

Sara Frango Barros

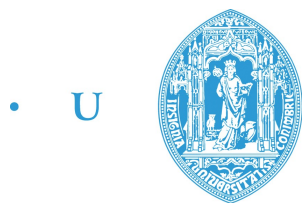
SUPERFÍCIES HÍBRIDAS NANOCOMPÓSITAS: RESPOSTA À COLONIZAÇÃO BIOLÓGICA

Dissertação submetida para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, especialidade em Biomateriais e Instrumentação Médica, orientada pela Professora Doutora Ana Paula Piedade e Professora Doutora Paula Vasconcelos Morais e apresentada no Departamento de Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra.

Julho/2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



• C •

FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Superfícies híbridas nanocompósitas: resposta à colonização biológica

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE DE COIMBRA PARA
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Autora:

Sara Frango BARROS

Orientadora:

Ana Paula PIEDADE

Co-Orientadora:

Paula Vasconcelos MORAIS

Coimbra, 2017

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com:



Esta cópia da tese é fornecida na condição de que quem a consulta reconhece que os direitos de autor são pertença do autor da tese e que nenhuma citação ou informação obtida a partir dela pode ser publicada sem a referência apropriada.

This copy of the thesis has been supplied on condition that anyone who consults it is understood to recognize that its copyright rests with its author and that no quotation from the thesis and no information derived from it may be published without proper acknowledgement.

Agradecimentos

O trabalho apresentado só é possível graças ao contributo de várias pessoas e instituições.

Agradeço à Professora Doutora Ana Paula Piedade, por me acolher na sua equipa com toda a disponibilidade, entusiasmo e partilha do saber ao longo de todo o trabalho efetuado durante a dissertação.

Agradeço à Professora Doutora Paula Vasconcelos pela disponibilidade de recursos e passagem de conhecimentos e à Doutora Rita Branco pelo tempo dispensado e apoio constante sobre as minhas dúvidas.

Agradeço às minhas colegas Sílvia e Francisca pela companhia no laboratório sempre com boa disposição.

Agradeço à Universidade de Coimbra, como casa que me acolheu ao longo destes 5 anos, e a todo o seu corpo docente que lutou diariamente para me oferecer a melhor formação possível.

Agradeço à minha família e amigos, com especial carinho pelos do Zoo, pelo apoio dado, não só nestes últimos meses, mas durante todo o meu percurso académico.

Agradeço aos meus pais.

Obrigada a Todos.

Abstract

The main objective of the work was the study of ZnO thin films, monolithic and hybrid, deposited by the sputtering process (r.f.). The thin films were deposited, in a first phase, with the aim of optimize deposition parameters, namely deposition time and pressure, as well as deposition density. In a second phase, monolithic and hybrid films were deposited the latter co-deposited with carbon, copper and polyamide 6,6. The surfaces were characterized by SEM, XRD, AFM, FTIR, XPS, UV-VIS spectroscopy, contour angle measurement and electrokinetic potential. All films have a structure with a preferred orientation according to the plane of diffraction (002), except for the hybrid film with polyamide, which presented amorphous structure. The characterization by AFM allowed to differentiate that the incorporation of the co-deposited material occurs preferentially at the grain boundary and allowed to conclude that all the hybrid thin films are nanocomposites. Cellular studies were carried out with the aim of evaluating the behavior of the surfaces to the biological colonization with Gram-negative bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), and Gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). The tests were carried out under different radiation conditions during the incubation, namely: visible light, pre-irradiation with UV or in the absence of any radiation. The test conducted in liquid culture media revealed that for *P. aeruginosa* the best bacterial inhibition results were achieved with the co-deposited copper surface. The same tests with *S. aureus* showed similar inhibition results except for the UV exposure which potentiated the inhibitory behavior of the hybrid C-doped ZnO films. In solid media tests, inhibition halo formation was observed for all surfaces in contact with *S. aureus*, where the co-deposition with polyamide presented the highest inhibition halos.

