 38°34'12.350"O para *R. mucilaginosa*). Um montante de 50 g de solo foi transportado para o laboratório em embalagens plásticas condicionadas em caixas térmicas. As amostras foram então suspensas em NaCl 0,9%, semeadas em meio MGYP (pH 7) contendo peptona (0,5%), extrato de malte (0,3%), extrato de levedura (0,3%), glicose (1%) e antibióticos, e, então, incubadas a 25°C por 72 h. Depois do crescimento, as amostras foram semeadas em meio sólido batata-dextrose-ágar e mantidas a 25°C por 72 h. As leveduras que foram identificadas como pertencentes ao gênero *Rhodotorula* foram semeadas novamente em meio sólido batata-dextrose-ágar com o objetivo de se obter cepas puras e isoladas. A identificação de gênero foi realizada através de um sistema VITEC®2 automatizado (BioMérieux® S.A.), cartão YST. Depois do isolamento e identificação, duas espécies de leveduras foram selecionadas: *Rhodotorula glutinis* (Rg) e *Rhodotorula mucilaginosa* (Rm). As leveduras foram crescidas em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio MGYP a 25°C por 72 h. Após o crescimento da biomassa fúngica, as amostras foram centrifugadas a 4000 rcf por 10 min e lavadas três vezes para eliminação de resíduos do meio de cultura. Imediatamente após a lavagem, as leveduras tiveram suas massas medidas (massa úmida de 5 g), foram incubadas em 100 mL de água deionizada autoclavada por 48 h a 25 °C (sem agitação). As suspensões de levedura foram então filtradas em membranas de

fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro. Finalmente, nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) foi adicionado ao filtrado, para que uma concentração de 1  $\text{mmol L}^{-1}$  de  $\text{Ag}^+$  fosse atingida e a mistura foi incubada por 168 h a 25°C. Alíquotas foram periodicamente (24 h) retiradas das misturas para avaliação da formação das AgNPs por espectrofotometria no UV-Vis. A confirmação da formação das AgNPs foi obtida com a detecção da banda característica de absorção plasmônica (Gaikwad *et al.*, 2013). A purificação das AgNPs foi realizada por (i) centrifugação da mistura a 10000 rcf por 20 min, (ii) resuspensão do pellet obtido na etapa anterior de centrifugação, (iii) 3 lavagens com água deionizada e, finalmente, (iv) resuspensão em água deionizada. Para caracterizações em que amostras sólidas eram necessárias, o pellet foi seco a temperatura ambiente ao invés de ser ressuspenso. A concentração final das suspensões de bio-AgNPs foi considerada como a concentração total de  $\text{Ag}^+$ , determinada através de espectrometria de plasma indutivamente acoplado (ICP), após a dissolução das nanopartículas. Esta concentração foi utilizada ao invés de uma concentração apenas das nanopartículas (calculada por análise termogravimétrica). Dessa forma, todo o montante de prata presente na suspensão ( $\text{Ag}$  e  $\text{Ag}^+$ ) pôde ser considerado, evitando interpretações errôneas, já que  $\text{Ag}$  e  $\text{Ag}^+$  coexistem em equilíbrio na suspensão coloidal e ambos apresentam efeitos biológicos (Foldbjerg *et al.*, 2009; Hadioui, Leclerc e Wilkinson, 2013; Kang, Alvarez e Zhu, 2014; Zhao e Wang, 2011).

### **3.4.2 Síntese das AgNPs a partir de glicose**

Nanopartículas de prata foram produzidas a partir da redução da glicose e estabilizadas com citrato de sódio e dodecil sulfato de sódio (SDS). Ao invés da capa proteica presente nas AgNPs biogênicas produzidas pelos fungos *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*, essas partículas apresentam agentes estabilizantes de menor complexidade molecular (citrato e SDS). As AgNPs sintéticas (termo usado para diferenciá-las das bio-AgNPs) foram produzidas em 500 mL de uma solução de 5  $\text{mmol L}^{-1}$  de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), contendo 1 g de glicose como agente redutor e 0,5 g de estabilizante (citrato ou SDS). A solução de  $\text{AgNO}_3$  foi aquecida até 50°C com a adição subsequente dos outros reagentes. A reação foi mantida sob agitação magnética e foi catalisada com adição de 1 mL de NaOH (0,2  $\text{mol L}^{-1}$ ). Depois de uma hora, a solução adquiriu um aspecto amarelado/castanho devido a formação das AgNPs. As nanopartículas foram então centrifugadas e lavadas três vezes com água deionizada antes de serem finalmente ressuspenso em água deionizada. A concentração das AgNPs em suspensão foi calculada da

mesma forma que como feito para as bio-AgNPs (por ICP).

### **3.5 Recobrimentos superficiais com nanopartículas de prata e imersão em tampão fosfato salino**

Para o recobrimento dos substratos de SiO<sub>2</sub>/Si com diferentes tipos de AgNPs (estabilizadas por citrato, estabilizadas por dodecil sulfato, sintetizadas por extrato de *R. glutinis* e sintetizadas por extrato de *R. mucilaginosa*), as quatro diferentes suspensões de nanopartículas foram gotejadas em substratos de SiO<sub>2</sub>/Si (Si *raw*, apenas limpo). Três alíquotas de 50 uL foram gotejadas sobre os substratos, deixando-se secar cada alíquota em placa aquecedora a 50°C antes de outra alíquota ser despejada. Após o recobrimento com as AgNPs, as amostras foram mergulhadas em solução de tampão fosfato salino (PBS) por 6 h, para que as partículas que não estivessem verdadeiramente aderidas fossem lixiviadas. Ao final, cada amostra ainda foi lavada com jatos de água deionizada (100 mL utilizados) por pisseta, a fim de remover qualquer cristal de sal presente. O processo foi realizado em triplicata para cada tipo de partícula. As amostras geradas foram denominadas Ag-Glu-Citrate, Ag-Glu-SDS, Ag-Glutinis e Ag-Mucilaginosa.

Para as amostras funcionalizadas com os silanos, foram misturados 1 mL da suspensão de 0,05 mg mL<sup>-1</sup> de nanopartículas de prata produzida pelo extrato de *R. glutinis* com 200 uL com cada um dos seguintes tampões para ajuste do pH: biftalato de potássio/hidróxido de sódio, fosfato dissódico/fosfato de potássio monobásico, ácido bórico/cloreto de potássio. Três diferentes soluções de nanopartículas com pH de 4, 7 e 10, respectivamente, foram obtidas. A suspensão de AgNPs a pH 4 foi utilizada para as amostras Si-APTMS (Si atacado por 15 minutos a 60°C e funcionalizado com APTMS), a suspensão em pH 10 para a amostra de Si-THSPMP (Si atacado por 15 minutos a 60°C e funcionalizado com THSPMP) e a suspensão em pH 7 para as amostras Si (Si *raw*, apenas limpo), Si-ETC (Si atacado por 15 minutos a 60°C) e Si-TMPS (Si atacado por 15 minutos a 60°C e funcionalizado com TMPS). Os diferentes pHs foram utilizados para aumentar a protonação/desprotonação das superfícies contendo grupos amina e fosfonato das amostras Si-APTMS e Si-THSPMP, respectivamente. Três alíquotas de 50 uL dessas suspensões foram gotejadas sobre os substratos, deixando-se secar cada alíquota em placa aquecedora a 50°C antes de outra alíquota ser adicionada. Após o recobrimento com as AgNPs, as amostras foram mergulhadas em solução de PBS por 6 h, para que as partículas que não estivessem verdadeiramente aderidas fossem lixiviadas. Ao final, cada amostra ainda foi lavada gentilmente por pisseta com 100 mL de água deionizada para remover qualquer sal presente. O processo foi realizado em triplicata para cada tratamento. Detalhes são apresentados



na **Tabela 2**.

**Tabela 2** - Recobrimentos com AgNPs (geradas por extrato *R. glutinis*).

<b>Tampão</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub> /NaOH		HBO <sub>3</sub> /KCl
<b>Superfície</b>	Si	Si-ETC	Si-TMPS	Si-APTMS	Si-THSPMP
<b>pH</b>	7	7	7	4	10
<b>Amostra gerada</b>	Si/Ag-Glutinis	Si-ETC/Ag-Glutinis	Si-TMPS/Ag-Glutinis	Si-APTMS/Ag-Glutinis	Si-THSPMP/Ag-Glutinis

### 3.6 Caracterização das nanopartículas

O espectro de absorção UV-Vis das nanopartículas biogênicas foi adquirido por um espectrofotômetro (Thermo Scientific GENESYS™ 10s), na faixa de 200 a 700 nm. As distribuições de tamanho e potencial zeta ( $\zeta$ ) foram calculadas a partir dos coeficientes de difusão medidos introduzidos nas equações (para tamanho e mobilidade eletroforética) derivadas da relação de Einstein-Smoluchowski. Os coeficientes de difusão foram medidos com as nanopartículas de prata suspensas em água deionizada (1 mmol L<sup>-1</sup> de Ag) utilizando Espalhamento de luz dinâmico (DLS) em um Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido).

### 3.7 Caracterização das superfícies com diferentes topografias e funcionalizações

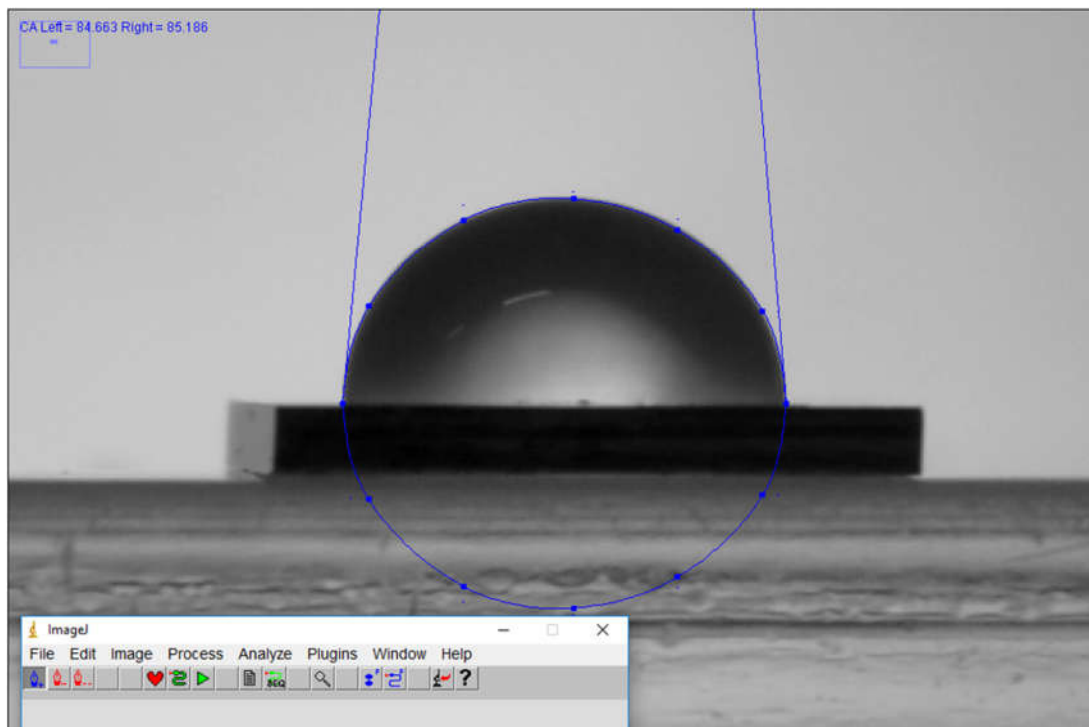
#### 3.7.1 Microscopia de força atômica (AFM)

As análises da topografia e da rugosidade das superfícies de silício, após o “ataque” com solução de KOH foram analisadas no microscópio de força atômica modelo MFP-3D da Asylum Research. As imagens foram realizadas no modo contato, com uma taxa de varredura de 0,2 Hz, varrendo uma área de 20 x 20  $\mu$ m com uma resolução de 512 x 512 pixels. As amostras avaliadas foram: Si, Si atacado a 60°C por 15 minutos, Si atacado a 70°C por 15 minutos, Si atacado a 70°C por 60 minutos. Para cada tipo de amostra, 5 medidas foram realizadas.

### 3.7.2 Avaliação de ângulos de contato

As medidas de ângulo de contato foram feitas através do método da gota séssil. 10 uL de água ultrapura tipo 1 foram dispensados através de pipeta automática sobre os substratos de silício funcionalizados e, após um intervalo de 30 segundos para equilíbrio do sistema, fotos foram tiradas em câmera Nikon D3200 (Nikon, Japão). As imagens foram convertidas em escala de cinza através do *software* Mathematica (Wolfram Research, EUA) e as medidas de ângulo de contato foram efetuadas pelo *software* ImageJ, utilizando o *plugin* DropSnake, conforme metodologia descrita por Stalder e colaboradores (2006) Brevemente, depois de carregadas as imagens em escala de cinza e o *plugin* no ImageJ, cinco a dez nós são adicionados nas bordas das gotas, de forma a contornar toda sua interface com o ar. Ao final, é feita uma média dos ângulos das interfaces dos lado direito e esquerdo (ver **Figura 8**).

**Figura 8** - Exemplo de medida realizada para ângulo de contato.



### 3.7.3 Imageamento de raios X em campo amplo

O sinal de raios X (adquirido através de espectroscopia de energia dispersiva de raios X;

EDS) foi capturado ao longo de uma varredura de campo amplo realizado em um microscópio eletrônico Quanta-450 (FEI) com canhão de emissão de campo (FEG), estágio de 100 mm e detector de raios X (modelo 150, Oxford Instruments). Os substratos de Si/SiO<sub>2</sub> foram introduzidos na câmara do microscópio sem qualquer preparação de amostra. As varreduras foram realizadas no modo de baixo vácuo (aproximadamente 10 Pa de vapor de água) para prevenir carregamento elétrico das amostras. Micrografias e espectros foram adquiridos por acelerações de feixe de 2 a 7 kV (dependendo da amostra) e com uma abertura de condensadora de 50 µm. Para essas voltagens, a corrente do feixe sobre o espécime foi de cerca de 5 nA (valor provido pelo fabricante considerando as condições usadas na coluna: abertura da lente condensadora, ângulo de convergência da lente condensadora e voltagem de aceleração). Para aumentar o caminho do feixe em alto vácuo e minimizar o ‘efeito *skirting*’ na câmara (em baixo vácuo, 10 Pa), um cone analítico gasoso (GAD) foi usado em todas as varreduras. O detector de EDS foi inserido em um ângulo de coleta de 55° em relação ao eixo da coluna, posicionado aproximadamente no fim da peça polar. Em todas as análises, a distância de trabalho (*working distance*) foi de aproximadamente 12 mm.

Para gerar as imagens de campo amplo, uma sobreposição das áreas marginais (uma borda que contém 20% da área da imagem) foi realizada. As imagens resultantes, mapas elementares e espectros cumulativos de EDS apresentados neste Trabalho são resultado de mais de 300 varreduras de feixes de elétrons adjacentes adquiridos individualmente a uma magnificação de 1500 vezes (campos horizontais e verticais de 0,274 mm e 0,188 mm, respectivamente: 512 x 352 pixels). Com esta configuração, a varredura em campo amplo demorou aproximadamente 7 horas para cada substrato de 5 x 5 mm.

### ***3.7.4 Espectroscopia de fotoelétrons por raios X (XPS)***

As análises de ambiente superficial microquímico de todos os tipos de substratos foram realizadas em um espectrômetro fotoeletrônico de raios X K-Alpha (Thermo Fisher Scientific, Reino Unido) equipado com um analisador de elétrons hemisférico e um fonte de raios X de anodo de alumínio ( $K\alpha = 1486,6$  eV). As amostras utilizadas nesta análise foram: Si, Si-ETC, Si-APTMS/Ag-Glutinis, Si-TMPS/Ag-Glutinis e Si-THSPMP/Ag-Glutinis. As amostras com nanopartículas de prata foram analisadas antes e depois do processo de imersão em PBS. As medidas foram feitas pelo uso de compensação de carga durante a análise, e a pressão da câmara foi mantida abaixo de  $2 \times 10^{-8}$  mbar. Espectros *survey* e de alta resolução foram gravados

utilizado energias de passagem 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.

### ***3.7.5 Avaliação de adsorção de corantes por espectrofotometria***

Para avaliação da presença de cargas superficiais no silício funcionalizado com diferentes filmes de silano, dois adsorventes com cargas opostas foram utilizados: o corante aniônico Remazol Azul Brilhante R (40 mg L<sup>-1</sup>) e o corante catiônico Azul de Metileno (2,5 mg L<sup>-1</sup>). As amostras de Si-ETC foram imersas em poços de placa de 24 poços contendo 2 mL de solução de cada um dos corantes a pH 4 e pH 10. As amostras Si-APTMS foram imersas apenas na solução de Remazol a pH 4 e pH 10 (duplicata em cada), enquanto duplicatas das amostras Si-THSPMP foram imersas em solução de Azul de Metileno de diferentes pHs (4 e 10). Aliquotas de 200 µL de cada poço foram retiradas para medição de absorbância (à 666 nm para Azul de Metileno e à 592 nm para Remazol) antes do processo de adsorção e depois de 24 horas de processo em leitor de placas EnSpire® (PerkinElmer, EUA).

## **3.8 Incubação com suspensão bacteriana**

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

Para os ensaios de avaliação da adesão microbiana em diferentes topografias, a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 foi utilizada para quatro tipos de amostra (cada uma feita em triplicata): silício limpo, silício atacado com KOH 1M a 60°C por 15 minutos, silício atacado com KOH 1 mol L<sup>-1</sup> a 70°C por 20 minutos e silício atacado com KOH 1 mol L<sup>-1</sup> a 70°C por 60 minutos. 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 inclinado e transferidas para 3 mL de caldo BHI por meio de alça. O inóculo em caldo BHI foi incubado em estufa a 35° C por um dia. Para o ajuste de concentração do inóculo, alíquotas da suspensão bacteriana crescida 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. 40 uL desta suspensão foram inoculados em cada um dos poços que continham 2 mL de caldo BHI e um substrato de silício por poço em uma placa para cultura de células (24 poços). Seis poços em cada placa foram preenchidos com o caldo BHI, substratos de silício e suspensão bacteriana, e os 18 poços restantes foram preenchidos com 1 mL de solução salina 0,85%. Após o inóculo da suspensão bacteriana no caldo contendo a amostra, as placas foram incubadas em estufa a 35° C durante três diferentes tempos: 3h, 24 h e 96 h. Após esse período, os substratos foram lavados nos poços contendo solução NaCl 0,85% três vezes cada. 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>. Seis poços de cada placa foram preenchidos com 300 uL de solução salina e 300 uL da solução de corante duas vezes concentrada e 12 poços foram preenchidos com 600 uL de solução salina 0,85%. As amostras foram imersas nos poços contendo a solução de fluoróforos e incubadas no escuro por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas nos poços contendo solução salina 0,85% duas vezes cada. 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 a amostra 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 (LSCM).

### **3.8.2 Avaliação de influência do recobrimento com AgNPs na adesão bacteriana**

Para a avaliação das propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata adsorvidas, a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25913 foi testada contra 6 tipos de amostra (cada tratamento realizado em triplicata: silício limpo (Si); silício limpo recoberto com partículas geradas por *R. mucilaginosa* (Si Rm); silício limpo recoberto com partículas geradas por *R. glutinis* (Si Rg); silício limpo recoberto com partículas geradas por redução com glicose e estabilizadas com citrato (Si GC); silício limpo recoberto com partículas geradas por redução com glicose e estabilizadas com SDS (Si GS); silício funcionalizado com APTMS e recoberto com partículas geradas por *R. glutinis* em solução tamponada para pH 4 (Si APTMS Rg). Mais um tratamento com amostras de silício limpo foi utilizado para formação de biofilme e posterior

morte através de solução de antibiótico (Si Negative), resultando em um total de 7 tratamentos. As amostras contendo AgNPs passaram pelo mesmo processo de imersão em PBS e lavagem realizados para os testes de estabilidade dos recobrimentos. Todas as amostras foram esterilizadas em luz UV durante 30 min (15 min para cada uma das faces). As amostras (triplicata para cada tratamento) foram, então, colocadas em placas para cultura de células de 24 poços. O ajuste da concentração foi feito através da comparação com a escala nefelométrica de McFarland, onde a solução de caldo BHI contendo inóculo bacteriano foi ajustada para apresentar turbidez semelhante àquela encontrada no tubo 7 da escala, resultando em um número de bactérias no tubo de aproximadamente  $21 \times 10^8$  bactérias/mL. 125  $\mu$ L desta suspensão foram inoculados em cada um dos poços que continham 875  $\mu$ L de caldo BHI e uma das amostras ao fundo do poço, resultando em uma concentração de  $2,6 \times 10^8$  bactérias/mL em cada poço. Após o inóculo da suspensão bacteriana no caldo contendo a amostra, a placa foi incubada em estufa a 35° C durante 24 h. Após esse período, os substratos foram lavados com solução PBS três vezes cada (uma vez com 1000  $\mu$ L e duas vezes com 500  $\mu$ L). 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>. Duas gotas da solução contendo os fluoróforos foram dispensadas sobre cada substrato e as amostras foram incubada por 15 minutos no escuro. Em seguida, as amostras foram lavadas nos poços por 500  $\mu$ L de solução salina 0,85% e em seguida secas livremente ao ar para montagem em lâmina para visualização através de LSCM. As amostras do tratamento Si Negative foram incubadas em 500  $\mu$ L de solução de antibiótico por 15 minutos e procedeu-se os passos de lavagem e coloração como para as demais amostras.