Keywords: *ZnO thin films, monolythic; hybrid nanocomposits, resistance to bacterial colonization; Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureus.*

Resumo

O trabalho desenvolvido teve como principal objetivo o estudo de filmes finos de ZnO, monolíticos e híbridos, depositados pelo processo de pulverização catódica por radiofrequência (r.f.). Os filmes finos foram depositados, numa primeira fase, com o objetivo de otimizar os parâmetros de deposição, nomeadamente o tempo e a pressão da deposição, bem como a densidade de deposição. Numa segunda fase foram depositados os filmes monolíticos e híbridos, estes últimos pela co-deposição com carbono, cobre e poliamida 6,6. As superfícies foram caracterizadas através das técnicas de SEM, XRD, AFM, FTIR, XPS, espectroscopia UV-VIS, medição do ângulo de contato e potencial eletrocinético. Todos os filmes apresentam uma estrutura com uma orientação preferencial segundo o plano de difração (002), à exceção do filme híbrido com poliamida, que apresentou estrutura amorfa. A caracterização por AFM permitiu diferenciar que a incorporação do material co-depositado dá-se preferencialmente na fronteira de grão e permitiu concluir que estes filmes são nanocompósitos híbridos. Os estudos celulares foram efetuados com o intuito de avaliar o comportamento das superfícies à colonização biológica com bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), e Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Os testes foram efetuados em diferentes condições de radiação durante a incubação, a saber: luz visível, pré-irradiação com UV ou na ausência de qualquer radiação. Nos testes efetuados em meio de cultura líquida, os melhores resultados de inibição bacteriana com *P. aeruginosa* foram alcançados com a superfície co-depositada com cobre. Os mesmos testes com *S. aureus* apresentaram resultados de inibição semelhantes, à exceção na condição de exposição a UV que potenciou o efeito inibitório dos filmes de ZnO dopados com C. Nos ensaios em meio sólido observou-se formação de halo de inibição para todas as superfícies em contacto com *S. aureus*, onde a co-deposição com poliamida apresentou os maiores valores de halos de inibição.

Palavras-chave: *Filmes finos ZnO, monolíticos; nanocompósitos híbridos, resistência à colonização bacteriana; Pseudomonas aeruginosa; Staphylococcus aureus.*

Acrónimos

AFM	<i>Atomic Force Mircoscopy</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DO	Densidade Ótica
FTIR	<i>Fourier Transform InfraRed</i>
HOMO-LUMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital-Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NPs	Nanopartículas
PA	Poliamida
PBS	Tampão fosfato-salino
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RF	Radiofrequência
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
UV	<i>Ultra-Violeta</i>
TEM	<i>Transmission Electron Analysis</i>
XPS	<i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i>
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>
ZnX	Filme fino resultante nas condições de deposição X.

Elementos Químicos

<i>Ag</i>	Prata
<i>Ag₂O</i>	Óxido de Prata
<i>Ar⁺</i>	Ião Árgon
<i>C</i>	Carbono
<i>Cu</i>	Cobre
<i>H</i>	Hidrogénio
<i>H₂O₂</i>	Peróxido de Hidrogénio
<i>HO₂⁻</i>	Anião Peróxido de Hidrogénio
<i>OH⁻</i>	Hidroxilo
<i>Si</i>	Silício
<i>TiO₂</i>	Dióxido de Titânio
<i>Zn²⁺</i>	Ião Zinco
<i>ZnO</i>	Óxido de Zinco
<i>ZnSO₄</i>	Sulfato de Óxido de Zinco

Lista de Figuras

1.1	Parede celular das bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas.	4
1.2	Etapas de desenvolvimento de um filme bacteriano	5
1.3	Estruturas cristalinas do ZnO	8
1.4	Indução do mecanismo bactericida de filmes compósitos de ZnO/Ag ₂ O por fotocatalise	10
1.5	Modelo de Estrutura de Zona para a formação de filmes.	12
1.6	Esquema de crescimento dos filmes de ZnO	13
1.7	Representação do mecanismo de atuação de nanopartículas metálicas sobre bactérias	15
1.8	Organização estrutural da poliamida 6.6	16
2.1	Difração de raios X sobre uma estrutura cristalina.	22
2.2	Representação das tensões de Young	25
2.3	Microplaca de 12 poços com superfícies submergidas em 2mL de inóculo de <i>P.aeruginosa</i>	27
3.1	Diagrama de Thorton	30
3.2	Micrografias SEM da secção transversal(a, c, e, g) e da superfície(b, d, f, h) das deposições do grupo I - a, b) Zn1; c, d) Zn2; e, f) Zn3; g, h) Zn4	31
3.3	Micrografias do filme fino Zn7, a)secção transversal, b)superfície e c)substrato inclinado	32
3.4	Micrografias da secção transversal dos filmes Zn6 (a) e Zn7 (b)	33
3.5	Imagens AFM dos filmes a)Zn5, b)Zn6 e c)Zn7. Imagens topográficas na coluna da esquerda e de fase na da direita.	34
3.6	Esquema de a)Skewness e b)Kurtosis	36
3.7	Difractograma do alvo de ZnO	37
3.8	Difractogramas dos filmes finos dos grupos I e II	38
3.9	Espectros FTIR do alvo de ZnO e dos filmes finos Zn4, Zn5 e Zn6.	39
3.10	Espectro FTIR do filme fino Zn7.	40
3.11	Desconvolução dos espectros XPS da superfície Zn4	41