### **3.9 Análise por Microscopia Confocal por varredura a laser em campo amplo (LF-CLSM)**

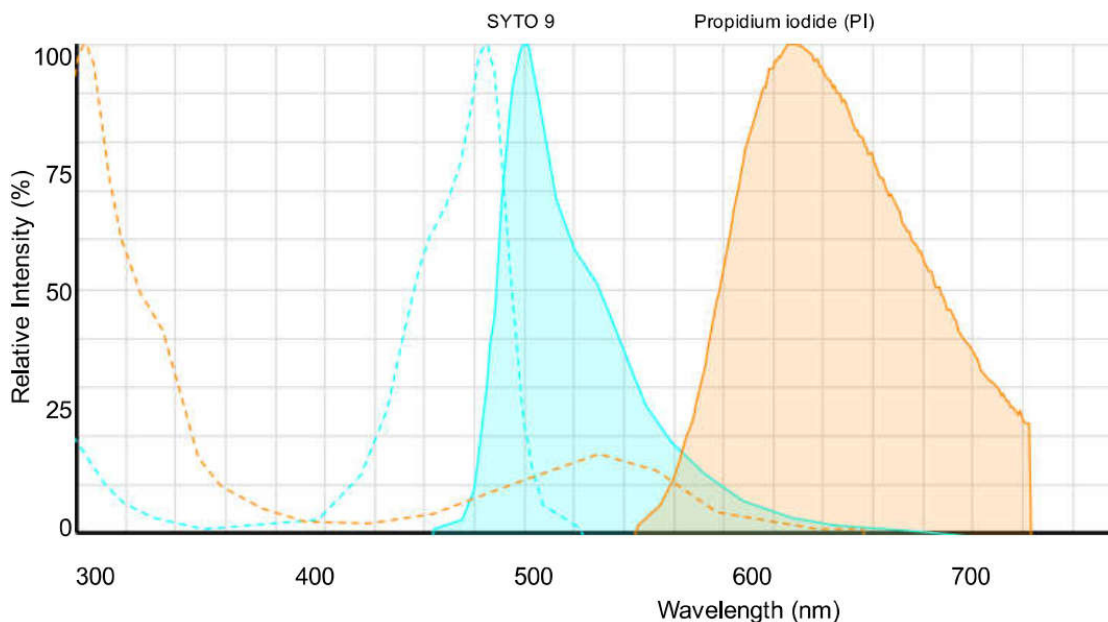
As amostras foram coradas através do kit LIVE/DEAD® *BacLight*<sup>TM</sup> L13152. Os sólidos dos dois componentes (SYTO 9 e iodeto de propídio) armazenados em ampolas foram dissolvidos em 10 mL de solução de NaCl 0,85% esterilizada, resultando em uma concentração final de 6  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> e 30  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Ambos os fluoróforos são capazes de ligar-se a ácidos nucleicos, entretanto possuem diferentes permeabilidades. SYTO 9 é capaz de transpassar membranas intactas, corando bactérias vivas e mortas, enquanto o iodeto de propídio flui apenas através de membranas danificadas, corando as células bacterianas inviáveis

(causando também uma drástica redução de SYTO9 ligado às bactérias inviáveis, quando utilizados simultaneamente). SYTO9 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 9**). As lâminas foram, então, montadas colando-se o lado fosco do substrato de silício em uma lâmina por fita adesiva dupla face. As análises foram realizadas em um microscópio Zeiss LM710, usando uma lente objetiva EC Epiplan NeoFluar de 50x com abertura numérica de 0,8 e distância focal de 0,57 mm.

Na análise da influência da topografia no crescimento, as micrografias foram obtidas por uma lente objetiva de 50x em 1024 x 1024 pixels por campo, com um tempo de permanência de pixel de 1,58  $\mu$ s e com abertura de *pinhole* de 130  $\mu$ m (correspondendo a 2 *airy units* (AU) nas condições analisadas) em um total de 36 campos adjacentes (totalizando uma área de cerca de 1 mm<sup>2</sup>). 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% como fonte de excitação dos fluoróforos.

Na avaliação de adesão bacteriana em superfícies recobertas com AgNPs, as imagens foram obtidas na objetiva de 50x em 1024 x 1024 pixels por campo, com um tempo de permanência de pixel de 1,58  $\mu$ s e com abertura de *pinhole* de 140  $\mu$ m em um total de 36 campos adjacentes (totalizando uma área de cerca de 1 mm<sup>2</sup>). Nesta análise, as imagens foram coletadas e processadas em dois canais (canal 1, limitado de 485 a 515 nm e canal 2 limitado de 620 a 650 nm) através da média de duas leituras de cada linha e com emprego do *beamsplitter* MBS 488/543, utilizando os lasers de 488 nm e 543 nm a 2% como fonte de excitação dos fluoróforos. Essa configuração foi escolhida para maximizar a coleta de sinal dos fluoróforos e evitar a sobreposição de emissões entre eles. Para o mapeamento de vários campos adjacentes, o modo *tile* foi empregado. Neste modo, foi possível mapear a superfície do substrato através da justaposição dos campos.

**Figura 9** - Espectros de absorção e emissão de fluorescência para os fluoróforos utilizados nos ensaios de microscopia confocal.



As curvas pontilhadas representam os espectros de absorbância para o SYTO9 (azul) e iodeto de propídio (laranja), enquanto as linhas cheias representam os espectros de emissão de fluorescência.

### 3.10 Processamento de imagens

#### 3.10.1 Mapas elementares obtidos por EDS

Nos mapas elementares apresentados (*Figura 13* e *Figura 23*), somente uma área interna de 3,6 por 3,6 mm dos substratos completos varridos é utilizada para avaliação com o intuito de evitar a interpretação de artefatos introduzidos pelo manuseio das amostras (feito através de pinças nas bordas dos substratos). O processo utilizado para cortar as áreas de 3,6 por 3,6 mm a partir das imagens ‘cruas’ (*raw*) de sinal de raios X em campo amplo (feito no *Wolfram Mathematica*) foi sistematicamente repetido para todas as amostras. O processo abrange: (i) uma etapa de rotação da imagem para padronizar a posição do substrato, (ii) uma etapa de corte da imagem para excluir as bordas correspondente ao suporte da amostra (i.e. exclusão do *background* lateral), (iii) uma etapa de redimensionamento da imagem para padronizar a definição da imagem (i.e. valor de pixels por polegada), e (iv) uma etapa de corte



da área interna para excluir 0,7 mm das bordas dos substratos (**Figura 10**). O tamanho inicial das imagens brutas de campo amplo (ambas micrografias e mapas elementares) foi de aproximadamente 5000 x 5000 pixels (96 pixels por polegada). Ao final do processo, os mapas elementares resultantes usados para a avaliação quantitativa dos recobrimentos de AgNPs tinham 2465 x 2465 pixels, com cada pixel representando 1,4 x 1,4  $\mu\text{m}$  da superfície do substrato.

**Figura 10** - Etapas do algoritmo de processamento de imagens de EDS.



O valor de contraste em um pixel de imagem de raios X é originada de uma área de um pico de um determinado elemento no espectro de EDS associado com um pixel em particular. Ao reduzir a definição da imagem no Mathematica (etapa iii) (i. e. processo de binarização em uma etapa de redimensionamento), o valor do contraste do pixel resultante corresponde ao valor de contraste médio dos pixels adjacentes presente na imagem bruta. Este processo de binarização aumenta a precisão das análises comparativas realizadas, uma vez que é utilizado o sinal (contraste) médio gerado entre pixels adjacentes. Através desta abordagem, a quantificação de sinal falso é evitada. Para obtenção de informação morfológica quantitativa precisa em escalas maiores que 1  $\mu\text{m}$ , magnificações maiores e tempos de permanência maiores do feixe de elétrons devem ser utilizadas para obtenção de varreduras individuais. A resolução pode ser aumentada também pela utilização do modo de alto vácuo. Entretanto, como o substrato de Si não possui uma condutividade eletrônica alta, a varredura em campo amplo teve que ser feita em modo de baixo vácuo.

Para localização dos AgNPs e seus aglomerados (**Figura 19a**), as imagens de raios X (i. e. mapas elementares de Ag) foram redimensionadas em escala de cinza, i. e. cada pixel no mapa que apresenta o maior valor de contraste foi convertido para o valor '1'; o pixel no mapa com o menor valor de contraste foi convertido para o valor '0'; e todos os outros pixels foram convertidos para valores proporcionais intermediários entre 0 e 1. Posteriormente, os mapas elementares foram binarizados com um valor de limite igual a 0,15. Dessa forma, contrastes menores foram convertidos para '0' (um pixel preto, indicando ausência do elemento) e valores de contraste iguais ou maiores foram convertidos para o valor '1' (um pixel amarelo, indicando a presença do elemento; **Figura 19a**). A escolha desse valor limite de 0,15 foi feita com base

em uma avaliação qualitativa, onde comparou-se micrografias eletrônicas e imagens de raios X com o intuito de identificar um valor numérico que minimizaria a presença de artefatos originados de flutuações na função de contraste (um exemplo de avaliação desse limiar pode ser encontrado em outro trabalho do nosso grupo) (Oliveira *et al.*, 2015).

Na análise de concentração (quantidades relativas de AgNPs; **Figura 19b**), os valores da matriz numérica da imagem de raios X (i.e. valores de contraste em escala de cinza que variam entre 0 e 1 para cada pixel; 8 bits por canal; 2465 x 2465 pixels) foram somados (i. e. integrados) e o resultado foi dado como valores de contagens de intensidade. Todos os mapas elementares de Ag tiveram seus valores de contraste de imagem normalizados em relação ao Si, que foi o elemento padrão em todas as amostras. Este cálculo foi feito para pelo menos 3 mapas elementares adquiridos de pelo menos 3 diferentes amostras, resultando nos valores de média e desvio padrão mostrados na **Figura 19b**).

Para determinação dos tamanhos de aglomerados (**Figura 19c**), todos os elementos aglomerados iguais ou maiores que um pixel (aproximadamente  $2 \mu\text{m}^2$ ) foram identificados no mapa de Ag em campo amplo (**Figura 19**) e suas áreas equivalentes foram determinadas. Histogramas foram posteriormente gerados organizando estes valores de área para cada amostra. Este cálculo foi feito para no mínimo três mapas elementares adquiridos para pelo menos três diferentes amostras, resultando nos valores de média e desvio padrão mostrados na **Figura 19c**).

### **3.10.2 Micrografias obtidas por LF-CLSM**

Para as análises de adesão e crescimento bacteriano em superfícies, as imagens obtidas através da microscopia foram primeiramente exportadas em escala de cinza (cada um dos canais de forma independente). As imagens (6144 x 6144 pixels, 12 bits por canal, 1 x 1 mm) foram, então, binarizadas. O limiar de binarização (0,003) foi escolhido com base em análises qualitativas, com o objetivo de minimizar a presença de artefatos, sem remover, no entanto, o sinal de interesse. Depois disso, os elementos da imagem (bactérias) foram identificados e a área de cada elemento foi calculada. Uma etapa de eliminação de ruídos é realizada e a área total de todos os elementos é somada. Por fim, a área total coberta pelos elementos é obtida através de soma e dividida pela área individual de uma bactéria (em pixels) para estimativa do número de bactérias presentes. A área individual de uma bactéria foi estimada através de análise qualitativa das imagens, sendo fixada em 61,7 pixels para bactérias vivas e 47,4 pixels para

bactérias mortas. Nas imagens da avaliação de adesão em diferentes superfícies, apenas imagens de um canal foram processadas (canal que apresentava sinal das bactérias vivas).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização das superfícies de silício

#### 4.1.1 Superfícies de silício com diferentes topografias

A corrosão anisotrópica do silício possui grande aplicação na área de sistemas micro/nano eletromecânicos, sendo uma técnica bastante popular para fabricação de dispositivos. Através dela, é possível criar formas funcionais e padrões em silício e em outros substratos. Neste processo, os íons  $\text{OH}^-$  provocam a dissolução dos átomos de silício em pHs elevados, resultando em corrosão (*etching*) (Gosálvez, Zubel e Viinikka, 2010; Seidel *et al.*, 1990)

Nas condições de temperatura e tempo de ataque testadas, superfícies com diferentes graus de rugosidade puderam ser obtidas. Através do processo de corrosão, crateras e pirâmides foram criadas na superfície do substrato (ver **Figura 11**), estas estruturas causaram as mudanças de rugosidade. Para descrição da rugosidade das superfícies, dois parâmetros foram utilizados: a Rugosidade média ( $R_a$ ) e a Rugosidade média quadrática (RMS ou  $R_q$ ). A rugosidade média aritmética ( $R_a$ ) é definida como a média aritmética dos valores absolutos das irregularidades da superfície em relação a linha média, dentro de uma linha (*profile*) de medição (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Já a rugosidade média quadrática (RMS ou  $R_q$ ) representa o desvio padrão da distribuição de alturas do *profile*, sendo mais sensível a maiores desvios em relação a linha média (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), quando comparada a  $R_a$  (Gadelmawla *et al.*, 2002).

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| \quad \text{(equação 3)}$$

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i^2} \quad \text{(equação 4)}$$

Onde  $y$  corresponde aos valores das altura obtidos, e  $n$  ao número de valores de altura utilizados.

A partir dos valores de rugosidade obtidos por AFM, pode-se afirmar que as amostras

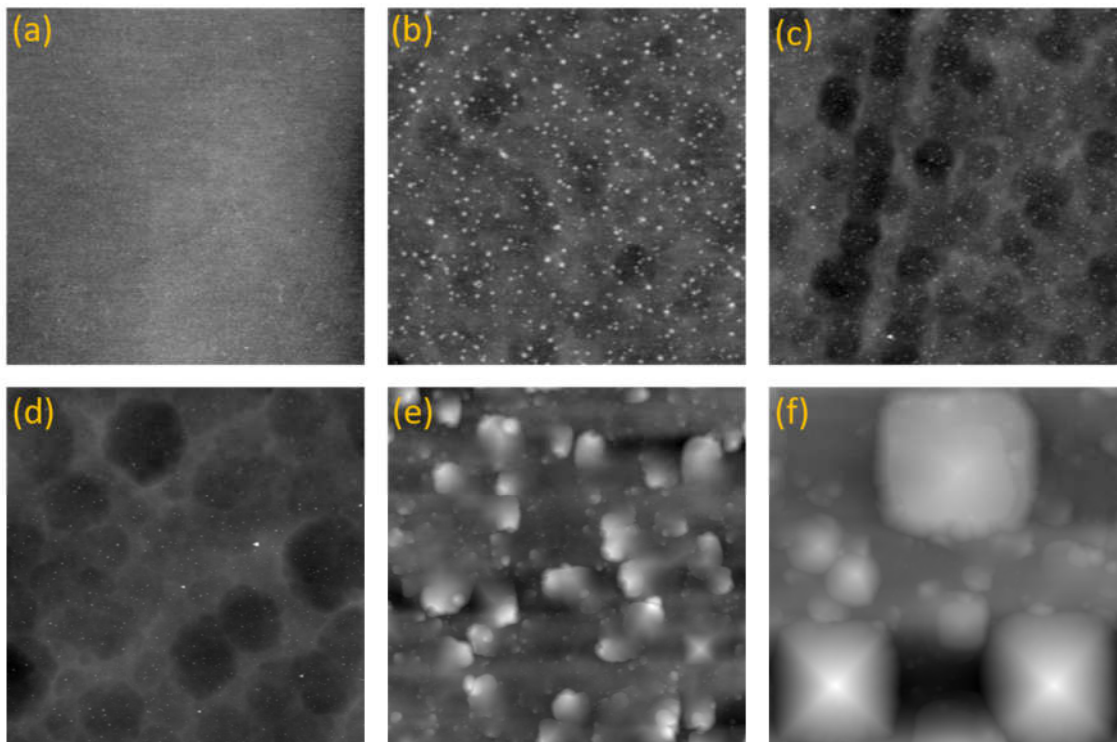
que permaneceram durante mais tempo em solução de ataque (Si 70°C 60 min) apresentaram os maiores valores de  $R_a$  e RMS dentre as condições testadas (ver **Tabela 3**). Nessas amostras, algumas regiões apresentaram a presença de pirâmides muito grandes, da ordem de 1 a 2  $\mu\text{m}$  (**Figura 11f**), enquanto o restante da superfície apresenta elementos de algumas dezenas ou poucas centenas de nanômetros, resultando em elevados valores de desvio padrão. Para os substratos atacados durante 15 minutos em temperaturas diferentes, pode-se observar valores muito próximos de  $R_a$  e RMS. Embora as superfícies apresentem valores parecidos, os maiores valores de rugosidade para as amostras atacadas a 60 °C podem ser devidos à ocorrência mais numerosa de pirâmides menores (ver **Figura 11b** e **Figura 11c**), em relação às amostras atacadas a 70 °C durante o mesmo tempo.

Com base nos resultados de Microscopia confocal, é possível observar que para os tempos de incubação de 3 e 24 h, o número de bactérias aderidas não é significativamente diferente entre todos os tratamentos empregados. Entretanto, para o tempo de 96 horas, os tratamentos podem ser agrupados em três distintos padrões: (i) Si limpo, (ii) Si 60°C 15 min e Si 70°C 15 min e (iii) Si 70°C 60 min (ver **Figura 12**). As amostras do atacadas por 15 minutos, com valores de  $R_a$  próximos a 7 nm, apresentaram uma maior quantidade de bactérias aderidas, seguido das amostras atacadas a 70°C durante 60 minutos ( $R_a \sim 170$  nm) e pelos substratos de SiO<sub>2</sub>/Si apenas limpos ( $R_a \sim 0,2$  nm).

**Tabela 3** - Parâmetros de rugosidade para amostras com diferentes topografias

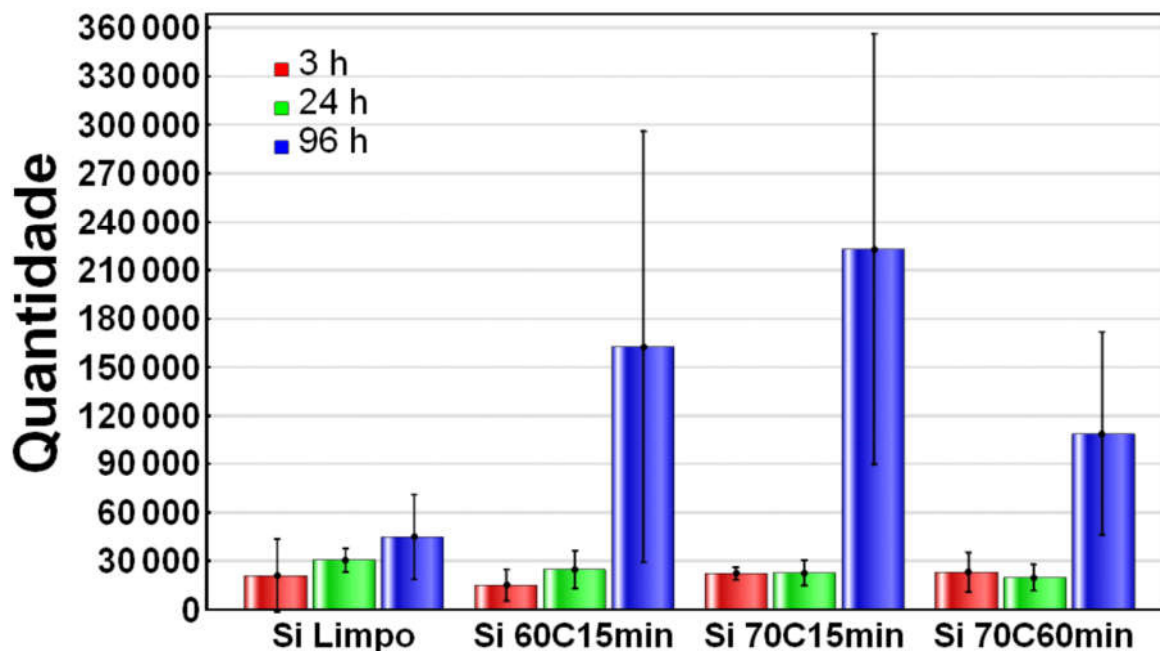
	$R_a$ (nm)	Desvio padrão (nm)	RMS	Desvio padrão (nm)
<b>Si</b>	0,294	0,149	0,400	0,216
<b>Si 60°C 15 min</b>	7,806	0,238	10,850	0,631
<b>Si 70°C 15 min</b>	6,238	1,490	8,404	1,754
<b>Si 70°C 60 min</b>	172,640	132,111	236,420	165,096

**Figura 11** - Micrografias obtidas por AFM. (a) Substrato de SiO<sub>2</sub>/Si *raw*; (b) e (c) Si atacado a 60°C por 15 min; (d) Si atacado a 70°C por 15 min; (e) e (f) Si atacado a 70°C por 60 min. As micrografias representam uma área de 20 x 20 μm.



**Figura 12** - Número de bactérias aderidas em função do tempo para superfícies com

diferentes rugosidades.



Na literatura, é comumente proposto que a correlação entre o aumento da retenção de bactérias e o aumento da rugosidade acontece em virtude de: maior disponibilidade de área superficial para adesão, a proteção de forças de cisalhamento e aumento do transporte de massa causados pelas características topográficas. A adesão das células microbianas sobre o relevo presente pode aumentar também a área de contato entre célula e superfície, permitindo um aumento da energia de ligação. Por outro lado, o custo à célula microbiana em termos de energia elástica ao distorcer, assim como energia térmica do ambiente, pode resultar em uma barreira energética à adesão (Anselme *et al.*, 2010). A adesão de *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* foi avaliada em padrões topográficos em favo de mel com tamanhos de 500 nm, 1000 nm e 5000 nm, dotadas de 3 diferentes tipos de funcionalização de superfície: APTES (carga positiva), SU8 (carga levemente negativa) e TAF (superfície apolar). Além disso, superfícies com outros tipos de padrões de topografia (buracos, postes e linhas) com tamanhos diferentes (500 nm, 1000 nm, 5000 nm) e com o mesmo tipo de funcionalização de superfície (SU8) também foram testadas. Estruturas com tamanhos similares ao das células bacterianas (1000 nm para *S. epidermidis*, 1000 e 5000 nm para *E. coli*) resultaram em maior adesão celular. De forma contrária, topografias com estruturas menores que o tamanho individual celular apresentaram um número menor de bactérias retidas. Para topografias com dimensões maiores que o tamanho celular, a retenção celular também foi menor. A adesão bacteriana mostrou ser independente da natureza química do substrato ou do tipo de estrutura (Helbig *et al.*, 2016). Um

padrão de comportamento similar também foi observado em superfícies com rugosidade alterada de forma aleatória em titânio. Células de *Staphylococcus epidermidis* foram mais efetivas na colonização de superfícies que continham padrões de rugosidade em dimensões próximas à dimensão celular ( $R_a \sim 0,8 \mu\text{m}$ ), especialmente ocupando depressões e sulcos presentes na superfície. Por outro lado, para padrões superficiais com dimensões maiores ou menores ( $R_a \sim 6 \text{ nm}$  e  $33 \mu\text{m}$ ), a adesão foi significativamente menor (Wu *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos presentes na literatura exploraram a aderência de bactérias em rugosidades próximas às avaliadas no presente trabalho. A força de adesão de duas cepas de *Streptococcus* (*S. sanguinis* e *S. mutans*) foi testada em compósitos ortodônticos com diferentes rugosidades (20, 150 e 350 nm). A força de adesão entre as bactérias e os compósitos mostrou uma relação direta com a rugosidade: em resinas mais rugosas, uma maior força de adesão foi verificada (Mei *et al.*, 2011). Alam e Balani (2017) avaliaram a capacidade de adesão de uma cepa de *S. aureus* em 4 tipos de materiais diferentes: polietileno de alto peso molecular (UHMWPE), aço inoxidável (SS), liga de Ti-6Al-4V e hidróxiapatita (HA). A adesão bacteriana foi avaliada em função da rugosidade, energia de superfície e força de adesão. Entre as superfícies analisadas, a superfície com menor energia de superfície, menor rugosidade média (72 nm) e menor força de adesão mostrou um menor número de bactérias aderidas. De forma oposta, as superfícies com rugosidades maiores (HA e SS), com  $R_a$  próximo a 225 nm, apresentaram de 2 a 3 vezes mais células bacterianas aderentes.

Pequenos acréscimos na rugosidade da superfície ( $0,04 < R_a < 1,24 \mu\text{m}$ ), feitos pela deposição de polimetil metacrilato (PMMA), resultaram na promoção da retenção bacteriana (*Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Entretanto, valores de rugosidade ainda maiores ( $1,86 < R_a < 7,89 \mu\text{m}$ ), acarretaram valores de retenção mais baixos (Taylor *et al.*, 1998). A adesão de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi avaliada em superfícies de Ti com rugosidades médias variando entre 0,6 e 14 nm. Ambas as bactérias avaliadas neste estudo mostraram preferência na adesão em superfícies de titânio com rugosidades próximas a 0,6 em detrimento às rugosidades mais altas. A cepa bacteriana mais hidrofóbica analisada, *S. aureus*, apresentou uma maior adesão às superfícies de Ti com menor rugosidade e maior hidrofobicidade, quando comparado a *P. aeruginosa* (Truong *et al.*, 2010). A adesão de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* foi avaliada em superfícies de vidro com rugosidade em escala nanométrica. A aderência bacteriana de todas as cepas testadas foi significativamente maior em vidros com rugosidade reduzida (valores de  $R_a$  e RMS foram reduzidos de 2,1 e 2,8 nm para 1,3 e 1,6 nm, respectivamente) (Mitik-Dineva *et al.*, 2009). Padrões topográficos regulares de polidimetilsiloxano (PDMS) em escala nanométrica foram empregados na avaliação da adesão



de *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. As diferentes nanotopografias, com valores de  $R_a$  de cerca de 10 e 55 nm, foram capazes de provocar uma redução de 30 a 45% na adesão bacteriana, independentemente de sua hidrofobicidade/hidrobicidade (Perera-Costa *et al.*, 2014). Um resumo dos trabalhos descritos acima encontra-se na **Tabela 4**.

**Tabela 4** - Resumo dos trabalhos de avaliação de adesão microbiana em escala nanométrica.

Referência	Bactérias testadas	Material	Ordem decrescente de adesão (valores de $R_a$ )
<b>Rugosidade aleatória</b>			
<b>Wu <i>et al.</i>, 2011</b>	<i>S. epidermidis</i>	Ti	0,8 $\mu\text{m}$ > 6 nm > 33 $\mu\text{m}$ > 11 $\mu\text{m}$
<b>Mei <i>et al.</i>, 2011</b>	<i>S. sanguinis</i> e <i>S. mutans</i>	Resinas	350 nm > 150 nm > 20 nm
<b>Alam e Balani, 2017</b>	<i>S. aureus</i>	UHMPWE, SS, Ti-6Al-4V, HA	225 nm > 72 nm
<b>Taylor <i>et al.</i></b>	<i>S. epidermidis</i> <i>P. aeruginosa</i>	PMMA	0,04/1,24 $\mu\text{m}$ > 1,86/7,89 $\mu\text{m}$
<b>Truong <i>et al.</i>, 2010</b>	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	Ti	0,6 nm > 14 nm
<b>Mitik-Dineva <i>et al.</i>, 2009</b>	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	Vidro	1,3 nm > 2,1 nm
<b>Rugosidade padronizada</b>			
<b>Helbig <i>et al.</i>, 2016</b>	<i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>	APTES, SU8, TAF	1000 nm > 500 nm/1000 nm 5000 nm/1000 nm > 500 nm
<b>Perera-Costa <i>et al.</i>, 2014</b>	<i>S. epidermidis</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i>	PDMS	Superfície lisa > 10/55 nm

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que possui cerca de 1000 nm de diâmetro. Embora estas bactérias apresentem carga superficial negativa, a grande presença de ácidos teicóicos e lipoteicóicos na parede celular destas bactérias as confere um certo caráter

hidrofóbico (Helbig *et al.*, 2016; Truong *et al.*, 2010). Como apresentado na **Tabela 5**, as superfícies que sofreram corrosão anisotrópica (amostras Si-ETC apresentadas na tabela) apresentam valores de ângulos de contato maiores que àquelas que não passaram por este processo, apresentando uma característica mais hidrofóbica. Esse aumento do ângulo de contato em função das estruturas piramidais presentes decorrentes do processo de corrosão é relatado na literatura (Xiu *et al.*, 2007). A mudança de energia da superfície provida pela formação das pirâmides pode contribuir para a adesão de *S. aureus*, em virtude das características hidrofóbicas da superfície bacteriana.

O aumento da adesão e colonização das superfícies com valores de  $R_a$  próximos a 7 nm obtidos no presente trabalho pode ser decorrente da interação com estruturas extracelulares. Estruturas como flagelos, pili e fímbrias, além de proteínas e carboidratos presentes na parede celular, possivelmente, são capazes de otimizar a energia de ligação ao padrão topográfico em escala nanométrica devido suas dimensões diminutas. Alguns autores propõem que as fímbrias podem mediar a resposta bacteriana a superfícies com rugosidade na escala nanométrica. Entretanto, o estudo do papel destas estruturas na adesão a superfícies nanotopográficas ainda não foi contemplado na literatura. (Anselme *et al.*, 2010).

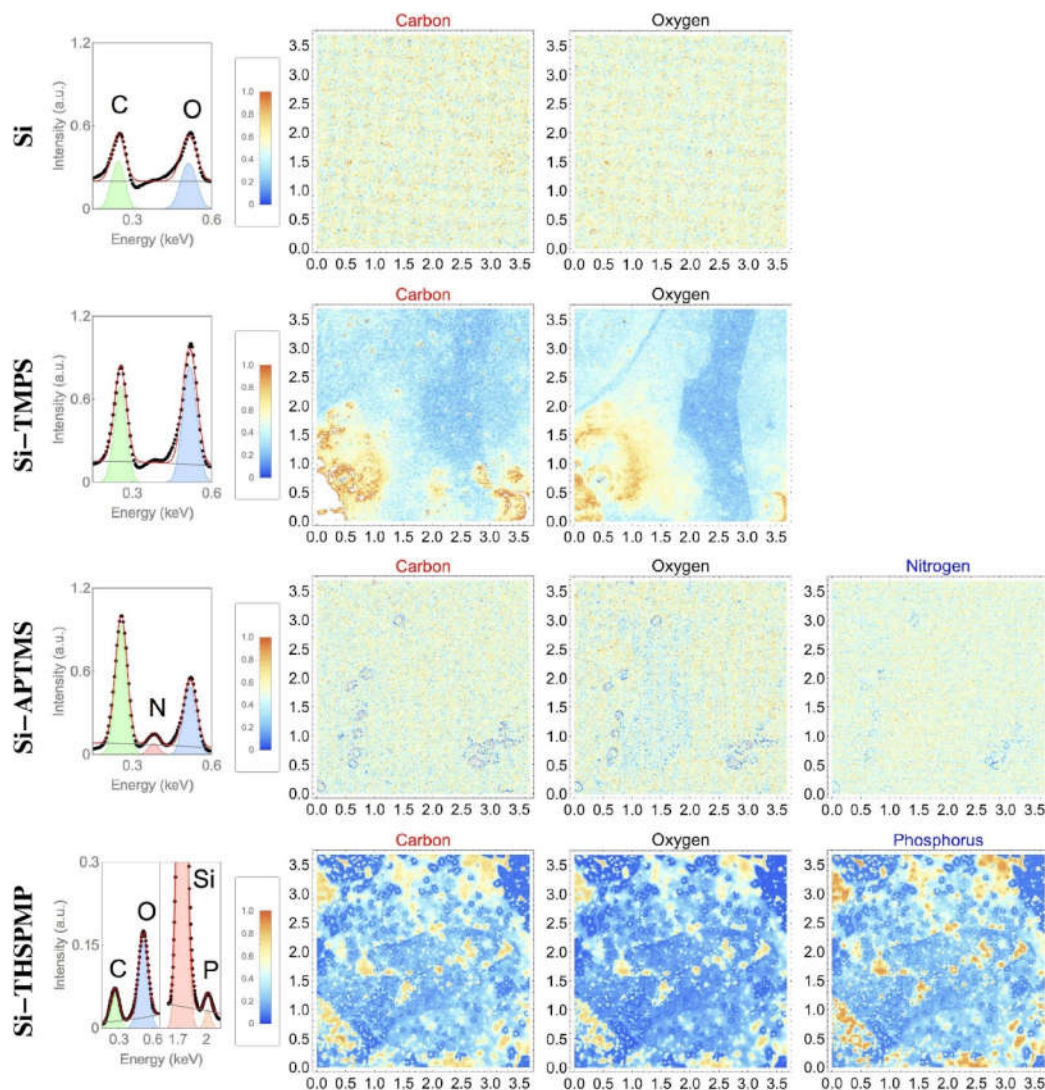
Embora os dados presentes na literatura aqui apresentados tenham buscado estabelecer uma correlação entre a nanorugosidade e a adesão bacteriana, ainda não foi possível estabelecer uma relação direta entre os dois fatores. Estudos com caracterizações físicoquímicas mais precisas dos substratos e bactérias, além de abordagens sistemáticas com maior validação estatística e de um maior entendimento das interações bactéria-superfície do ponto de vista da bioquímica e biologia molecular são necessárias para o estabelecimento de respostas mais concretas nesta área (Anselme *et al.*, 2010; Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013; Zhang *et al.*, 2015).

#### **4.1.2 Superfícies funcionalizadas com organossilanos**

A formação dos filmes de organossilanos foi avaliada por espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS). Os espectros foram adquiridos através de varredura de elétrons de campo amplo (ver **Figura 13**). A presença de picos bem-resolvidos de carbono ( $K\alpha$  0,27 keV), nitrogênio ( $K\alpha$  0,39 keV) e fósforo ( $K\alpha$  2 keV) nos espectros cumulativos de EDS (**Figura 13**, primeira coluna) indicaram a presença dos respectivos filmes de fenilsilano (Si-TMPS), 3-aminopropilssilano (Si-APTMS) e 3-propil-metilfosfonato (Si-THSPMP) sobre o substrato de Si. O pico de oxigênio ( $K\alpha$  0,52 keV) relacionado ao silanol (Si-OH) presente na amostra Si-

ETC, assim como o oxigênio presente nas cadeias de polissiloxano (Si-O-Si) estão presentes em todas as amostras. O pico do silício ( $K\alpha$  1,7 keV) também é mostrado para a amostra Si-THSPMP.

**Figura 13** - Mapas elementares de EDS para substratos funcionalizados com organossilanos. Os mapas representam áreas de 3,6 x 3,6 mm.



Com o objetivo de maximizar as seções de choque para carbono, nitrogênio e oxigênio, e, conseqüentemente, aumentar o sinal de raios X usado para identificação do filme de silano formado, as varreduras em campo amplo foram realizadas com voltagem (aceleração) de feixe de 2 kV para as amostras Si-ETC, Si-TMPS e Si-APTMS. Para Si-THSPMP, a seção de choque do fósforo foi maximizada usando 7 kV de aceleração de feixe. Resolução e sensibilidade foram amplamente aumentados no mapeamento de raios X em campo amplo, uma vez que os dados acumulados resultantes contêm sinal de mais de 300 espectros individuais ao longo da varredura. O mesmo ocorre com a relação sinal/ruído, que é aumentada com uma varredura em campo amplo (ver **Figura 13**, primeira coluna). Desta forma, mesmo elementos traços podem ser identificados em superfícies planas, como mostrado recentemente pelo nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2015). Este aspecto é evidenciado nos mapas elementares mostrados na **Figura 13**, que

revelam como filmes se formaram no substrato de silício, em escala milimétrica, ainda que as concentrações de C, N e P sejam muito baixas (<1% m/m). Como pode-se observar nos mapas elementares, os elementos C, O, N e P encontram-se distribuídos ao longo de todas as amostras (Si-TMPS, Si-APTMS, Si-THSPMP), embora as concentrações de elementos possam variar ao longo do substrato, refletindo a alta área de ocupação dos filmes de silano multicamadas em ampla escala (i. e. milímetros).

A formação dos filmes de silano também foi confirmada através de medidas de ângulo de contato (ver **Tabela 5**). Os filmes de APTMS e TMPS apresentaram características mais hidrofóbicas quando comparadas ao substrato atacado de SiO<sub>2</sub>/Si (Si-ETC), enquanto as amostras Si-THSPMP foram mais hidrofílicas. As amostras de Si atacado (Si-ETC) apresentaram maior hidrofobicidade em relação ao substrato de Si limpo. Este aumento pode ser associado com a modificação de topografia através da corrosão anisotrópica com KOH (Xiu *et al.*, 2007). A topografia das amostras de Si-ETC foi modificada principalmente pela introdução de crateras e formação de pequenas pirâmides de até algumas dezenas de nanômetros (ver **Figura 11**).

**Tabela 5** - Medidas de ângulos de contato para água deionizada em diferentes amostras.

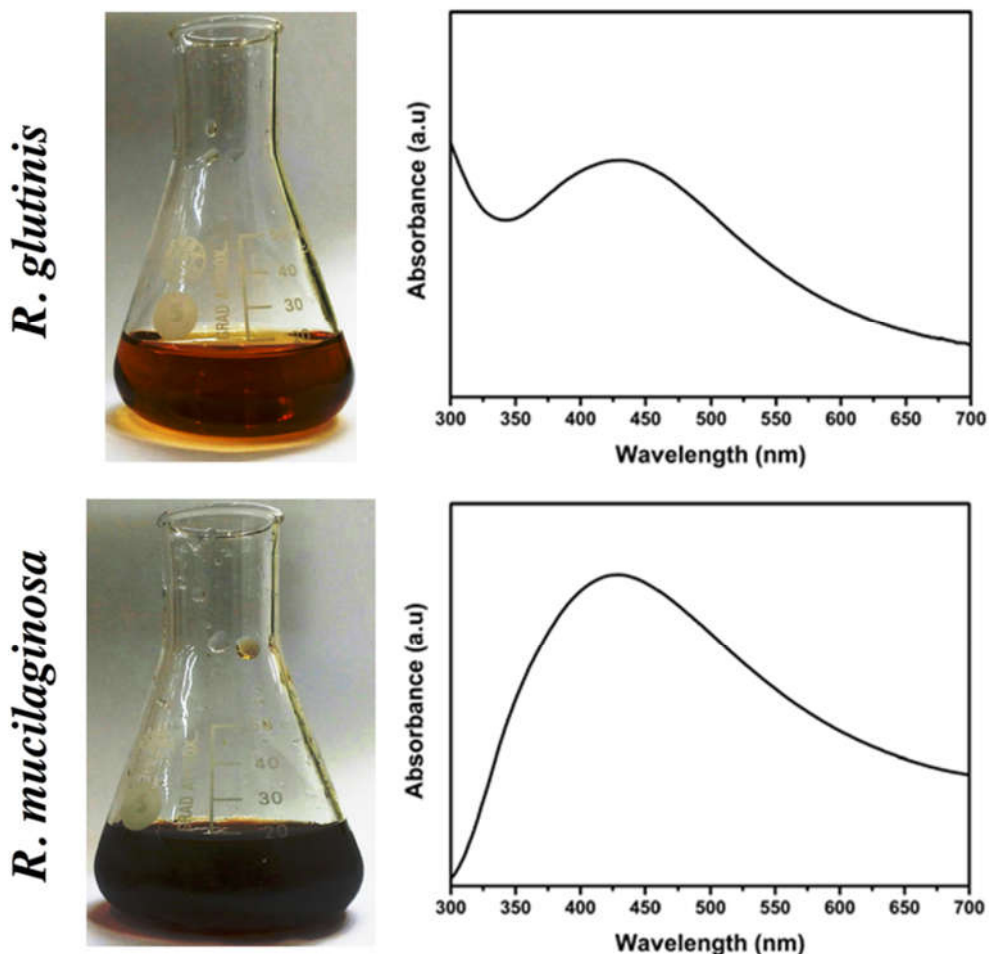
Amostra	Ângulo de contato
Si	77 ± 5
Si-ETC	87 ± 3
Si-APTMS	94 ± 2
Si-TMPS	93 ± 11
Si-THSPMP	44 ± 17

#### 4.2 Caracterização das AgNPs

Leveduras lembram bactérias em alguns aspectos, principalmente se considerado que elas formam colônias isoladas e apresentam um vasto repertório enzimático. Entretanto, há poucos relatos de seu uso para mediar a produção de AgNPs quando comparadas ao uso de extratos de bactérias (Apte *et al.*, 2013; Kaler, Jain e Banerjee, 2013; Mohanpuria, Rana e Yadav, 2008; Thakkar, Mhatre e Parikh, 2010). As leveduras pigmentadas *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*

isoladas foram capazes de reduzir  $\text{Ag}^+$  e produzir suspensões coloidais homogêneas de nanopartículas a partir de  $\text{AgNO}_3$  ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) quando este sal foi dissolvido no extrato fúngico. A formação de nanopartículas após 168 horas foi confirmada por sua banda de absorção plasmônica, manifestada no espectro de absorção UV-Vis (**Figura 14**). No caso específico da síntese biogênica, há uma certa dificuldade em interpretar a banda em virtude dos múltiplos processos cinéticos acontecendo ao mesmo tempo, uma vez que uma diversidade de biomoléculas pode estar envolvida na nucleação e no crescimento das nanopartículas. Ainda assim, o ponto de máxima intensidade da banda é um parâmetro útil para avaliar a concentração de nanopartículas no filtrado. A reação foi parada após 168 horas, tempo em que foi observada a maior intensidade de sinal de absorbância próximo a 420 nm (a absorbância foi praticamente constante para maiores períodos), com o intuito de evitar a coalescência das nanopartículas e preservar as propriedades coloidais (como tamanho e índice de polidispersividade). Ambas as partículas biogênicas resultantes apresentaram um aspecto de suspensão de cor castanha. Por outro lado, a produção das AgNPs sintéticas foi realizada seguindo protocolos bem estabelecidos na literatura que essencialmente envolvem a redução de íons  $\text{Ag}^+$  com um agente redutor e o uso de um agente de estabilização molecular para prevenir agregação de partículas e coalescência (Henglein e Giersig, 1999; Kvítek *et al.*, 2008; Mallmann *et al.*, 2015). O uso de glicose como agente redutor e citrato e dodecil sulfato de sódio como agentes estabilizantes, resultou nas amostras Ag-Glu-Citrate e Ag-Glu-SDS, respectivamente.

**Figura 14** - Extrato fúngico utilizado para síntese (primeira coluna) e espectros de absorção UV-Vis das AgNPs biogênicas formadas no extrato fúngico depois de 168 horas de síntese



A morfologia de ambos os tipos de partículas (sintéticas e biogênicas) foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura em modo de alto vácuo e usando elétrons secundários. Todas as AgNPs apresentaram uma forma arredondada com baixa razão de aspecto (isto é, baixa anisotropia). O tamanho médio das nanopartículas determinadas por imagens de varredura ficou abaixo de 100 nm, com todos os valores menores que 40 nm e com desvios padrões menores que 22 nm. A amostra Ag-Glutinis teve o menor tamanho ( $18,1 \text{ nm} \pm 6,5$ ), enquanto Ag-Glu-SDS teve a maior distribuição de tamanho entre todas as amostras (ver **Figura 15** e **Figura 16**). Outra abordagem para comparar as variâncias das distribuições de tamanhos das nanopartículas foi realizada para as nanopartículas em estado coloidal, através de análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) de suas suspensões em água deionizada (**Figura 16**, última coluna). Os resultados de DLS indicaram que ambas as partículas biogênicas tiveram um índice de polidispersividade (PDI) abaixo de 0,2, embora seus tamanhos médios de

raio hidrodinâmico diferissem levemente (108 nm para Ag-Glutinis e 120 para Ag-Mucilaginosa). As características coloidais das AgNPs geradas por processos mediados por fungos recentemente relatadas na literatura diferem bastante das obtidas no presente trabalho em termos de polidispersividade. Sabe-se atualmente que as características coloidais das AgNPs dependem do pH, temperatura e contato ou tempo de incubação durante a síntese (Akhtar, Panwar e Yun, 2013). Entretanto, o processo cinético envolvido com a nucleação e crescimento das nanopartículas pode ser finamente regulado pelo *pool* de bio(macro)moléculas presentes no extrato/filtrado usadas para sua produção, resultando, então, em uma biossíntese dependente das características de cada espécie de organismo. Suspensões coloidais de AgNPs de alta qualidade (com pequeno tamanho e baixo índice de polidispersividade) podem ser produzidos de forma biogênica dependendo da espécie empregada (Chan e Mat Don, 2013; Du *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2011). Por outro lado, as AgNPs “sintéticas” produzidas tiveram um caráter mais polidisperso (isto é, maior variância de distribuição de tamanho), refletindo em um PDI de cerca de 0,4 para ambas as amostras (ver **Tabela 6**). Além disso, seus tamanhos médios foram de 170 nm para Ag-Glu-SDS e 190 para Ag-Glu-Citrate.