3.12	Desconvolução dos espectros XPS da superfície Zn5 para as orbitais Zn2p, O1s, C1s	42
3.13	Desconvolução dos espectros XPS da superfície Zn6 (superiores)e Zn7(inferiores)	43
3.14	Espectro de absorvência VIS-UV para os filmes do grupo II	45
3.15	Micrografias SEM dos filmes em contacto com inoculados de <i>P. aeruginosa</i> incubados sobre diferentes condições de iluminação, em meio líquido.	49
3.16	a) <i>P. aeruginosa</i> colapsada após exposição ao filme fino Zn4 sobre luz e b) Representação Esquemática	50
3.17	Superfícies danificadas de ZnO dopado com Cobre (Zn6) com; a) incubação sobre luz e b) com tratamento prévio UV	53
3.18	Superfícies Zn4 com incubação por luz e UV das bactérias <i>S. aureus</i>	53
3.19	Imagens SEM dos filmes em contacto com inoculados de <i>S. aureus</i> incubada sobre diferentes condições em meio líquido	54
3.20	Halos de inibição criados em redor dos filmes finos sobre esfregaços de <i>S. aureus</i> após 38 horas de contacto.	56
3.21	Halo de inibição criado em redor do filme Zn6 sobre esfregaços de <i>S.aureus</i> após 38 horas de contacto no escuro.	56
22	Anexo ficha ICDD 01-075-0576	68

Lista de Tabelas

2.1	Condições de deposição	21
3.1	Espessura dos filmes medidas nas micrografias SEM transversais	33
3.2	Tabela de parâmetros de rugosidade	35
3.3	Identificação dos picos FTIR às ligações correspondentes	40
3.4	Composição química (%) dos elementos presentes nos filmes através de XPS . .	41
3.5	Ângulos de contacto das superfícies em estudo	46
3.6	Potencial zeta dos filmes finos do Grupo II	46
3.7	Resultados MIC após 5 dias de incubação onde (+) representa crescimento bac- teriano (-) representa inibição do crescimento bacteriano	47
3.8	Densidades Óticas das suspensões, após 38 horas em contacto com as superfícies	55
3.9	Valores mínimos e máximos dos halos de inibição	57

Conteúdo

Introdução	1
1 Estado da Arte	3
1.1 Infecções nosocomiais	3
1.2 Técnicas Atuais de Prevenção Antibacteriana	6
1.3 Óxido de Zinco e Atividade Antibacteriana	7
1.3.1 Tamanho e organização estrutural	9
1.3.2 Dopagem e tratamento térmico	9
1.3.3 Influência da radiação Ultra-Violeta	10
1.4 Mecanismo de Crescimento dos filmes finos	11
2 Materiais e Métodos	19
2.1 Materiais	19
2.2 Pulverização Catódica	19
2.3 Técnicas de Caracterização	21
2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varrimento	21
2.3.2 Microscopia de Força Atômica	21
2.3.3 Difração de Raios X	22
2.3.4 Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	23
2.3.5 Espectroscopia de Fotoeletrão X	24
2.3.6 Espectroscopia do Visível/UV	24
2.3.7 Medição dos Ângulos de Contacto Estático	24
2.3.8 Potencial Eletrocinético	25
2.4 Testes Bacterianos	26
2.4.1 Avaliação da resistência/susceptibilidade bacteriana a Zn ²⁺	26
2.4.2 Avaliação do efeito de diferentes filmes no crescimento bacteriano	27
3 Resultados e Discussão	29
3.1 Morfologia/ Topografia	29
3.2 Estrutura	36

3.3	Análise Química	39
3.4	Espectroscopia do Visível/UV	44
3.5	Molhabilidade	45
3.6	Potencial Eletrocinético	46
3.7	Testes Bacterianos	47
3.7.1	Avaliação da resistência/susceptibilidade bacteriana a Zn^{2+}	47
3.7.2	Testes celulares	48
	Conclusões	59
	Anexo	67

Introdução

As unidades de saúde concentram um elevado número de pessoas infetadas onde as boas práticas de higiene e a escolha de materiais apropriados são mandatórios para evitar a transmissão da infeção a outros doentes e profissionais. Este problema torna-se ainda mais permente com o aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos.