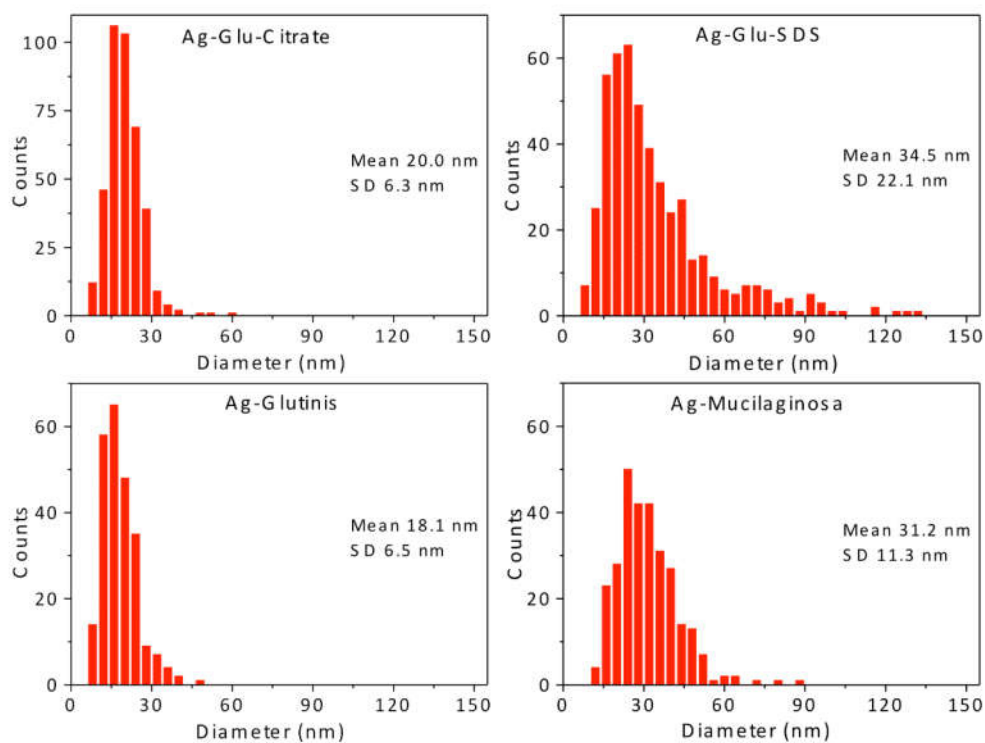
O maior tamanho observado em DLS quando comparado as micrografias por MEV é explicado pelo sinal capturado a partir da luz dispersa pelas camadas difusas presentes sobre a superfície das nanopartículas quando elas estão dispersas em meio líquido. Este efeito ocorre, principalmente, pela presença de uma corona proteica nas nanopartículas biogênicas. Por outro lado, em imagens de MEV, a visualização do núcleo metálico de Ag é priorizado em detrimento a cobertura proteica, uma vez que as proteínas se aglomeram amplamente durante a etapa de secagem que precede a análise (ver **Figura 16**).

No que diz respeito às características dos agentes estabilizantes que recobrem a superfície das AgNPs, análises de potencial zeta ( $\zeta$ ) indicaram que todas as amostras são negativamente carregadas a pHs neutros (utilizados nas medidas). A excepcional estabilidade coloidal observada para todas as amostras em água deionizada (estável por meses a 10°C) é primeiramente um resultado dos altos valores de potencial zeta (abaixo de -30mV para todas as amostras; ver **Tabela 6**). No caso particular das AgNPs biogênicas (Ag-Glutinis e Ag-Mucilaginosa), a estabilização coloidal por mecanismos estéricos/eletroestéricos deve também ser levada em conta devido a presença de macromoléculas na corona proteica (Padovani *et al.*, 2015; Paula *et al.*, 2014).

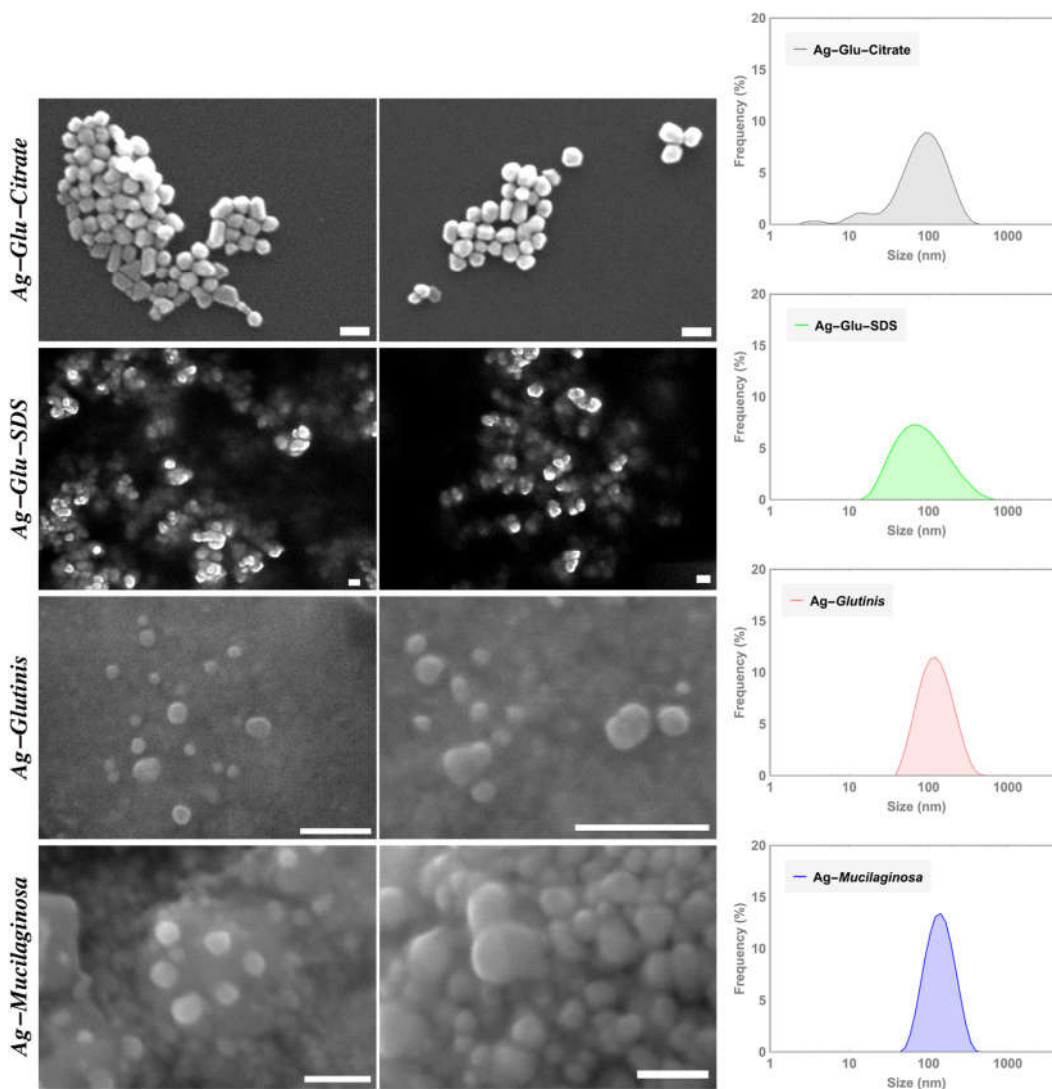


**Tabela 6** - Características físico-químicas das AgNPs.

AgNP	DLS		MEV		Potencial Zeta ( $\zeta$ )	
	Tamanho (nm)	PDI	Tamanho (nm)	Desvio padrão (nm)	Valor (mV)	Desvio padrão (mV)
Ag-Glu-Citrate	190	0,4	20	6,3	-30	12
Ag-Glu-SDS	170	0,4	34,5	22,1	-41	17
Ag-Glutinis	108	0,2	18,1	6,5	-32	9
Ag-Mucilaginoso	120	0,2	31,2	11,3	-33	6

**Figura 15** - Histogramas dos tamanhos das AgNPs medidas para mais de 200 partículas em imagens de MEV.

**Figura 16** - Micrografias obtidas por MEV das AgNPs e distribuição de tamanho das nanopartículas determinadas por DLS (última coluna). As barras de escala brancas representam 100 nm.



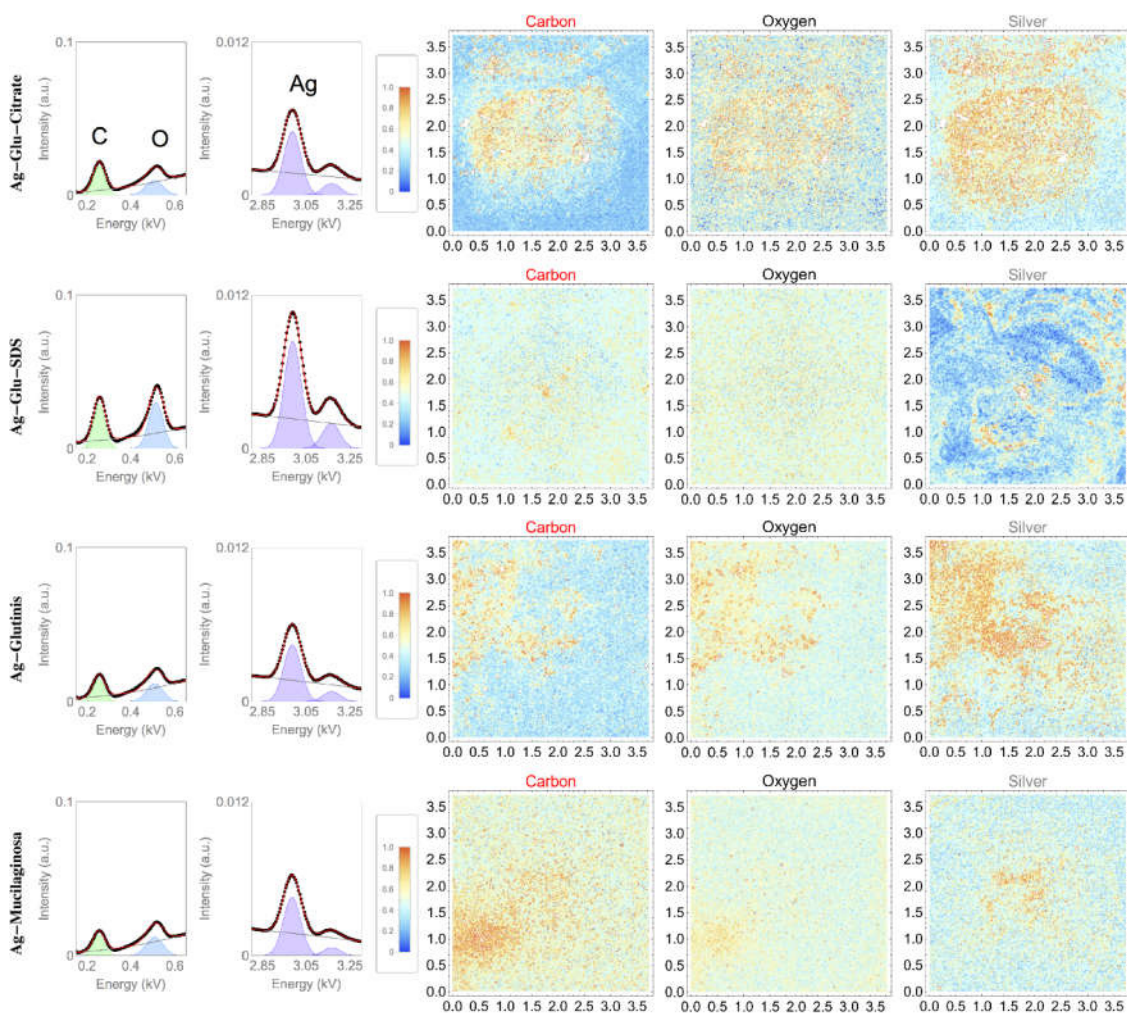
### 4.3 Caracterização dos recobrimentos de AgNPs

#### 4.3.1 Caracterização dos recobrimentos de AgNPs em superfícies de silício bruto (*Si raw*)

A formação dos recobrimentos de AgNPs foi analisado através de EDS, e os espectros foram adquiridos através de varredura eletrônica de campo amplo. Considerando o substrato de silício de 5 x 5 mm, uma área quadrada de 3,6 x 3,6 mm na região central do substrato foi usada para todas as amostras. Portanto, os espectros cumulativos de EDS em campo amplo mostrados

na **Figura 17** (primeira e segunda colunas) correspondem a soma de todos os espectros obtidos ao longo da área de 3,6 x 3,6 mm do substrato (mais de 300 espectros). Os picos bem-resolvidos de carbono ( $K\alpha$  0,27 keV) e oxigênio ( $K\alpha$  0,52 keV) nos espectros cumulativos de EDS (**Figura 17**, primeira coluna) estão relacionados a presença de grupos silanol (Si-OH) presentes tanto na superfície da camada de SiO<sub>2</sub> como nos agentes estabilizantes das AgNPs. A presença das AgNPs que se mantiveram firmemente aderidas ao substrato mesmo após a imersão em PBS por 6 horas pode ser evidenciada através da presença do pico Ag (emissão  $L\alpha$ , ver **Figura 17**, segunda coluna) em cerca de 3 keV. É importante mencionar que foi identificado visualmente uma lixiviação da maioria das AgNPs durante a etapa de lavagem.

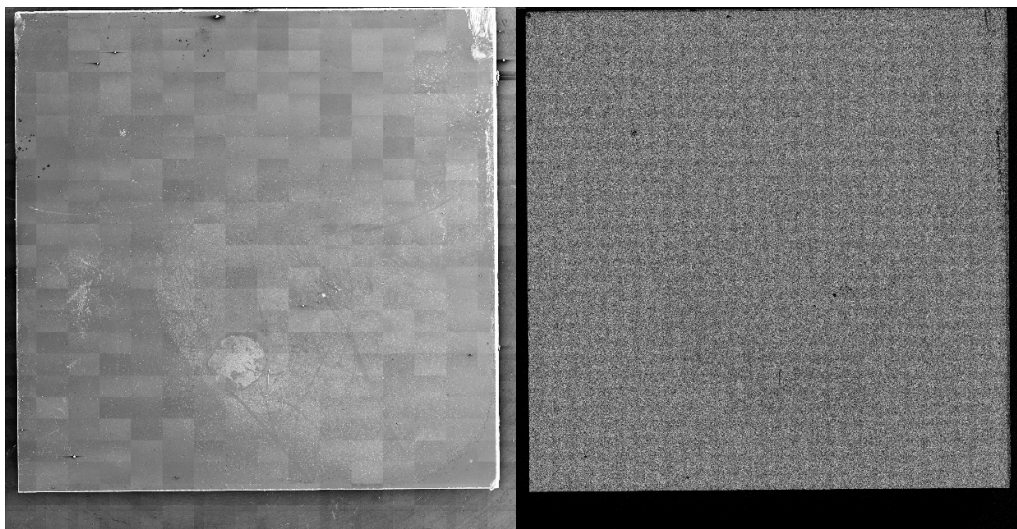
**Figura 17** - Espectros cumulativos de raios x para recobrimentos de AgNPs (esquerda) em substratos de SiO<sub>2</sub>/Si e respectivos mapas elementares associados (direita). Os mapas representam áreas de 3,6 x 3,6 mm.



A função de contraste colorida representada nos mapas da **Figura 17** (com valores de 0 a 1) é um resultado da função de normalização aplicada para todos os mapas elementares. Neste processo, o pixel da imagem associado com a maior área do pico de um elemento assume uma coloração vermelha, enquanto a ausência de sinal (isto é, área de pico de EDS com valor zero) foi associado com a cor azul. Esta função de contraste colorida facilita a visualização dos elementos (principalmente aqueles em baixas concentrações) em comparação com funções de escalas de cinza convencionais, tornando possível uma comparação adequada da distribuição dos elementos ao longo da área varrida. Através de uma análise visual dos mapas do elemento Ag em campo amplo (**Figura 17**, última coluna), é possível observar que os recobrimentos de AgNPs cobriram todo o substrato a uma escala milimétrica. Além disso, quando as imagens de raios X em campo amplo dos espectros de C, O e Ag são comparadas, uma grande sobreposição de todos os mapas elementares foi observada para todas as amostras, indicando que a maior parte dos sinais de C e O observados para os recobrimentos está relacionado com os agentes estabilizantes das AgNPs.

Para um análise qualitativa dos recobrimentos de AgNPs em uma escala milimétrica, os mapas elementares de EDS em campo amplo podem fornecer uma maior precisão devido ao menor número de artefatos, que não são observados para as imagens de raios X na escala utilizada neste trabalho (ver **Figura 18**, segunda coluna). Em contraste, os sinais advindos de elétrons (secundários ou retroespalhados) emitidos da amostra sofrem interações de carga ao longo da câmara do microscópio até chegar ao detector, resultando em artefatos devido às deflecções e flutuações no processamento do sinal. Estes artefatos quando presentes apresentam um padrão de grade, sendo facilmente identificados como mostrado na **Figura 18** (primeira coluna).

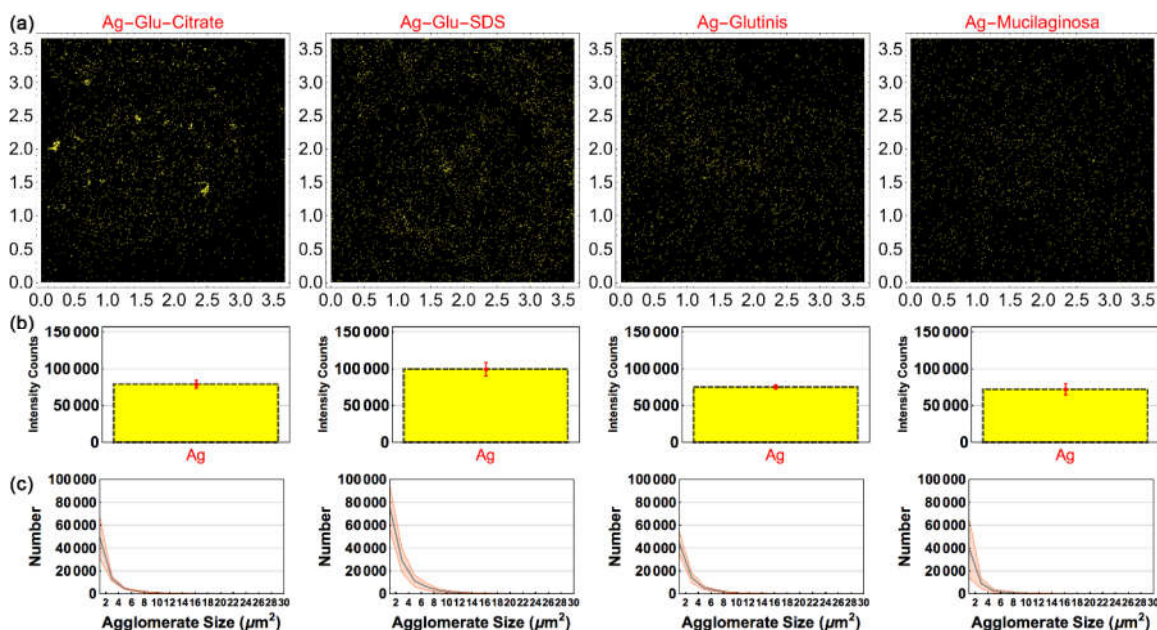
**Figura 18** - Comparação entre micrografias de campo amplo do substrato de silício completo (5 x 5 mm) obtidas por elétrons secundários (esquerda) e por raios X (direita).



Para determinação da homogeneidade do recobrimento de AgNPs (**Figura 19a**), concentração de AgNPs (**Figura 19b**) e os histogramas dos tamanhos dos aglomerados de AgNPs (**Figura 19c**), o sinal de raios X usado para Ag teve uma resolução de  $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}$ . Conseqüentemente, o sinal de raios X primários individuais utilizado para os cálculos (i. e. o valor de contraste de um pixel nos mapas elementares) foi emitido a partir de uma área de  $1,4 \times 1,4 \mu\text{m}$  de área de superfície (correspondendo a 1 pixel em uma imagem de  $2465 \times 2465$  pixels). Comparativamente, os recobrimentos da amostra Ag-Glu-Citrate e das partículas biogênicas (Ag-Glutinis e Ag-Mucilaginososa) que resistiram ao PBS, após a imersão por 6 horas em PBS, tiveram características similares no que diz respeito ao número relativo de nanopartículas ( $70.000\text{-}80.000$  *intensity counts*, ver **Figura 19b**) presentes no substrato. Por outro lado, a amostra Ag-Glu-SDS teve uma quantidade de partículas levemente maior (ver **Figura 19**). Estes resultados foram obtidos pela contagem de mais de 100.000 elementos (AgNPs e aglomerados) identificados em cada mapa de Ag em campo amplo (o menor elemento tinha cerca de  $2 \mu\text{m}^2$ : 1 pixel).



**Figura 19** - (a) Mapas elementares utilizados na análise quantitativa dos recobrimentos formados nos substratos brutos; (b) quantidades relativas de Ag na área total do substrato; (c) distribuição de tamanho dos aglomerados de AgNPs na superfície. Os mapas representam áreas de 3,6 x 3,6 mm.

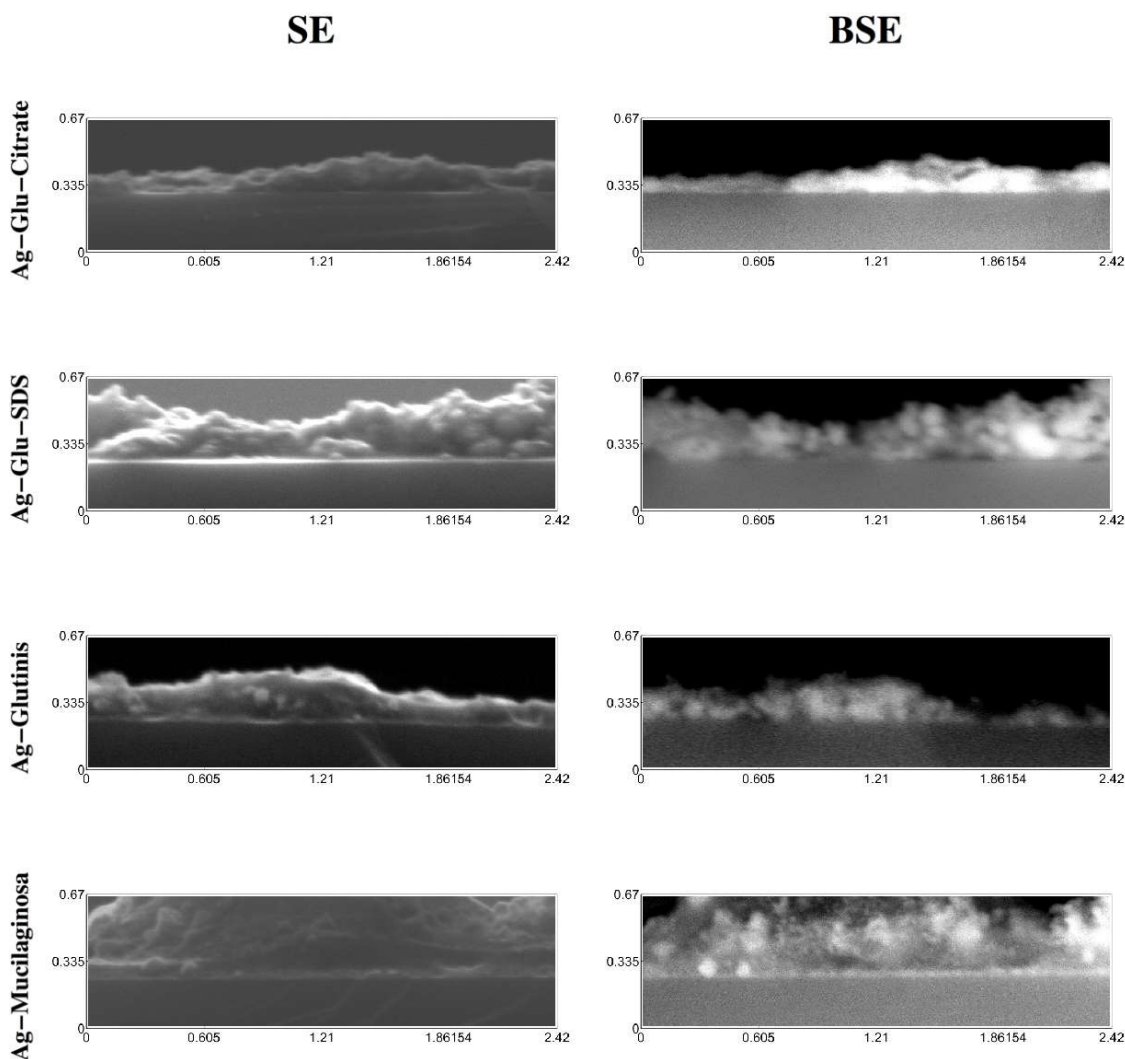


Os recobrimentos de AgNPs caracterizados pelo imageamento de raios X em campo amplo foram essencialmente compreendidos de aglomerados de nanopartículas que variam em tamanho de centenas de nanômetros a dezenas de micrômetros, distribuídos ao longo do substrato. Com efeito, uma função de distribuição de tamanho similar (variando de 2 a 30  $\mu\text{m}^2$ ) foi observada para os aglomerados de AgNPs em todos os substratos, ainda que a amostra Ag-Glu-SDS tenha tido uma quantidade de elementos ligeiramente maior (ver *Figura 19c*). Este fato indica que, independente da morfologia das nanopartículas e agente de estabilização empregado, a estabilidade química do recobrimento nesta escala de tamanho é essencialmente alcançada com a formação de aglomerados de AgNPs com tamanhos específicos de até 10  $\mu\text{m}^2$  em área (ao longo do plano do substrato, ver *Figura 19*) e de poucas centenas de nanômetros de altura (ver *Figura 20*). Este processo é dirigido pela dessorção natural das partículas que aconteceu de forma similar para as AgNPs aderidas quando o substrato foi imerso em solução PBS.

Além disso, o cálculo da distância entre os aglomerados mais próximos (realizado através de algoritmo construído no Wolfram Mathematica, utilizando os dados da *Figura 19a*) nas amostras Ag-Glu-Citrate ( $6,6 \pm 3,2 \mu\text{m}$ ), Ag-Glu-SDS ( $5,3 \pm 2,4 \mu\text{m}$ ), Ag-Glutinis ( $5,9 \pm$

2,2  $\mu\text{m}$ ), Ag-Mucilaginosa ( $6,0 \pm 2,9 \mu\text{m}$ ) indicou que a distribuição ao longo do substrato foi semelhante para todos os tipos de amostra.

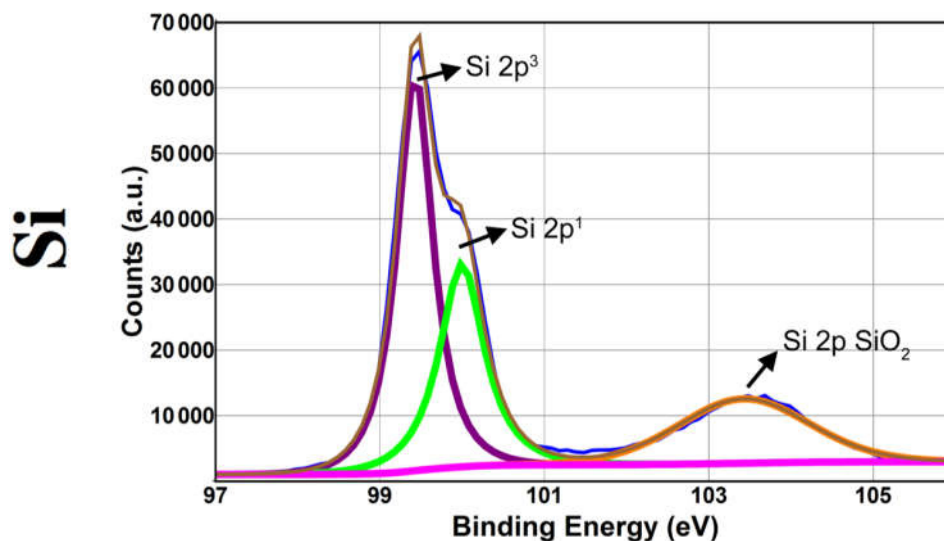
**Figura 20** - Micrografias eletrônicas das seções transversais dos recobrimentos de AgNPs formados nos substratos de  $\text{SiO}_2/\text{Si}$ . As micrografias representam um tamanho de 0,67 (altura) x 2,42 (comprimento)  $\mu\text{m}$ .



A estabilidade química do recobrimento no substrato de  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  quando imerso em solução PBS é resultado das múltiplas interações atrativas ocorrendo entre as AgNPs e o substrato. Estas interações incluem principalmente ligações de hidrogênio, que podem manifestar-se especialmente em interações entre os agentes estabilizantes das nanopartículas com os grupos silanol ( $\text{Si-OH}$ ) na superfície do substrato de  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  (confirmado através do espectro XPS, ver **Figura 21**), e outras interações de natureza quântica (e.g. interações de Van

der Waals) que se manifestam em distâncias mais longas (Paula *et al.*, 2013, 2014; Puddu e Perry, 2012; Roach, Farrar e Perry, 2005). As interações atrativas (principalmente Van der Waals) podem superar possíveis repulsões eletrostáticas entre AgNPs e a superfície do substrato, uma vez que a última possui, em menor grau, grupos negativamente carregados recobrendo a superfície (pela desprotonação de grupos silanol a pH neutro) (Leung, Nielsen e Criscenti, 2009; Paula *et al.*, 2012, 2014). A predominância desses tipos de interações sobre a repulsão eletrostática foi previamente observado para um adsorvato (i. e. moléculas peptídicas) quando a concentração estava acima de um certo limiar (Puddu e Perry, 2012). Desta forma, a estabilização de AgNPs como aglomerados tem um papel importante para a resistência de recobrimentos em meio PBS (alta força iônica), uma vez que interações atrativas de van der Waals manifestadas com o substrato podem ser potencializadas em função do volume dos aglomerados de AgNPs, definida por sua área no substrato e sua altura.

**Figura 21** - Espectro fotoeletrônico de raios X para o substrato de Si coberto com uma camada de SiO<sub>2</sub> (<5nm).



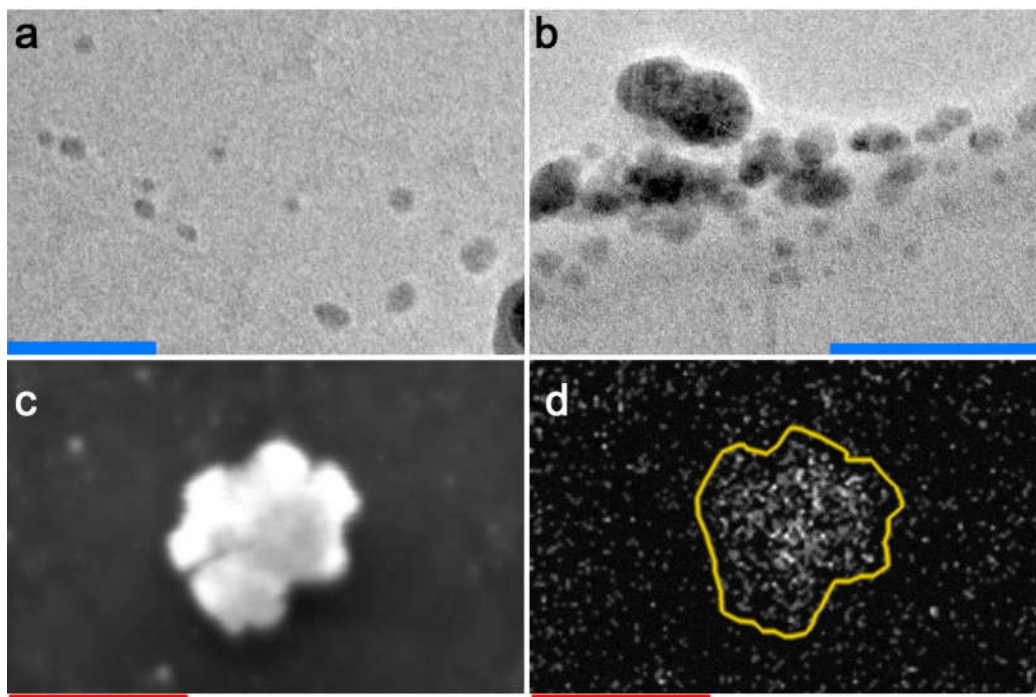
#### 4.3.2 Caracterização dos recobrimentos de AgNPs (Ag-Glutinis) em superfícies de silício funcionalizado com organossilanos

Em contraste com outras AgNPs biogênicas recentemente produzidas, com amplas distribuições de tamanho e grandes índices de polidispersividade (PDI), a levedura *Rhodotorula glutinis* isolada a partir de solo foi capaz de produzir nanopartículas coloidais de alta qualidade



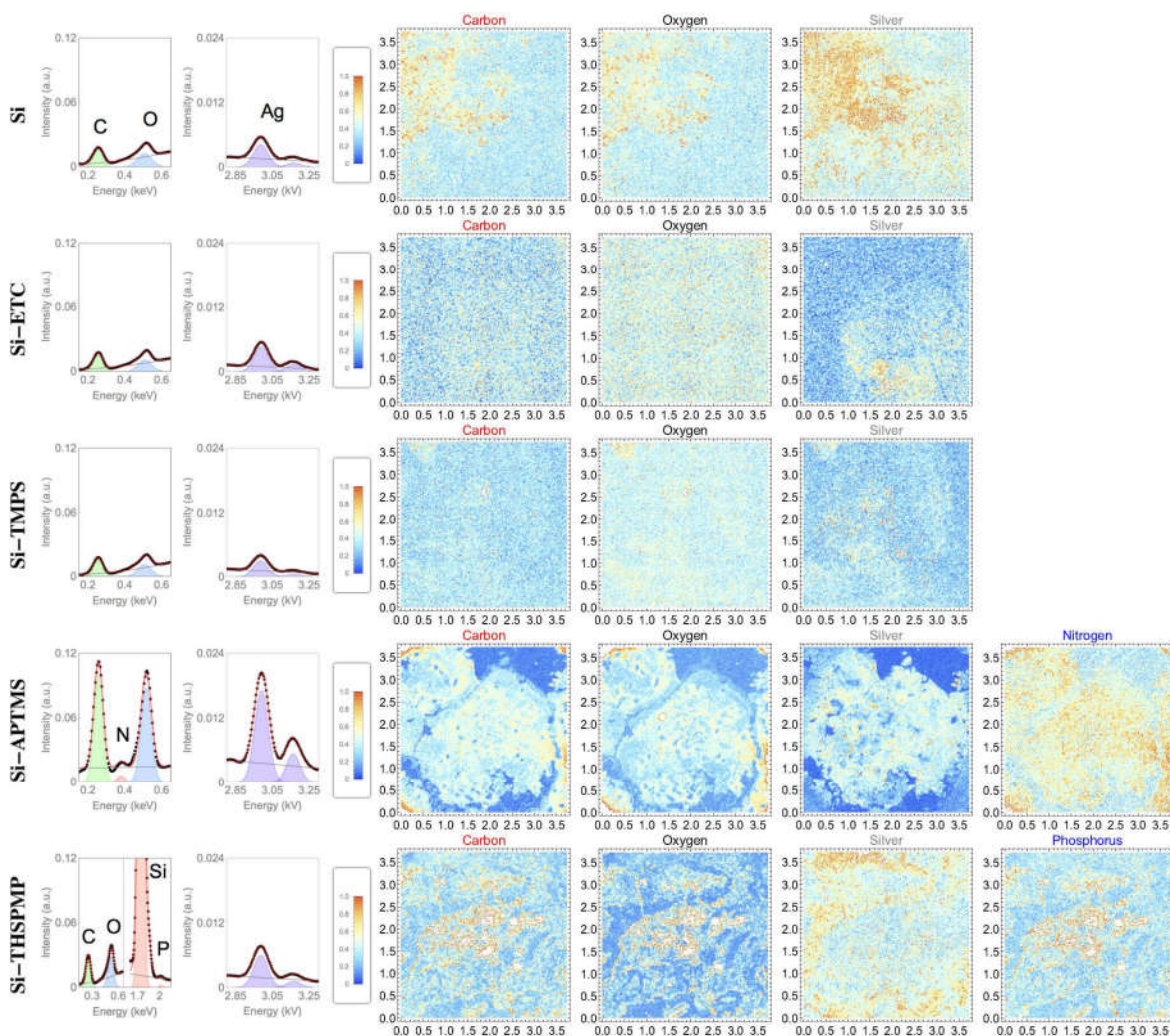
(PDI = 0,2) e estáveis (potencial zeta =  $-32 \pm 9$  mV) em escala abaixo de 100 nm (ver **Figura 22** e **Tabela 6**) (Akhtar, Panwar e Yun, 2013; Begum *et al.*, 2009; Durán *et al.*, 2005, 2007; Geethalakshmi e Sarada, 2012; Irvani, 2011; Li *et al.*, 2007; Liang, Church e Harris, 2012; Nabikhan *et al.*, 2010; Narayanan, Park e Sakthivel, 2013; Narayanan e Sakthivel, 2011; Satyavani *et al.*, 2011). A estabilização coloidal das AgNPs produzidas a partir do extrato natural de microrganismos (i. e. biogênicas) é realizada pela presença de biomoléculas, principalmente proteínas (i.e. corona proteica), que se aderem à superfície da nanopartículas, sendo também responsáveis pela carga superficial das AgNPs (i. e. potencial zeta) (Durán *et al.*, 2011; Madden *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2015). Embora a presença desta corona proteica seja amplamente descrita na literatura ao longo dos últimos anos, faltam informações de suas características em função dos organismos (fungos ou plantas) usados na síntese de AgNPs, assim como os mecanismos de sua formação (Chung *et al.*, 2016). A presença deste *cap* de estabilização proteico pode ser confirmada nos mapas de carbono obtidos para os aglomerados de nanopartículas (ver **Figura 22c** e **Figura 22d**). Com a presença desta corona proteica estabilizante, estas partículas tornam-se susceptíveis para a adesão e formação de recobrimentos superficiais através de interações covalentes e não covalentes que podem manifestar-se quando há interação com superfícies sólidas (e. g. interações eletrostáticas, de hidrogênio, de van der Waals).

**Figura 22** – (a) e (b) Micrografias eletrônicas de transmissão das Ag-Glutinis (c) Micrografia obtida por MEV (elétrons secundários) de um aglomerado de Ag-Glutinis. (d) Mapa elementar do carbono obtido por EDS das Ag-Glutinis. Barras de escala azuis representam 50 nm, enquanto barras vermelhas representam 500 nm.



Para adquirir informações morfológicas/dimensionais dos recobrimentos das Ag-Glutinis formados sobre Si, Si-ETC e nas superfícies modificadas por silanos, as amostras foram submetidas a varreduras em campo amplo (ver *Figura 23*). Uma mesma área foi varrida para todas as amostras através deste método sob as mesmas condições utilizadas no microscópio eletrônico (voltagem de aceleração de feixe, magnificação, distância de trabalho, abertura da condensadora, tempo morto do detector de EDS, tempo de permanência de feixe e normalização do espectro). Os dados mostrados na *Figura 23* podem ser comparados de forma precisa em termos das quantidades dos elementos entre as amostras. Espectros de EDS em campo amplo analisados (ver *Figura 23*, primeira e segunda colunas) correspondem a soma de todos os espectros obtidos ao longo de uma área de 3,6 x 3,6 mm do substrato (mais de 300 espectros). Os espectros de EDS foram normalizados em relação ao pico padrão de Si ( $K\alpha$  1,7 keV), presente em todos os espectros.

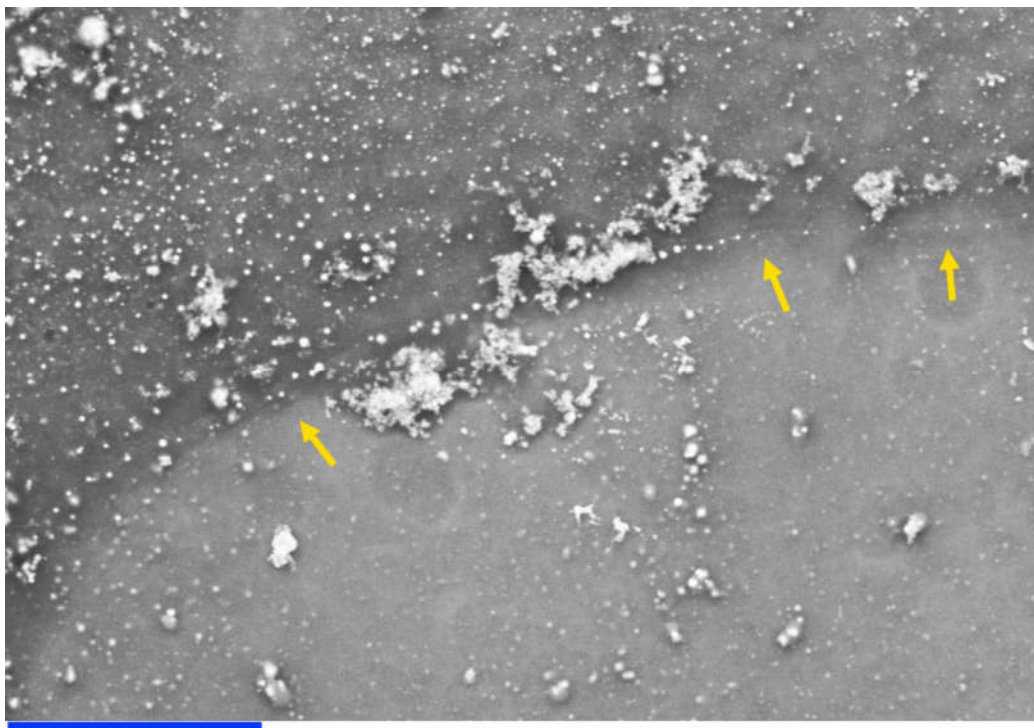
**Figura 23** - Espectros cumulativos de raios X para recobrimentos de Ag-Glutinis (após lavagem em PBS) em diferentes superfícies (esquerda) e respectivos mapas elementares associados (direita). Os mapas representam áreas de 3,6 x 3,6 mm.