Os microorganismos, incluindo as bactérias, podem utilizar como vetor de transmissão objetos e materiais, onde o posterior contacto direto de um indivíduo com estas superfícies causa uma nova infeção, que pode ser bastante problemática se considerarmos que os frequentadores das unidades de saúde são, geralmente, indivíduos com o sistema imunitário comprometido. Uma conduta preventiva que diminua a adesão e desenvolvimento de bactérias sobre as superfícies é uma abordagem para travar o contágio e diminuir a propagação das infeções. É neste âmbito que se insere o objetivo desta dissertação que incide sobre o desenvolvimento de superfícies antibacterianas, utilizando a técnica de pulverização catódica, para revestimento de materiais utilizados no dia-a-dia nestas unidades.

O óxido de zinco, ZnO, é um cerâmico multifuncional aplicado em várias áreas devido à sua elevada estabilidade. Apresenta boas propriedades piezoelétricas, com uma larga gama de absorção de radiação UV, elevada fotoestabilidade, e é biodegradável. Este cerâmico é indicado como um ótimo candidato aos objetivos deste trabalho, devido às características antibacterianas naturais que apresenta, elevado grau de estabilidade, facilidade de manuseamento e à sua segurança, pois é classificado como um material GRAS, "*Generally Regarded as Safe*".

Este trabalho estuda as modificações da superfície dos filmes de ZnO e avalia o conjunto de propriedades/características favoráveis à atividade antibacteriana, assim como a co-deposição com outros materiais pode afetar o poder antibacteriano natural do ZnO. Estas superfícies híbridas compósitas foram caracterizadas quanto à composição química, a topografia, a molhabilidade e a carga superficial. Após caracterização, as superfícies foram usadas em testes com bactérias de estirpes frequentemente encontradas em ambientes hospitalares onde foi avaliado o comportamento de cada um dos filmes finos quando expostos a duas bactérias com diferentes resistências ao ião Zn^{2+} .

O presente trabalho está organizado em três capítulos em que o primeiro é dedicado à revisão da literatura com a introdução à problemática das infeções nosocomiais e atuais técnicas

de revestimentos antibacterianos, para além da revisão da utilização dos materiais estudados neste trabalho; no segundo é feita uma breve exposição das condições experimentais e técnicas utilizadas; no terceiro capítulo, e último capítulo, são apresentados e discutidos os resultados deste estudo. A dissertação apresenta as principais conclusões retiradas da investigação desenvolvida.

Capítulo 1

Estado da Arte

Este capítulo apresenta os trabalhos de investigação encontrados na literatura que se enquadram na temática deste trabalho.

1.1 Infecções nosocomiais

As infecções nosocomiais, também conhecidas como infecções hospitalares, designam todas as doenças contraídas numa unidade médica, normalmente hospitalar. Os agentes patogénicos nosocomiais podem ser transmitidos por vários meios incluindo o meio aéreo e a partilha de objetos [1]. Nos anos 40 surgiu pela primeira vez a problemática da resistência dos microorganismos a antibióticos e desde então o número de organismos multirresistentes a fármacos tem aumentado. Na América do Norte e Europa 5 a 10 % de todas as hospitalizações são resultado de uma infeção nosocomial [2]. Na América Latina, África Subsariana e Ásia o problema tem proporções ainda mais preocupantes, com 40% de hospitalizações relacionadas com este tipo de infeções. As bactérias são responsáveis por 90 % destas infeções, sendo os restantes 10 % motivados por protozoários, fungos e vírus. O desenvolvimento de abordagens preventivas que travem a propagação e desenvolvimento destes microorganismos é um assunto de extrema importância e premência [2].

De modo a melhor compreender a questão das infeções provocadas por bactérias devem ser abordados, ainda que brevemente, os dois grandes grupos de bactérias, considerando a estrutura da parede celular, as Gram-negativas e as Gram-positivas, bem como as diferenças das respectivas paredes, esquematizadas na figura 1.1. As bactérias Gram-positivas têm uma parede com uma espessa camada de peptidoglicano. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular composta por duas membranas entre as quais se encontra uma camada de peptidoglicano. [1].