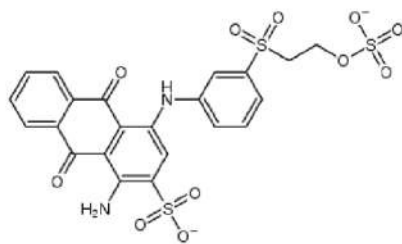
Comparativamente, em magnificações mais altas, em todos os recobrimentos com Ag-Glutinis que resistiram à etapa de lavagem em tampão PBS, as nanopartículas se organizaram sobre a superfície como aglomerados com tamanho de centenas de nanômetros a micrômetros, pouquíssimas Ag-Glutinis individualizadas foram encontradas (ver **Figura 24**). Diferenças na densidade das Ag-Glutinis nos recobrimentos (i. e. montante de nanopartículas no substrato) são evidentes em escalas de comprimento maiores, como observado na **Figura 23** (segunda coluna; avaliado pela emissão de picos Ag  $L\alpha$  na região de 3 keV). Observou-se uma maior quantidade de prata sobre as amostras Si-APTMS (ver **Figura 23**, segunda coluna) quando comparado com as outras amostras, possivelmente por causa das interações eletrostáticas formadas entre as Ag-Glutinis e as superfícies positivamente carregadas das amostras Si-

APTMS (em virtude da protonação dos grupos  $\text{NH}_2$  que ocorrem na superfície do filme) (Bagwe, Hilliard e Tan, 2006; Paula *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2013). Esta hipótese é apoiada pelos ensaios de adsorção realizados com o corante aniônico Remazol Brilhante Azul R, que adsorve amplamente em superfícies de Si-APTMS em pH 4, no qual a protonação dos grupos amina é aumentada (ver **Figura 25**). De forma oposta, esta mesma molécula adsorve muito menos em substratos de Si atacados (Si-ETC), tanto em pH 4 quanto em pH 10. Desta forma, a interação Coulômbica desempenha um importante papel na adesão de nanopartículas metálicas em superfícies de silício, como identificado anteriormente em outros trabalhos, porém em escalas de comprimento menores (Barry, Gu e Jacobs, 2005; Chen *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2010). Além disso, considerando a larga espessura observada para o filme de APTMS (~ 80 nm, ver **Figura 26**), outros tipos de interações atrativas (como van der Waals) devem ser consideradas como contribuintes para a notável estabilidade alcançada nos recobrimentos de Ag-Glutinis formados nas amostras de Si-APTMS, mesmo após a imersão em solução PBS. A complexidade molecular do recobrimento proteico das Ag-Glutinis também deve ser levado em conta na manifestação de possíveis interações atrativas com a superfície.

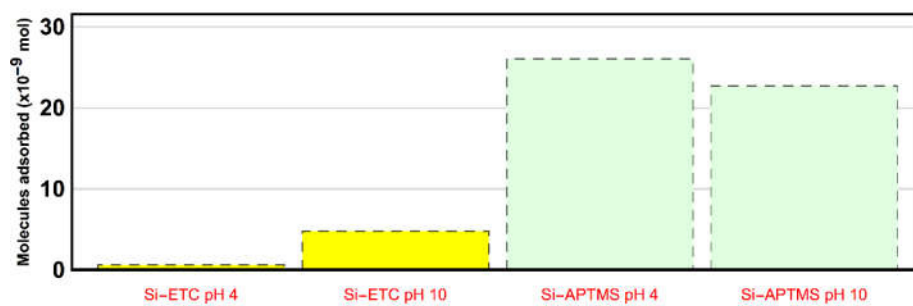
**Figura 24** - Micrografia da amostra Si - APTMS em alta magnificação mostrando o filme de silano e o recobrimento de Ag-Glutinis formado. Barra de escala representa 10  $\mu\text{m}$ .



**Figura 25** - Número de moles de Azul Reativo 19 (ou *Remazol Brilliant Blue R*) adsorvido em substratos de Si a diferentes pHs.

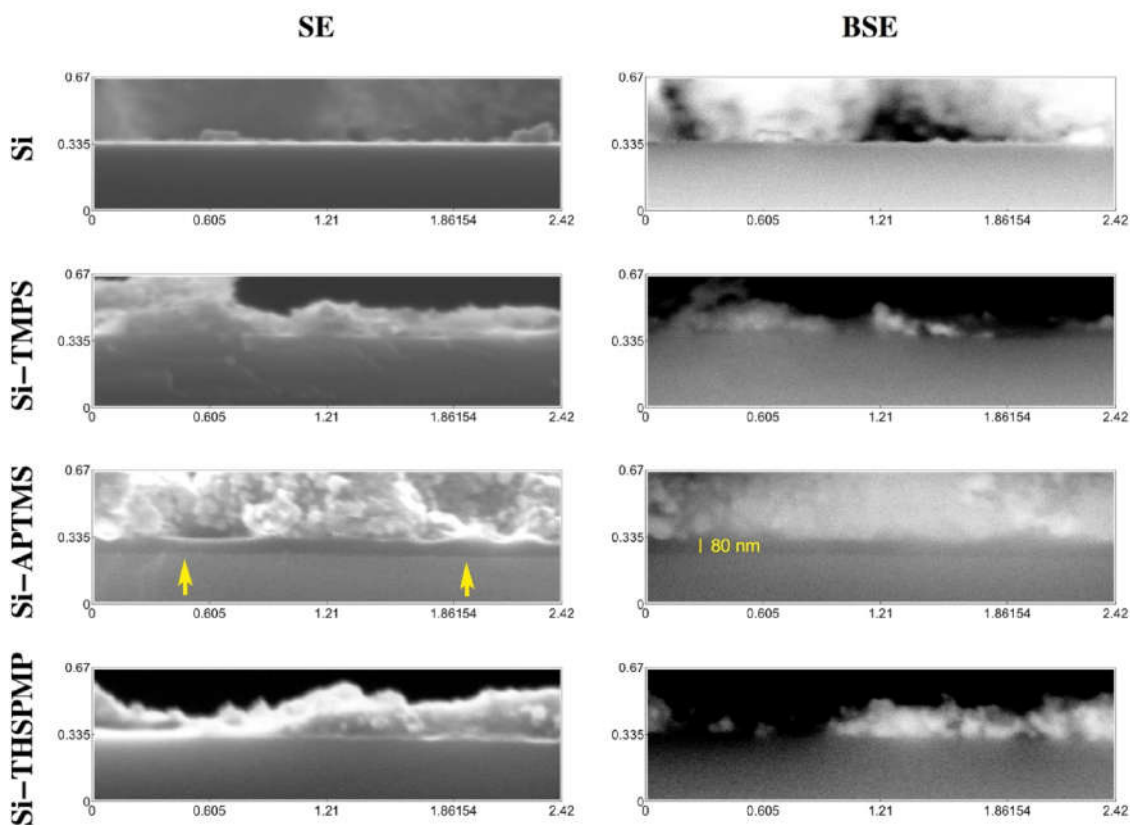


Remazol Brilliant Blue R





**Figura 26** - Micrografias eletrônicas de varredura de cortes transversais dos recobrimentos de Ag-Glutinis. As micrografias representam um tamanho de 0,67 (altura) x 2,42 (comprimento)  $\mu\text{m}$ .



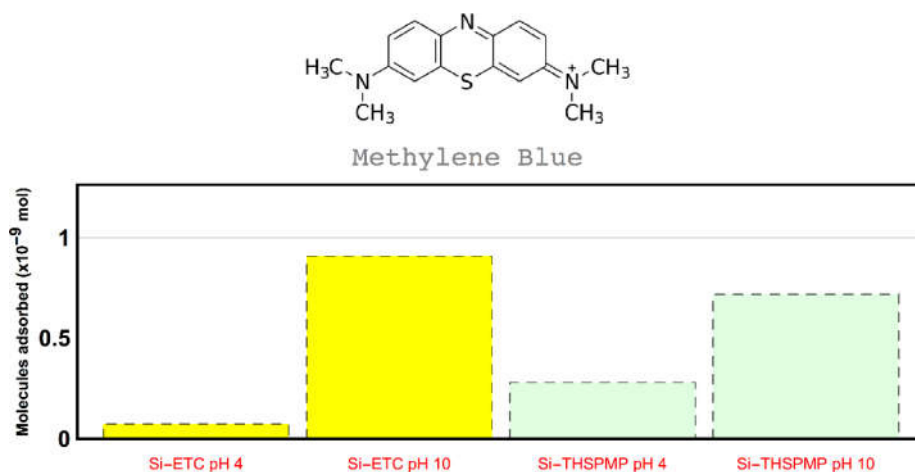
Por outro lado, uma quantidade menor de Ag-Glutinis foi encontrada sobre todas as outras amostras. Interações ocorrendo entre as Ag-Glutinis e as amostras de Si *raw* e Si-ETC e com as outras superfícies modificadas por silanos (Si-TMPS e Si-THSPMP) devem incluir interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, que podem manifestar-se especificamente entre o recobrimento proteico e a superfície sólida, e outras interações de natureza quântica (principalmente van der Waals) que podem manifestar-se a longas distâncias (Paula *et al.*, 2013, 2014; Puddu e Perry, 2012; Roach, Farrar e Perry, 2005).

Interações hidrofóbicas entre as nanopartículas podem ser aumentadas para a amostra Si-TMPS, relativamente às outras superfícies estudadas, devido à presença de grupos fenil na superfície. Entretanto, estas amostras apresentaram o menor montante de Ag-Glutinis (ver **Figura 23**). Resultados obtidos em pequenas escalas para a proteína ferritina, dispersa em substratos de  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  com grupos silanol (Si-OH) e hidrofóbicos (octadecil) à superfície, indicam que proteínas se aderem preferencialmente aos grupos silanol (Martinez *et al.*, 2010).

Este resultado converge com os resultados obtidos neste trabalho, onde a superfície coberta com porções mais hidrofóbicas resultou em recobrimentos de Ag-Glutinis menos estáveis.

Interessantemente, para as amostras Si, Si-ETC e Si-THSPMP, a manifestação de possíveis repulsões eletrostáticas entre as nanopartículas e a superfície não resultou em deterioração completa do recobrimento em solução PBS. Para estas amostras (Si, Si-ETC e Si-THSPMP), houve uma deprotonação parcial dos grupos silanol e grupos fosfonato (principalmente em pH alcalino), o que pode resultar em superfícies negativamente carregadas, a mesma carga que aquela das Ag-Glutinis (Bagwe, Hilliard e Tan, 2006). A deprotonação das superfícies pode ser confirmada através dos ensaios de adsorção, utilizando o corante catiônico Azul de Metileno como adsorbato (ver **Figura 27**). A predominância de interações atrativas (principalmente van der Waals) sobre as repulsões eletrostáticas foi demonstrada para um adsorbato (moléculas peptídicas) quando em concentrações acima de um certo limiar (Puddu e Perry, 2012).

**Figura 27** - Número de moles de Azul de Metileno adsorvida em substratos de Si a diferentes pHs.



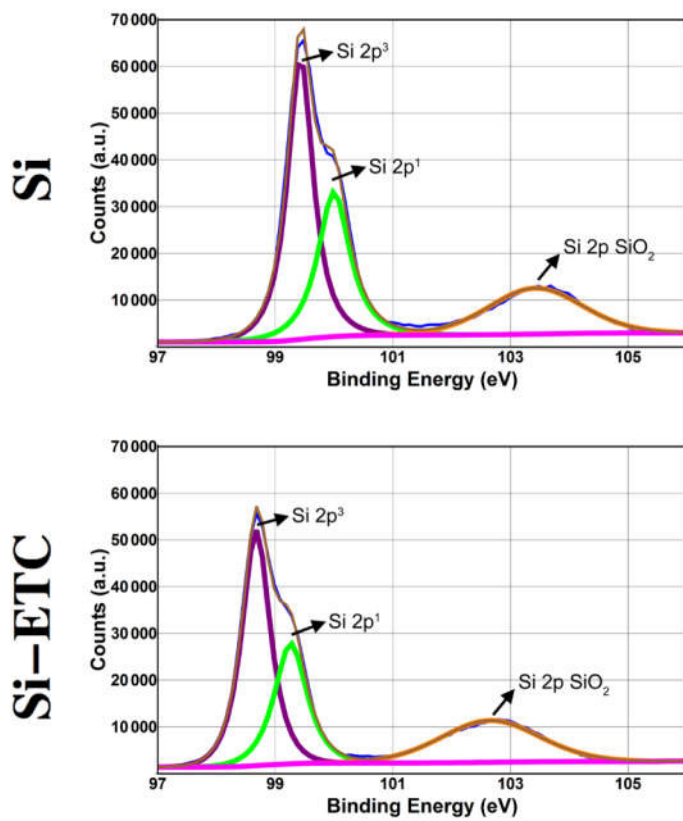
Uma degradação parcial dos filmes de silano foi observada em escalas de comprimento menores (mícrons) através de XPS (ver **Figura 29**). Espectros de alta resolução para fotoelétrons Si 2p indicaram uma diminuição da intensidade do pico em cerca de 102,7 eV, que está relacionado ao filme de silano, para as amostras Si-TMPS e Si-THSPMP. Esta diminuição ocorreu depois do processo de lavagem em PBS. Considerando que a degradação parcial do filme de silano nas amostras Si-TMPS e Si-THSPMP foi bastante similar (baseado nas áreas dos picos de XPS), a diferença observada em relação a estabilidade dos recobrimentos de Ag-

Glutinis pode ser associada à presença dos filmes de organossilano (TMPS ou THSPMP). De forma contrária, apenas uma pequena degradação foi observada para o filme de APTMS (ver **Figura 29**), confirmando que este filme é quimicamente estável em PBS.

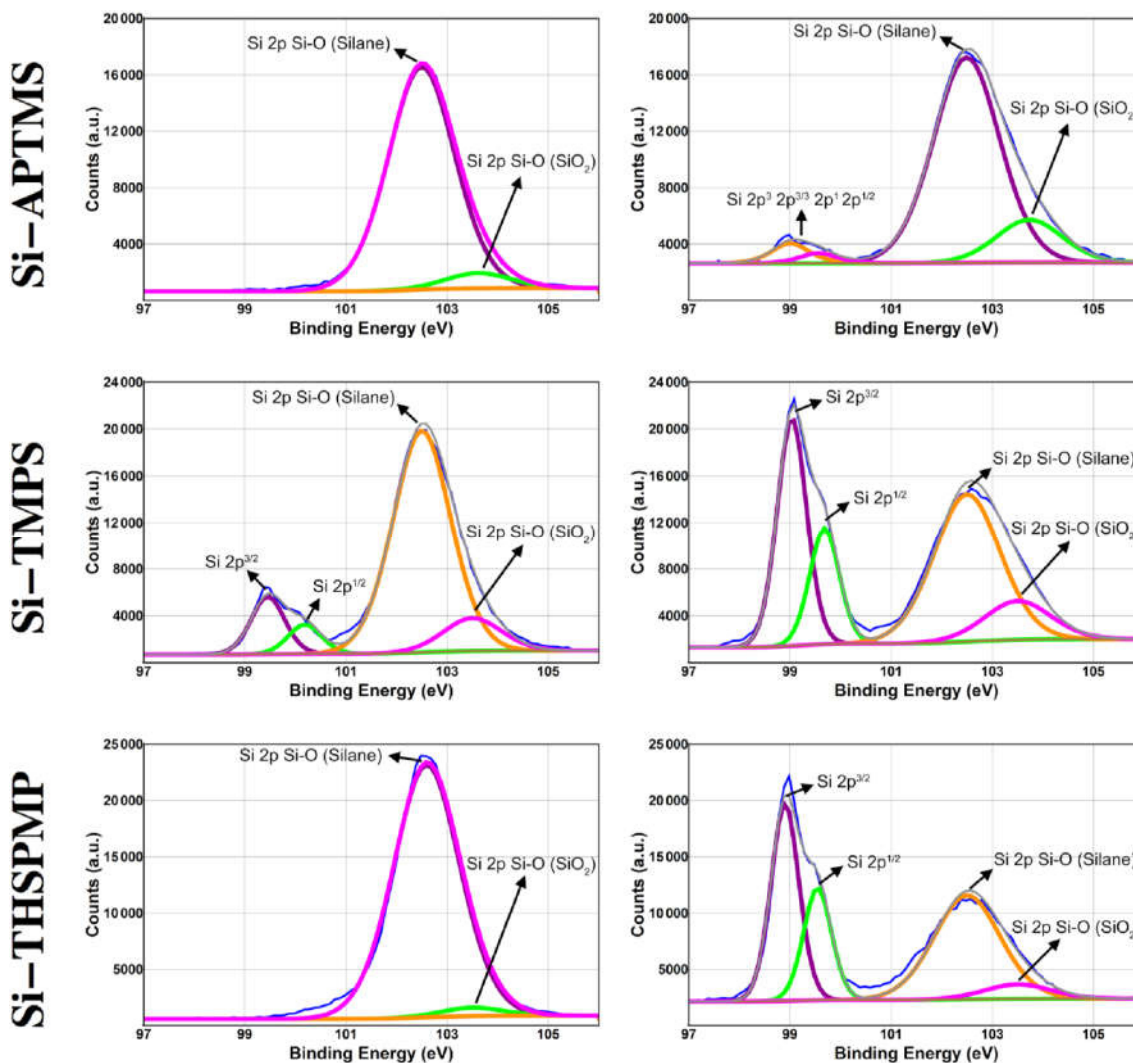
Filmes de silano em multicamadas como os produzidos geram superfícies adequadas e reproduzíveis para o estudo de como nanopartículas se organizam sobre superfícies sólidas. Considerando a variação de possíveis grupos moleculares que podem se ligar a monômeros de silício hidrolisáveis, existem várias possibilidades de ambientes químicos de superfície possíveis para design. Entretanto, há uma grande dificuldade em se obter filmes de silanos verdadeiramente empacotados, uma vez que a polimerização vertical entre camadas inorgânicas horizontais (por formação de ligações siloxano) pode ser dificultada por aspectos de carga e estereoquímicos (Chauhan *et al.*, 2008). Embora haja diversos trabalhos na literatura sobre filmes de silanos, a obtenção de filmes hidroliticamente estáveis ainda é um desafio. Filmes de silano são comumente degradados (i. e. hidrolisados) até em água deionizada em poucas horas (Liang *et al.*, 2014; Pasternack, Amy e Chabal, 2008; Zhu, Lerum e Chen, 2012). Desta forma, os filmes de organossilano gerados apresentam estabilidades químicas diferentes frente ao processo de lavagem (realizado em PBS), uma vez que os graus de empacotamento e polimerização são diferentes para cada tipo de amostra. Em escalas maiores de comprimento (i. e. milímetros), a degradação parcial dos filmes de silano depois da etapa de lavagem foi evidenciada por EDS em campo amplo principalmente para as amostras Si-TMPS e Si-THSPMP (ver picos para C e P nas **Figura 13** e **Figura 23**), enquanto a amostra Si-APTMS apresentou alta estabilidade. Juntamente com a polimerização horizontal entre as moléculas hidrolisadas de APTMS, a polimerização vertical do arranjo de multicamadas formado por estas moléculas pode ser facilitado por interações Coulômbicas entre camadas adjacentes, e por aspectos conformacionais relacionados ao grupo 3-aminopropil (Chauhan *et al.*, 2008). Conseqüentemente, mais ligações siloxano (Si-O-Si) podem ser formadas. Desta forma, o filme de APTMS produzido apresenta potencial como um recobrimento útil para diversas aplicações biotecnológicas que requerem estabilidade química e sítios reativos para formação de interação/ligação.



**Figura 28** - Espectros fotoeletrônicos de raios X do substrato bruto de SiO<sub>2</sub>/Si (Si) e SiO<sub>2</sub>/Si atacado (Si-ETC).



**Figura 29** - Espectros fotoeletrônicos de raios X dos substratos funcionalizados com silanos e recobertos com Ag-Glutinis, antes (primeira coluna) e após (segunda coluna) a imersão em PBS.



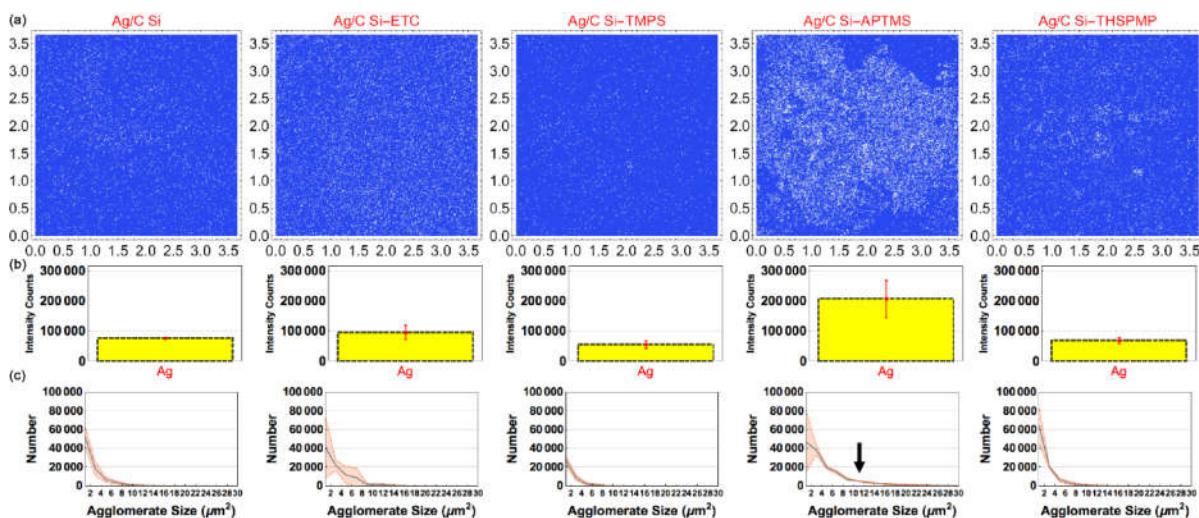
A vasta quantidade de dados coletados através das varreduras em campo amplo permitiram uma avaliação quantitativa e qualitativa bastante precisa das quantidades relativas de Ag-Glutinis presentes em cada amostra. Para a localização das Ag-Glutinis sobre a superfície, o sinal do pico de Ag obtido por EDS foi considerado em cada pixel do mapa elementar de Ag. Analisando todas as imagens processadas, foi observado que as Ag-Glutinis distribuíram-se por toda a superfície de todas as amostras (ver **Figura 30a**). Através da integração (i. e. soma) do sinal de EDS de Ag para os substratos inteiros, uma comparação quantitativa dos montantes de Ag-Glutinis pôde ser realizada (ver **Figura 30b**). Amostras Si-APTMS apresentaram uma maior quantidade de Ag-Glutinis (média de cerca de 200.000 contagens de intensidade) em comparação com outros tipos de amostras, ao passo que as amostras Si-TMPS tiveram a menor

densidade de nanopartículas (média de cerca de 50.000 contagens de intensidade). Entretanto, uma avaliação estatística por Análise de variância de um fator (ANOVA) com Teste de Tukey como pós-teste, não indicou diferenças estatísticas significantes em relação às quantidades de Ag-Glutinis nas amostras Si, Si-ETC, Si-TMPS e Si-THSPMP.

Além disso, as distribuições de tamanho dos aglomerados de Ag-Glutinis foram calculados nas imagens de campo amplo através da identificação de mais de 100000 elementos em cada imagem. Surpreendentemente, as funções de distribuição de tamanho de aglomerados (dados de 2 a 30  $\mu\text{m}^2$ ) foram bastante similar para todas as amostras (ver **Figura 30c**), com a maioria dos aglomerados situando-se em uma faixa de até 10  $\mu\text{m}^2$ . Entretanto, nas amostras Si-APTMS, a presença do filme de silano resultou em uma maior quantidade de aglomerados com tamanhos acima de 10  $\mu\text{m}^2$  (indicados na **Figura 30c** por uma seta preta). O principal efeito do filme de APTMS foi estabilizar estes grandes aglomerados, impedindo a sua desvinculação durante a imersão em PBS, modificando assim as características dos recobrimentos de Ag-Glutinis em comparação às outras amostras. Os grandes aglomerados (com mais de 10  $\mu\text{m}^2$ ) nas amostras Ag-APTMS foram responsáveis pelo maior sinal EDS de Ag obtido para estas amostras.

Deve-se considerar que a topografia dos substratos de  $\text{SiO}_2/\text{Si}$  foi modificada entre as amostras Si (substrato bruto) e Si-ETC, embora seus ambientes químicos superficiais sejam bastante similares (ver **Figura 28**). Entretanto, esta diferença na topografia (e pequena diferença na hidrofobicidade, ver **Tabela 5**) não resultou em variações significativas na distribuição das Ag-Glutinis bem como na concentração das nanopartículas de prata (ver **Figura 30b** e **Figura 30c**).

**Figura 30** - (a) Exemplos de mapas elementares utilizados nas análises quantitativas. (b) Quantidade relativa de Ag em diferentes amostras (c) Distribuição de tamanho dos aglomerados de Ag-Glutinis na superfície. Os mapas representam áreas de 3,6 x 3,6 mm.



#### 4.3.3 Análise do crescimento microbiano em diferentes superfícies por LF-CLSM

Quando em solução, AgNPs demonstram a capacidade de romper biofilmes microbianos estabelecidos. Nanopartículas de prata mostraram a capacidade de penetrar na matriz do biofilme de *S. aureus* e promover o rompimento da adesão celular, sendo capaz de erradicar o biofilme formado em até quase 80% (Goswami *et al.*, 2015). A utilização de AgNPs imobilizadas, entretanto, tem grande aplicação em próteses ósseas, aparelhos cirúrgicos, cateteres, sistemas de infusão, compósitos dentários, filtros, têxteis ou em sensoriamento. Para esses tipos de aplicações, é necessário que as nanopartículas sejam mantidas confinadas à superfície, exercendo sua atividade através da liberação de  $\text{Ag}^+$  e reduzindo a quantidade de prata utilizada, bem como o risco à exposição de materiais nanoparticulados desta natureza. Através da silanização, uma das técnicas mais utilizadas para modificação de superfícies, estas interfaces podem ser ajustadas de forma a adquirir tais propriedades (Agnihotri, Mukherjiabc e Mukherji, 2013; Pallavicini *et al.*, 2010).

Na literatura, há diversos trabalhos nos quais superfícies funcionalizadas com silanos foram capazes de reter AgNPs, apresentando efeito antimicrobiano (Agnihotri, Mukherjiabc e Mukherji, 2013; Pallavicini *et al.*, 2010; Taglietti *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2013). Silanos com grupos aminas, tióis, carboxilatos ou hidroxilas foram capazes de se ligar a AgNPs (Morrill *et al.*, 2009). AgNPs em suspensão coloidal foram imobilizadas para recobrimento de vidros funcionalizados com mercaptossilano, através de ligações com os grupos -SH. A imobilização

se deu por imersão (durante 18 horas) da superfície em suspensão contendo as nanopartículas, resultando em  $0,357 \mu\text{g cm}^{-2}$  de prata. A estabilidade do recobrimento foi avaliada em água e PBS em um período de 19 dias, apenas 15% da quantidade total de prata foi liberada para a solução. Em testes realizados em tampão PBS, verificou-se que os recobrimentos apresentaram forte atividade antibacteriana em 24 horas de exposição contra *S. aureus* e *E. coli*, reduzindo em cinco ordens de grandeza o número de bactérias viáveis, quando comparados à condição controle (Pallavicini *et al.*, 2010)

Entretanto, a ligação S-Ag, embora seja forte em água pura, pode ser desfeita por condições redutoras dos ambientes fisiológicos, ao contrário da interação  $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+ - \text{Ag}$ , por exemplo. A utilização de grupos amina em superfície foi capaz de proporcionar uma densidade de deposição de prata no mínimo 10 vezes maior, quando comparado a superfícies modificadas com tiol (Agnihotri, Mukherjiabc e Mukherji, 2013; Taglietti *et al.*, 2014). Diversos trabalhos demonstram a capacidade de grupos  $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$  constituírem eficazes recobrimentos de AgNPs.

Nanopartículas de prata foram utilizadas para decorar cerâmicas porosas funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) através de imersão em prata coloidal por 24 horas. O recobrimento apresentou partículas de 10-20 nm distribuídas uniformemente, com algumas ilhas de 20-80 nm de diâmetro. O conteúdo de nanopartículas foi estimado em  $44 \mu\text{g cm}^{-2}$ , resultando em forte capacidade antibacterianas (contra *E. coli*) do material. Quando utilizado como filtro de água, este material apresentou uma baixa perda de nanopartículas (Lv *et al.*, 2009). Nanopartículas de prata estabilizadas por ácido mercaptosuccínico foram depositadas sobre filmes poliméricos finos de alilamina que recobriam diferentes tipos de substratos (lamínulas de vidro, lamínulas Thermanox e substratos de silício). O filme de alilamina depositado apresentou cerca de 24 nm de espessura, estando repleto de grupos  $\text{NH}_3^+$  em sua superfície. As AgNPs foram depositadas através da imersão em solução que as continha por até 24 horas, apresentando uma concentração elementar superficial de até 15% em relação a massa superficial total. Os recobrimentos retiveram cerca de 20% da concentração inicial de prata quando imersos em água deionizada por 30 dias. As superfícies funcionalizadas por este método apresentaram redução na formação de biofilme de 96% (para *Staphylococcus epidermidis*), 80% (para *S. aureus*) e 96% (para *Pseudomonas aeruginosa*) (Taheri *et al.*, 2014). Nanopartículas de prata estabilizadas por citrato foram imobilizadas em vidro funcionalizado com 3-(aminoetilaminopropil)trimetóxi-silano (AEAPTMS) por imersão *overnight* em solução. As AgNPs foram uniformemente imobilizadas em vidro apresentando uma variação de tamanho de 10-15 nm com poucos aglomerados com tamanho de 40-60 nm. A superfície obtida apresentou ainda uma rugosidade média quadrada (RMS) de 3,2 nm, contendo

35% de prata em massa total ( $3,26 \mu\text{g cm}^{-2}$ ). Em estudos de desinfecção, os vidros com recobrimento de AgNPs foram mantidos em suspensão microbiana, sendo capazes de reduzir a carga microbiana total de *E. coli* e *B. subtilis* em 100% em até 120 minutos de incubação. O recobrimento obtido mostrou-se ainda extremamente estável, não apresentando lixiviação significativa e mantendo a atividade antibacteriana (em testes feitos em água deionizada) mesmo depois de diversos reusos (Agnihotri, Mukherjiabc e Mukherji, 2013). Vidros funcionalizados com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) foram recobertos por AgNPs através de imersão em solução por 15 minutos. O recobrimento obtido apresentou uma quantidade de prata de  $73 \mu\text{g cm}^{-2}$ , sendo capaz de reduzir o número de *Staphylococcus epidermidis* em cinco ordens de grandeza e impedindo a formação de biofilme, para um período de exposição de 24 horas em meio de cultura (Taglietti *et al.*, 2014). Nanopartículas de prata negativamente carregadas e estabilizadas por citrato foram utilizadas para recobrimento de ligas de magnésio funcionalizadas com APTMS. As ligas funcionalizadas e recobertas apresentaram a capacidade de inibir o crescimento de *E. coli* (Zeng *et al.*, 2013). Um resumo dos trabalhos descritos acima encontra-se na **Tabela 7**.

**Tabela 7** - Resumo dos trabalhos de imobilização de AgNPs em superfícies com grupos  $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ .

Referência	Material	Agente funcionalizante	Atividade antimicrobiana contra:
<b>Lv et al., 2009</b>	Cerâmica porosa	APTES	<i>E. coli</i>
<b>Taheri et al., 2014</b>	Lamínulas de vidro, lamínulas Thermanox e substratos de silício	Alilamina	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
<b>Agnihotri, Mukherjiabc e Mukherji, 2013</b>	Vidro	AEAPTMS	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>
<b>Taglietti et al., 2014</b>	Vidro	APTES	<i>S. epidermidis</i>
<b>Zeng et al., 2013</b>	Ligas de magnésio	APTMS	<i>E. coli</i>

Através dos resultados descritos, fica evidente a capacidade que filmes de aminosilanos auxiliarem no recobrimento de superfícies com AgNPs. Embora as avaliações dos recobrimentos se restrinjam a escalas nanométricas de comprimento, a capacidade antimicrobiana, bem como a capacidade de confinamento e retenção de AgNPs nessa escala pôde ser constatada. Nestes trabalhos, as nanopartículas tenderam a se dispersar em formas unitárias ou formando aglomerados de poucas partículas.

No presente Trabalho, as propriedades antiaderentes e antimicrobianas dos recobrimentos de AgNPs foram testadas frente a uma cepa de *Staphylococcus aureus*. As imagens adquiridas por microscopia confocal de varredura a laser em campo amplo (LF-CLSM) apresentaram mais de 10.000 elementos (i.e. bactérias), o que permitiram uma avaliação precisa das quantidades de bactérias vivas e mortas aderidas aos substratos. Na **Figura 31**, encontram-se exemplos das imagens obtidas. Nas imagens mostradas, apenas 1 dos 36 campos que cada imagem contém está representado. Em comparação com os substratos brutos de SiO<sub>2</sub>/Si, as amostras Si GC, Si GS, Si Rg, Si Rm e Si APTMS Rg apresentaram mais bactérias aderidas. Este fato pode estar relacionado com a criação de sítios de adesão a partir do aumento da rugosidade da superfície pela deposição das nanopartículas de prata. Para os recobrimentos de bio-AgNPs em especial, há a formação de uma matriz carbonácea macia durante a secagem do agente de estabilização das partículas (proteínas, principalmente). Como visto na **Figura 22**, AgNPs biogênicas estão embutidas em uma grande matriz de carbono formada pelas biomoléculas que agem como estabilizantes na superfície das partículas. Além disso, o aumento da quantidade de AgNPs em virtude da presença do filme de APTMS não resultou em uma maior eficiência da ação antimicrobiana.

No que diz respeito à eficiência relativa dos recobrimentos de AgNPs, observou-se que as nanopartículas sintéticas tiveram a menor taxa de bactérias vivas/bactérias mortas aderidas quando comparadas às AgNPs biogênicas. No geral, os resultados apresentados mostram que um excesso de matéria orgânica (advinda dos agentes estabilizantes) presentes no recobrimento obtido (após a secagem das AgNPs sobre a superfície) pode prejudicar a solubilização das nanopartículas e a difusão de Ag<sup>+</sup> em direção às células bacterianas e biofilmes. Agentes estabilizantes pequenos (como citrato e SDS) resultaram em uma menor relação bactérias vivas/bactérias mortas (i. e. maior eficiência, ver **Figura 32** e **Figura 33**). Como previamente relatado, para AgNPs de formato esférico ou *quasi*-esférico, nanopartículas menores dissolvem e liberam íons Ag<sup>+</sup> mais facilmente (Ouay, Le e Stellacci, 2015). Neste trabalho, este aspecto favoreceria a atividade antimicrobiana dos recobrimentos formados pelas AgNPs biogênicas, quando comparados aos recobrimentos obtidos pelas AgNPs sintéticas. Este é um fato que também apoia a hipótese que a matriz carbonácea, na qual as AgNPs estão incorporadas nas amostras Ag-Glutinis e Ag-Mucilaginosa, estaria impedindo a difusão e dissolução das nanopartículas.

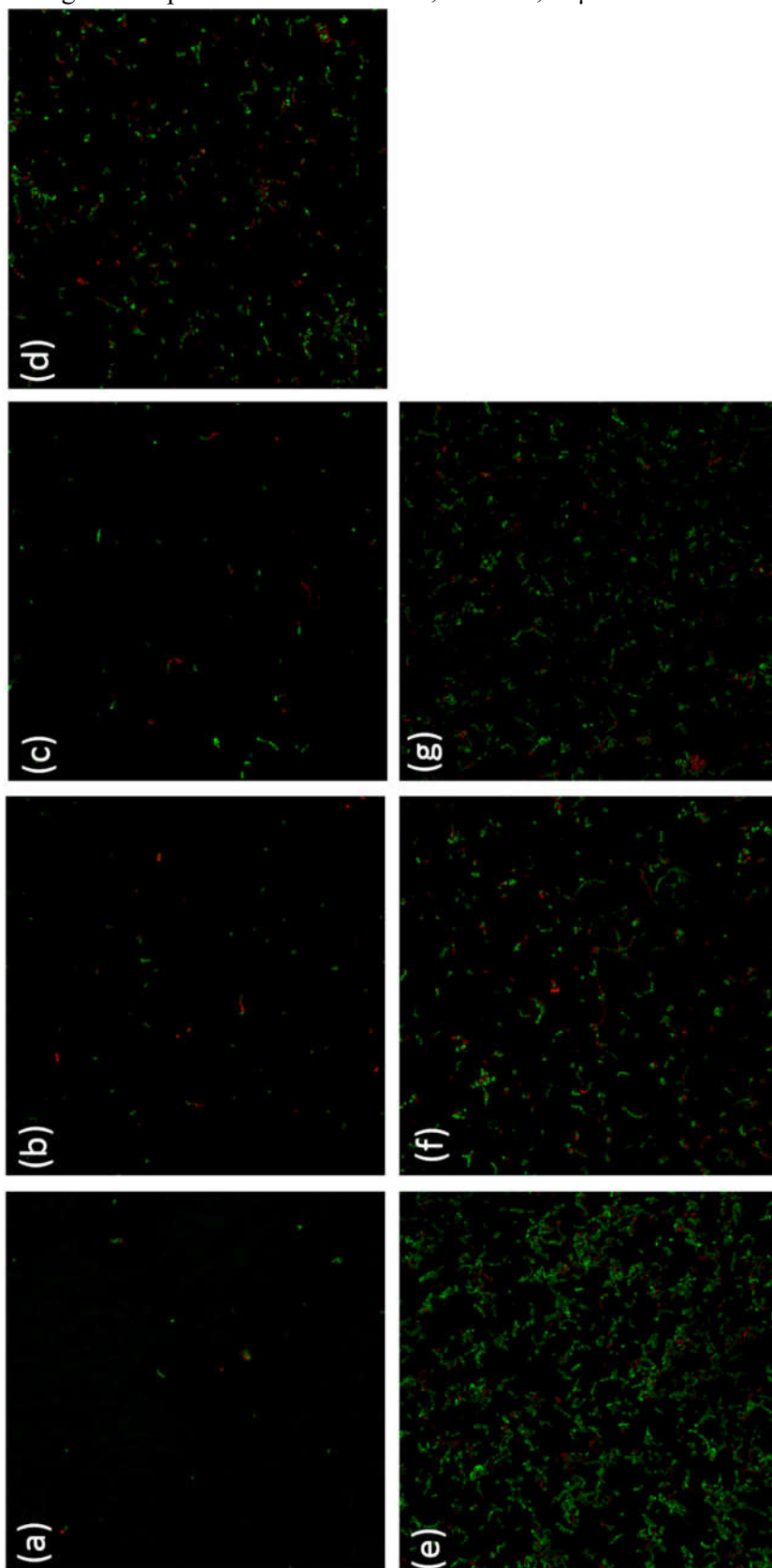
Outro indicativo para esta hipótese tem a ver com o papel dos sais presentes nas soluções utilizadas com as AgNPs (durante o processo de produção dos recobrimentos de AgNPs, teste de estabilidade dos filmes com recobrimentos e durante o processo de incubação). Sabe-se que

a presença de haletos (como fluoreto e cloreto) em solução pode levar à precipitação de sais de prata, prejudicando a atividade antibacteriana. Entretanto, para altas concentrações de cloreto (ex.: 0,5 mol/L), a dissolução de  $\text{Ag}^+$  se mantém, em virtude da formação de complexos de policloretos de prata (  $[\text{AgCl}_2]^-$ ,  $[\text{AgCl}_3]^{2-}$ ,  $[\text{AgCl}_4]^{3-}$  ) (Levard *et al.*, 2013). Além disso, na presença de cloreto em solução, fosfato de prata não é formado, diminuindo a possibilidade de precipitação por esta via (Loza *et al.*, 2014). O caldo BHI, na qual a avaliação de formação de biofilme foi realizada, e a solução PBS, utilizada na avaliação de estabilidade dos filmes, embora apresentem sais de fosfato em sua composição, possuem concentrações de sais cloreto (NaCl) em grandes níveis (BHI = 0,086 mol L<sup>-1</sup> e PBS = 0,155 mol L<sup>-1</sup>). Nessas concentrações, embora haja uma dramática queda na dissolução de  $\text{Ag}^+$ , atividade antibacteriana ainda seria mantida em virtude da formação das espécies de policloretos de prata. Em meio biológico, como no caso do caldo BHI, a presença de moléculas orgânicas pode resultar ainda em uma aceleração da dissolução, uma vez que estas moléculas também promovem a formação de complexos de íons de prata (Levard *et al.*, 2013; Loza *et al.*, 2014).

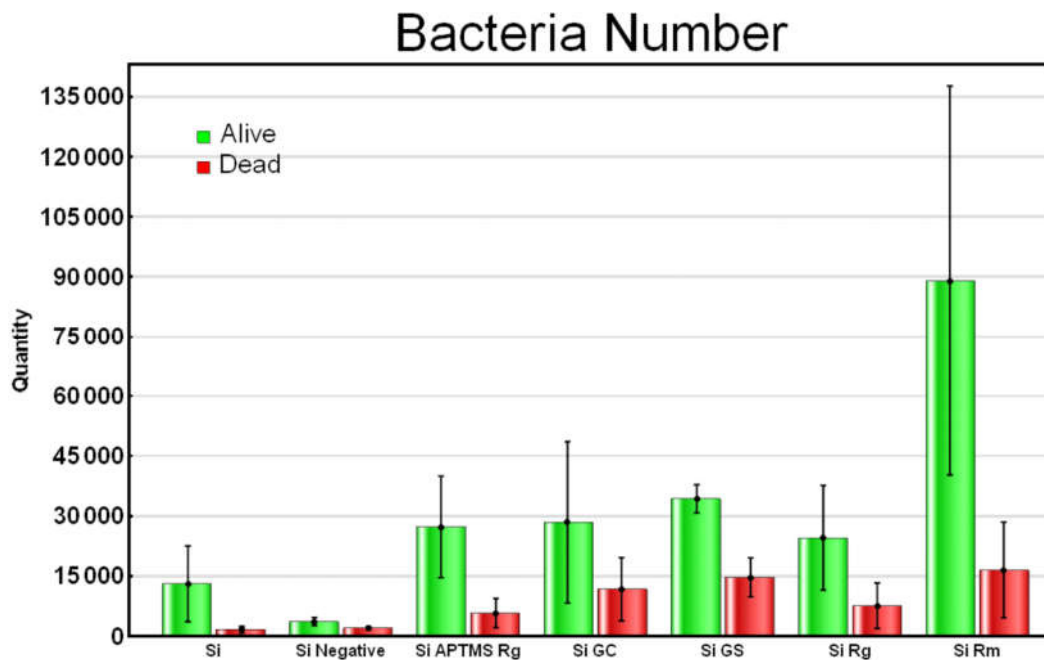
Finalmente, é importante mencionar que as propriedades antimicrobianas determinadas quando a nanopartículas está suspensa em meio líquido (ex.: concentração inibitória mínima (MIC), concentração bactericida mínima (MBC)) podem ser muito diferentes daquilo observado quando as nanopartículas estão imobilizadas e estabilizadas em uma superfície sólida (ex.: anti-aderência, anti-incrustação, anti-biofilme). Um aspecto que deve ser investigado com mais detalhes é como a dissolução das AgNPs, formação de camadas de passivação, redeposição de prata e formação de material de ligação entre as partículas (ex.: matriz orgânica) influenciariam nas propriedades anti-incrustação e anti-biofilme dos recobrimentos de prata em múltiplas escalas de comprimento (Ouay, Le e Stellacci, 2015).



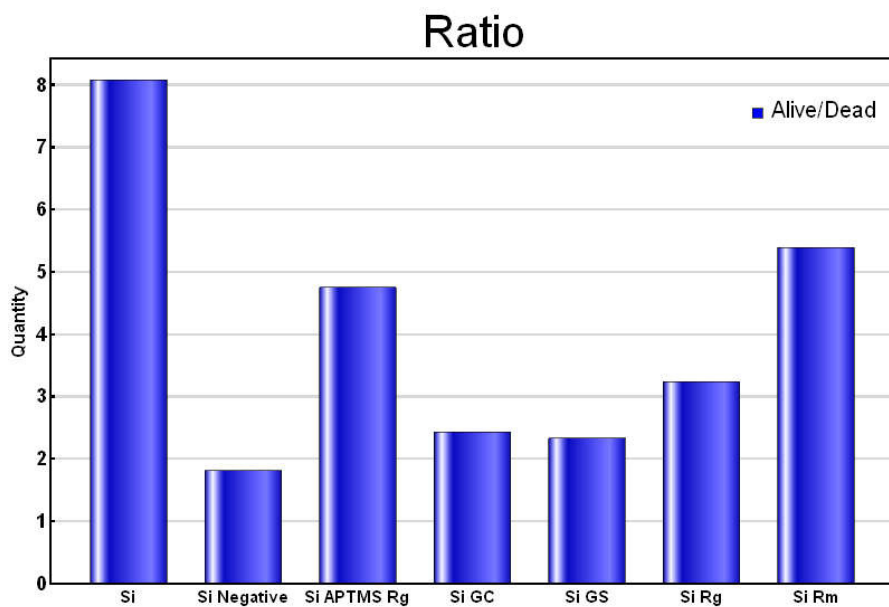
**Figura 31** - Micrografias obtidas por LSCM. *S. aureus* aderidas em (a) Si, (b) Si negative, 88  
(c) Si GS, (d) Si GC, (e) Si RM, (f) Si RG e (g) Si APTMS RG em 24 h de contato. As  
micrografias representam áreas de 169,87 x 169,87  $\mu\text{m}$ .