A multirresistência bacteriana surge através de mutações e transferência de genes de resistência homólogos. O excessivo e inadequado uso de antibióticos de amplo espectro no dia-

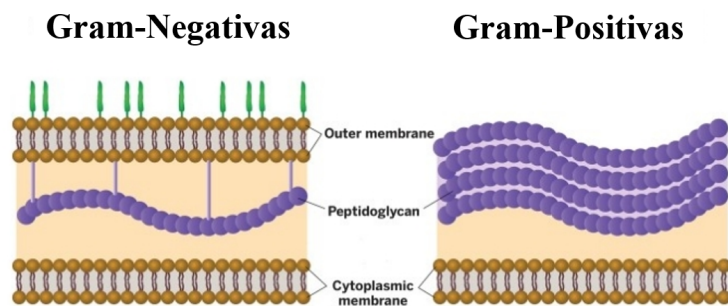


Figura 1.1: Parede celular das bactérias Gram-Negativas e Gram-Positivas. Imagem adaptada de [3].

a-dia promove a seleção de estirpes altamente resistentes, especialmente em ambiente clínico, onde os tratamentos são feitos por mais do que um antibiótico para uma maior eficácia de tratamento [1] [4].

As bactérias, fungos e protozoários têm a capacidade de formar biofilmes, ecossistemas microbiológicos que permitem o isolamento e a proteção das células de ataques externos. Estes biofilmes são formados por produtos excretados pelas células, construindo uma matriz de exopolímeros que envolve os microorganismos. Estes ecossistemas facilitam a comunicação celular e a transferência de genes de resistência, para além de permitem a produção e a disseminação de fatores de virulência. Os biofilmes vão sendo desenvolvidos num processo dinâmico e surgem após as etapas de adesão, crescimento e multiplicação bacteriana, conforme esquematizado na figura 1.2. O processo começa pela adesão superficial de nutrientes e outras moléculas necessárias à sobrevivência bacteriana. As bactérias depositam-se sobre a superfície e fixam-se através de forças intermoleculares e eletrostáticas. A população bacteriana começa a multiplicação e inicia a síntese de matriz exopolimérica, nesta etapa as células ficam irreversivelmente fixas. Os nutrientes chegam ao biofilme por fenómenos de difusão e convecção e a multiplicação celular permite o contínuo crescimento do biofilme. Numa fase posterior ocorre a secreção de produtos tóxicos da matriz e destacamentos de porções do biofilme, que poderão migrar e aderir a outra superfície [5].

O biofilme oferece vários mecanismos para proteção das células. Em primeiro lugar, forma um revestimento mecânico que protege as células de forças abrasivas da superfície. Deste modo, atua como cápsula protetora, onde os poros de pequena dimensão bloqueiam a passagem de certas moléculas e impedem a difusão dos antibióticos. Com efeito, a matriz polissacarídica tem um cariz hidrofílico e aniônico, capaz de adsorver as moléculas que são lesivas à colônia. Graças a estas características o biofilme impede a chegada do agente antimicrobiano às células [5]. As células presentes nas zonas mais internas estão sujeitas a um ambiente mais escasso a nível de nutrientes e oxigénio, devido à barreira de permeabilidade molecular seletiva, o que provoca uma heterogeneidade química e induz as células situadas no interior a entrar

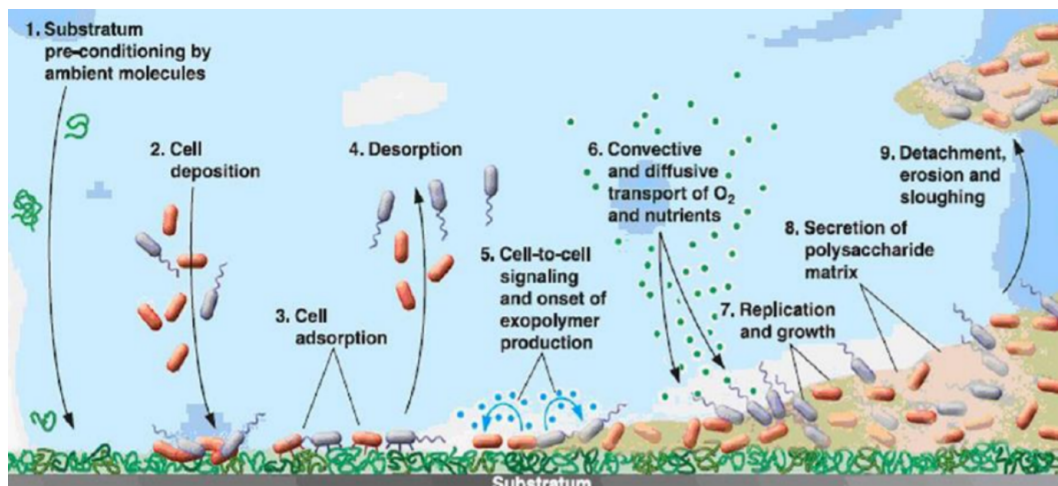


Figura 1.2: Etapas de desenvolvimento de um filme bacteriano [5].