**Figura 32** - Número de bactérias (*S. aureus*) mortas e vivas aderidas aos substratos de Si após 24 horas de incubação.



**Figura 33** - Razão entre bactérias vivas e bactérias mortas aderidas aos substratos de Si em 24 horas de incubação.



## 5 CONCLUSÕES

O imageamento de raios X em campo amplo usado permitiu comparar a estabilidade de recobrimentos de AgNPs em amplas escalas de comprimento (até milímetros). Os recobrimentos formados por partículas sintéticas, estabilizadas por citrato ou dodecil sulfato, e biogênicas (produzidas através dos extratos das leveduras *R. glutinis* e *R. mucilaginosa*) foram quantitativamente comparadas em relação ao montante de AgNPs recobrimdo a superfície, assim como às funções de distribuição de tamanho. Todas as partículas utilizadas foram capazes de aderir aos substratos de SiO<sub>2</sub>/Si e resistiram à imersão em PBS com a formação de aglomerados de até 10 µm<sup>2</sup>. As funções de distribuição resultantes para os aglomerados de AgNPs foram bastante similares para todos os recobrimentos analisados. Este fato indica que os mecanismos relacionados à formação dos aglomerados em PBS dependem muito pouco da morfologia ou agente superficial de estabilização da nanopartícula. Além disso, o montante de AgNPs identificadas nos recobrimentos depois da imersão em PBS foi similar para as amostras Ag-Glu-Citrate, Ag-Glutinis e Ag-Mucilaginosa, enquanto as amostras Ag-Glu-SDS tiveram um montante de partículas levemente superior. A abordagem apresentada aqui para o estudo de recobrimentos de AgNPs pode ser aplicada para outros tipos de nanopartículas de importância científica ou tecnológica, cujas propriedades (elétricas, químicas, biológicas) se manifestem em amplas escalas de comprimento.

Em relação aos recobrimentos de Ag-Glutinis em diferentes ambientes microquímicos, verificou-se que a estabilidade química dos recobrimentos formados variou em função do ambiente em que as partículas foram depositadas. Este efeito foi observado para recobrimentos de nanopartículas que permaneceram aderidas aos substratos depois de imersão em PBS. Ag-Glutinis distribuíram-se de forma homogênea a escala milimétrica em todos os substratos testados: substratos de Si/SiO<sub>2</sub> recoberto com grupos silanol (Si-ETC) e modificados por silanos (TMPS, APTMS, THSPMP). Uma quantidade similar de Ag-Glutinis (e seus aglomerados) foi encontrada em todos os substratos, com exceção daqueles cobertos por um espesso filme multicamadas (~ 80 nm) de APTMS. Neste filme, as nanopartículas encontraram-se distribuídas em uma quantidade muito maior. Em relação a morfologia do recobrimento obtido com a presença do filme de APTMS, em comparação com os outros filmes, estabilizou grandes aglomerados de Ag-Glutinis, da ordem de 8-30 µm<sup>2</sup>. Aglomerados dessa magnitude não foram observados nas outras amostras, onde tiveram tamanho de até 10 µm<sup>2</sup>. Com base nessas observações, revela-se que modificações de superfície com filmes multicamadas de

silanos tem potencial para gerar recobrimentos estáveis com nanopartículas de prata carregadas negativamente, mesmo quando expostos a meios de alta força iônica. Estes resultados apresentam relevância para aplicações biotecnológicas como em sensores, implantes e biocatálise, uma vez que os recobrimentos à base de AgNPs devem resistir em meio fisiológico que comumente provocam a desvinculação das nanopartículas aderidas.

A análise de adesão e crescimento microbiano em diferentes topografias mostrou que *S. aureus* apresentou maior adesão e crescimento em superfícies de silício com  $R_a$  de cerca de 7 nm. A presença de estruturas extracelulares pode contribuir para este aumento de adesão.

Em relação às propriedades antimicrobianas, os recobrimentos de nanopartículas sintéticas tiveram uma maior eficiência contra *S. aureus*. Este resultado pode estar associado às diferenças nos mecanismos de dissolução e liberação de  $Ag^+$  dos recobrimentos, que podem ser limitados pela matriz mole formada pelos agentes de estabilização durante a secagem das nanopartículas na superfície, especialmente as biogênicas. Além disso, a maior quantidade de AgNPs nas amostras com filme de APTMS não resultou em uma maior eficácia na ação antibacteriana. Por fim, nenhum dos recobrimentos foi capaz de impedir a colonização bacteriana das superfícies.

## 6 PERSPECTIVAS

Embora a utilização de padrões topográficos regulares seja bastante promissor na elaboração de superfícies anti-aderentes, a avaliação da adesão bacteriana em superfícies com topografia gerada de maneira aleatória é necessária para a compreensão do processo adesão em si, bem como no conhecimento do comportamento microbiano em superfícies reais. Para a elaboração de materiais com propriedades anti-adesivas para bactérias, deve-se buscar a caracterização de superfícies além dos parâmetros de rugosidade mais simples. Além disso, deve-se explorar a compreensão da termodinâmica envolvida no processo através de caracterizações físico-químicas das superfícies e bactérias, bem como investigar este processo dos pontos de vista bioquímico e genômico.

Para otimização da dispersão do recobrimento, outras estratégias para dispersão das AgNPs sobre as superfícies funcionalizadas devem ser exploradas (ex.: imersão em solução com AgNPs por um período de tempo determinado). Para melhor avaliação dos mecanismos de liberação de  $Ag^+$ , estudos posteriores devem focar na avaliação da quantidade de íons liberados durante o passar do tempo. Além disso, uma vez que diversas formas de avaliação de atividade antimicrobiana estão disponíveis na literatura, a otimização destes ensaios deve ser realizada. O alto desvio padrão intra-tratamento, indica também a necessidade da realização de ensaios antimicrobianos com maiores grupos amostrais, para obtenção de resultados com maior poder estatístico.

## REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Immobilized silver nanoparticles enhance contact killing and show highest efficacy : elucidation of the mechanism of bactericidal action of silver. **Nanoscale**, v. 5, p. 7328–7340, 2013.
- AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y.-S. Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 1, p. 591–602, 2013.
- ALAM, F.; BALANI, K. Adhesion force of staphylococcus aureus on various biomaterial surfaces. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 872–880, 2017.
- ANSELME, K. *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.
- APTE, M. *et al.* Psychrotrophic yeast *Yarrowia lipolytica* NCYC 789 mediates the synthesis of antimicrobial silver nanoparticles via cell-associated melanin. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 32, 2013.
- BAGWE, R. P.; HILLIARD, L. R.; TAN, W. H. Surface modification of silica nanoparticles to reduce aggregation and nonspecific binding. **Langmuir**, v. 22, n. 9, p. 4357–4362, 2006.
- BARRY, C. R.; GU, J.; JACOBS, H. O. Charging process and Coulomb-force-directed printing of nanoparticles with sub-100-nm lateral resolution. **Nano Letters**, v. 5, n. 10, p. 2078–2084, 2005.
- BEGUM, N. A. *et al.* Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, n. 1, p. 113–118, 2009.
- CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8533–8554, 2013.
- CHAN, Y. S.; MAT DON, M. Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 1, p. 282–288, 2013.
- CHAUHAN, A. K. *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, C. F. *et al.* Electrostatic assembly of gold colloidal nanoparticles on organosilane monolayers patterned by microcontact electrochemical conversion. **Langmuir**, v. 22, n. 18, p. 7819–7824, 2006.
- CHUNG, I.-M. *et al.* Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic

Properties and Therapeutic Applications. **Nanoscale research letters**, v. 11, n. 1, p. 40, 2016.

CRAWFORD, R. J. *et al.* Surface topographical factors influencing bacterial attachment.

**Advances in Colloid and Interface Science**, v. 179–182, p. 142–149, 2012.

DEETZ, J. D.; NGO, Q.; FALLER, R. Reactive Molecular Dynamics Simulations of the Silanization of Silica Substrates by Methoxysilanes and Hydroxysilanes. **Langmuir**, v. 32, n. 28, p. 7045–7055, 2016.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881–890, 2002.

DU, L. *et al.* Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue.

**Materials Chemistry and Physics**, v. 160, p. 40–47, 2015.

DURÁN, N. *et al.* Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of nanobiotechnology**, v. 3, p. 1–7, 2005.

DURÁN, N. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 3, n. 2, p. 203–208, 2007.

DURÁN, N. *et al.* Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 5, p. 1609–1624, 2011.

DURÁN, N. *et al.* Silver Nanoparticles: A New View on Mechanistic Aspects on Antimicrobial Activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 3, p. 789–799, 2015.

EBY, D. M.; LUCKARIFT, H. R.; JOHNSON, G. R. Hybrid Antimicrobial Enzyme and Silver Nanoparticle Coatings for Medical Instruments. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 1, n. 7, p. 1553–1560, 2009.

ENDERS, D. *et al.* Surface enhanced infrared absorption on Au nanoparticle films deposited on SiO<sub>2</sub>/Si for optical biosensing: Detection of the antibody-antigen reaction. **Surface Science**, v. 600, n. 23, p. 30–32, 2006.

FARIA, A. F. DE *et al.* Eco-friendly decoration of graphene oxide with biogenic silver nanoparticles: antibacterial and antibiofilm activity. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 2, p. 2110, 2014.

FOLDBJERG, R. *et al.* PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 2, p. 156–162, 2009.

- GADELMAWLA, E. S. *et al.* Roughness parameters. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 123, n. 1, p. 133–145, 2002.
- GAIKWAD, S. C. *et al.* Screening of different Fusarium species to select potential species for the synthesis of silver nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1974–1982, 2013.
- GALLO, A. L. *et al.* Efficacy of silver coated surgical sutures on bacterial contamination, cellular response and wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 69, p. 884–893, 2016.
- 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.
- GEETHALAKSHMI, R.; SARADA, D. V. L. Gold and silver nanoparticles from *Trianthema decandra*: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5375–5384, 2012.
- GENG, X. *et al.* Fabrication of antireflective layers on silicon using metal-assisted chemical etching with in situ deposition of silver nanoparticle catalysts. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 103, p. 98–107, 2012.
- GOSÁLVEZ, M. A.; ZUBEL, I.; VIINIKKA, E. Chapter Twenty Four - Wet Etching of Silicon. *In*: LINDROOS, V. *et al.* (Eds.). . **Handbook of Silicon Based {MEMS} Materials and Technologies**. Micro and Nano Technologies. Boston: William Andrew Publishing, 2010. p. 375–407.
- GOSWAMI, S. R. *et al.* Role of biogenic silver nanoparticles in disruption of cell-cell adhesion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilm. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 26, p. 73–80, 2015.
- GRAHAM, M.; CADY, N. Nano and Microscale Topographies for the Prevention of Bacterial Surface Fouling. **Coatings**, v. 4, n. 1, p. 37–59, 2014.
- GRAHAM, M. V. M. V. . *et al.* Development of antifouling surfaces to reduce bacterial attachment. **Soft Matter**, v. 9, n. 27, p. 6235, 2013.
- HADIOUI, M.; LECLERC, S.; WILKINSON, K. J. Multimethod quantification of Ag<sup>+</sup> release from nanosilver. **Talanta**, v. 105, p. 15–19, 2013.
- HASAN, J.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 295–304, 2013.
- HELBIG, R. *et al.* The impact of structure dimensions on initial bacterial adhesion. **Biomater. Sci.**, v. 4, n. 7, p. 1074–1078, 2016.
- HENGLEIN, A.; GIERSIG, M. Formation of colloidal silver nanoparticles: capping action of



- citrate. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 44, p. 9533–9539, 1999.
- HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424–434, 2010.
- HUO, S. J. *et al.* Seeded-growth approach to fabrication of silver nanoparticle films on silicon for electrochemical ATR surface-enhanced IR absorption spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 51, p. 25721–25728, 2006.
- IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, p. 2638, 2011.
- JAIN, N. *et al.* Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: a mechanism perspective. **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 635–641, 2011.
- JO, Y. K. *et al.* Surface-Independent Antibacterial Coating Using Silver Nanoparticle-Generating Engineered Mussel Glue. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 22, p. 20242–20253, 2014.
- KALER, A.; JAIN, S.; BANERJEE, U. C. Green and rapid synthesis of anticancerous silver nanoparticles by *Saccharomyces boulardii* and insight into mechanism of nanoparticle synthesis. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- KANG, F.; ALVAREZ, P. J. J.; ZHU, D. Microbial Extracellular Polymeric Substances Reduce Ag<sup>+</sup> to Silver Nanoparticles and Antagonize Bactericidal Activity. **Environmental science & technology**, v. 48, p. 316–322, 2014.
- KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions - True Open Access. **European Cells and Materials**, v. 8, n. August, p. 37–57, 2004.
- KVÍTEK, L. *et al.* Effect of surfactants and polymers on stability and antibacterial activity of silver nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 15, p. 5825–5834, 2008.
- KYAW, H. H. *et al.* Self-organization of gold nanoparticles on silanated surfaces. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 6, p. 2345–2353, 2015.
- LEUNG, K.; NIELSEN, I. M. B.; CRISCENTI, L. J. Elucidating the bimodal acid–base behavior of the water–silica interface from first principles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 51, p. 18358–18365, 2009.
- LEVARD, C. *et al.* Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 11, p. 5738–5745, 2013.
- LI, S. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. **Green Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 852, 2007.

- LIANG, W.; CHURCH, T. L.; HARRIS, A. T. Biogenic synthesis of photocatalytically active Ag/TiO<sub>2</sub> and Au/TiO<sub>2</sub> composites. **Green Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 968, 2012.
- LIANG, Y. *et al.* Molecular layer deposition of APTES on silicon nanowire biosensors: Surface characterization, stability and pH response. **Applied Surface Science**, v. 322, p. 202–208, 2014.
- LOZA, K. *et al.* The dissolution and biological effects of silver nanoparticles in biological media. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, p. 1634, 2014.
- LV, M. *et al.* Long-term antimicrobial effect of silicon nanowires decorated with silver nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 22, n. 48, p. 5463–5467, 2010.
- LV, Y. *et al.* Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 331, p. 50–56, 2009.
- MADDEN, O. *et al.* Mycofabrication of common plasmonic colloids, theoretical considerations, mechanism and potential applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 225, p. 37–52, 2015.
- MALLMANN, E. J. J. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 57, n. 2, p. 165–167, 2015.
- MARTINEZ, R. V. *et al.* Large-scale nanopatterning of single proteins used as carriers of magnetic nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 22, n. 5, p. 588–591, 2010.
- MATERNE, T.; BUYL, F. DE; WITUCKI, G. L. Organosilane Technology in Coating Applications : Review and Perspectives. **Dow Corning**, p. 16, 2012.
- MEBERT, A. M. *et al.* Chapter 5 - Surface chemistry of nanobiomaterials with antimicrobial activity\*. *In*: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). . **Surface Chemistry of Nanobiomaterials**. [s.l.] William Andrew Publishing, 2016. p. 135–162.
- MEI, L. . B *et al.* Influence of surface roughness on streptococcal adhesion forces to composite resins. **Dental Materials**, v. 27, n. 8, p. 770–778, 2011.
- MITIK-DINEVA, N. *et al.* Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus aureus Attachment Patterns on Glass Surfaces with Nanoscale Roughness. **Current Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 268–273, 2009.
- MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: Technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 3, p. 507–517, 2008.
- MORRILL, A. R. *et al.* Imaging 3-aminopropyltriethoxysilane self-assembled monolayers on nanostructured titania and tin (IV) oxide nanowires using colloidal silver nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 473, n. 1–3, p. 116–119, 2009.

- NABIKHAN, A. *et al.* Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, n. 2, p. 488–493, 2010.
- NARAYANAN, K. B.; PARK, H. H.; SAKTHIVEL, N. Extracellular synthesis of mycogenic silver nanoparticles by *Cylindrocladium floridanum* and its homogeneous catalytic degradation of 4-nitrophenol. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 116, p. 485–490, 2013.
- NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using the leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. **Materials Research Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1708–1713, 2011.
- OLIVEIRA, N. C. *et al.* Large-Field Electron Imaging and X-ray Elemental Mapping Unveil the Morphology, Structure, and Fractal Features of a Cretaceous Fossil at the Centimeter Scale. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 19, p. 10088–10095, 2015.
- OUAY, B. LE; STELLACCI, F. Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight. **Nano Today**, v. 10, n. 3, p. 339–354, 2015.
- PADOVANI, G. C. *et al.* Mechanisms of Colloidal Stabilization of Oxidized Nanocarbons in the Presence of Polymers: Obtaining Highly Stable Colloids in Physiological Media. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, p. 18741–18752, 2015.
- PALLAVICINI, P. *et al.* Self-assembled monolayers of silver nanoparticles firmly grafted on glass surfaces: Low Ag<sup>+</sup> release for an efficient antibacterial activity. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 350, n. 1, p. 110–116, 2010.
- PASTERNAK, R. M.; AMY, S. R.; CHABAL, Y. J. Attachment of 3-(Aminopropyl)triethoxysilane on Silicon Oxide Surfaces: Dependence on Solution Temperature. **Langmuir**, v. 24, n. 22, p. 12963–12971, 2008.
- PAULA, A. J. *et al.* Towards long-term colloidal stability of silica-based nanocarriers for hydrophobic molecules: beyond the Stöber method. **Chemical communications**, v. 48, n. 4, p. 591–3, jan. 2012.
- PAULA, A. J. *et al.* Influence of protein corona on the transport of molecules into cells by mesoporous silica nanoparticles. **ACS applied materials & interfaces**, v. 5, n. 17, p. 8387–93, set. 2013.
- PAULA, A. J. *et al.* Topography-driven bionano-interactions on colloidal silica nanoparticles. **ACS applied materials & interfaces**, v. 6, n. 5, p. 3437–47, mar. 2014.
- PERERA-COSTA, D. *et al.* Studying the influence of surface topography on bacterial adhesion using spatially organized microtopographic surface patterns. **Langmuir**, v. 30, n. 16,

p. 4633–4641, 2014.

PUDDU, V.; PERRY, C. C. Peptide Adsorption on Silica Nanoparticles: Evidence of Hydrophobic Interactions. **ACS Nano**, v. 6, n. 7, p. 6356–6363, 2012.

RIZZELLO, L. *et al.* **Nanomaterials can influence living biological systems with nanometer sensitivity** Technical Proceedings of the 2011 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2011. **Anais...** Boston, MA: 2011 Disponível em:

<<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

81455142952&partnerID=40&md5=ccef4172fa82d3a6d49c7559934c1ac5>

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

ROACH, P.; FARRAR, D.; PERRY, C. C. Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 22, p. 8168–73, jun. 2005.

SATYAVANI, K. *et al.* Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 43, 2011.

SEIDEL, H. *et al.* Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline Solutions. v. 137, n. 11, p. 3612–3626, 1990.

SIDOROV, A. N. *et al.* A surface-enhanced Raman spectroscopy study of thin graphene sheets functionalized with gold and silver nanostructures by seed-mediated growth. **Carbon**, v. 50, n. 2, p. 699–705, 2012.

SILEIKA, T. S. *et al.* Antibacterial performance of polydopamine-modified polymer surfaces containing passive and active components. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 12, p. 4602–4610, 2011.

SINGH, R. *et al.* Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 11, p. 4579–4593, 2015.

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

STALDER, A. F. *et al.* A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 286, n. 1–3, p. 92–103, 2006.

TAGLIETTI, A. *et al.* Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. **Biomaterials**, v. 35, n. 6, p. 1779–1788, 2014.

TAHERI, S. *et al.* Substrate independent silver nanoparticle based antibacterial coatings.

**Biomaterials**, v. 35, n. 16, p. 4601–4609, 2014.

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

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.

TRUONG, V. K. . *et al.* Bacterial attachment response on titanium surfaces with nanometric topographic features. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 137, p. 41–45, 2010.

WEI, M.; WANG, Y. Surface Attachment of Gold Nanoparticles Guided by Block Copolymer Micellar Films and Its Application in Silicon Etching. **Materials**, v. 8, n. 7, p. 3793–3805, 2015.

**WHO Antibiotic Resistance**. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>>. Acesso em: 11 out. 2016.

WU, Y. . *et al.* Differential response of Staphylococci and osteoblasts to varying titanium surface roughness. **Biomaterials**, v. 32, n. 4, p. 951–960, 2011.

XIU, Y. *et al.* Hierarchical silicon etched structures for controlled hydrophobicity/superhydrophobicity. **Nano Letters**, v. 7, n. 11, p. 3388–3393, 2007.

ZENG, R. *et al.* Self-assembled silane film and silver nanoparticles coating on magnesium alloys for corrosion resistance and antibacterial applications. **Acta Metallurgica Sinica (English Letters)**, v. 26, n. 6, p. 681–686, 2013.

ZHANG, M. *et al.* Biogenic silver nanoparticles (bio-Ag0) decrease biofouling of bio-Ag0/PES nanocomposite membranes. **Water Research**, v. 46, n. 7, p. 2077–2087, 2012.

ZHANG, X. *et al.* Quantitatively Predicting Bacterial Adhesion Using Surface Free Energy Determined with a Spectrophotometric Method. **Environmental Science and Technology**, v. 22, n. 2, p. 134–139, 2015.

ZHAO, C. M.; WANG, W. X. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 885–892, 2011.

ZHU, M.; LERUM, M. Z.; CHEN, W. How to prepare reproducible, homogeneous, and hydrolytically stable aminosilane-derived layers on silica. **Langmuir**, v. 28, n. 1, p. 416–423, 2012.