na fase estacionária, ficando em dormência. As células deste estágio encontram-se metabolicamente adormecidas, com taxas de divisão lenta, o que torna estes microorganismos das camadas internas menos susceptíveis à ação dos agentes antibacterianos [6]. A resistência dos biofilmes é aumentada ao longo do tempo, não só devido ao seu crescimento em volume, que impede a entrada de moléculas e gera um maior número de células em dormência, [7], como também devido à maior produção enzimática de inativadores antimicrobianos que são excretados pelas células para o meio. Os biofilmes recalcitrantes podem surgir como consequência do uso abusivo de *cocktails* de antibióticos [5]. Um exemplo desta realidade foi o aumento de 17% para 30% de prevalência de pneumonia nosocomial nos últimos 5 anos, no Brasil [1].

Como já referido, a formação do biofilme é um mecanismo eficiente no combate aos antibióticos, e como tal o desenvolvimento de estratégias preventivas da sua formação poderá ser uma boa abordagem para a diminuição da propagação bacteriana. A inibição da adesão celular à superfície, a desagregação da matriz exopolimérica ou a inibição das moléculas modeladoras do desenvolvimento do biofilme são soluções práticas que poderão ter consequências benéficas no combate às infecções nosocomiais [5].

As nanopartículas, NPs, são apontadas como uma possível solução para esta problemática pois o seu tamanho nanométrico permite a entrada e dissolução através biofilme, e a elevada área superficial ativa permite um grande número de interações com os microorganismos. Estas nanopartículas podem ser constituídas por metais ou óxidos metálicos com capacidades antibacterianas naturais. As superfícies microbianas apresentam uma natureza hidrófoba, como tal, o desenvolvimento de superfícies hidrófilas anti-adesivas, com alterações físicas, químicas e topográficas e, simultaneamente libertadoras de substâncias inibidoras, estão também a ser estudadas para o combate à adesão bacteriana [5]. No entanto, a utilização de nanopartículas não é consensual, pois a sua toxicidade, em relação às células eucariotas, está longe de estar inequivocamente determinada, tal como os efeitos, a longo prazo, no organismo humano.

1.2 Técnicas Atuais de Prevenção Antibacteriana

A concepção das unidades de saúde está cada vez mais ciente da problemática das infecções nosocomiais e, conseqüentemente, o mercado de materiais antibacterianos está em crescimento. Os espaços são projetados tendo em conta a facilidade de limpeza e a redução de possíveis depósitos bacterianos. Um exemplo desta prática foi a troca, nos hospitais, dos rodapés convencionais para os de canto curvo que promovem uma superfície contínua e de fácil limpeza, respeitando as normas de higiene. O mercado antibacteriano abrange revestimentos de paredes, pavimentos, tetos, e equipamento geral (cadeiras, mesas, camas, tecidos) e equipamento médico. O número de objetos nas salas está também a ser minimizado [8]. A *Basan GmbH*, desenvolveu uma mesa interativa, a *Blautouch*, que substitui dispositivos como computadores, teclados e ratos, que podem ser potenciais focos de contaminação. Esta mesa é constituída por materiais antibacterianos e resistentes a desinfetantes e destina-se a salas brancas, laboratórios e hospitais [9]. Os tratamentos de superfície com compostos que promovem a libertação de iões de prata também estão a ser aplicados no fabrico de portas, janelas e componentes em alumínio [8]. O crescimento deste mercado é observado até em produtos de limpeza, onde alguns hospitais portugueses já efetuam a desinfecção dos pavimentos com microfibras de poliéster e poliamida que, devido à carga positiva atraem as poeiras (de carga negativa), têm maior poder absorvente que as esfregonas convencionais [8]. A esterilização por meio de radiação UV, o uso de soluções de cloro, ozono e outros meios de filtração, são também práticas comuns [10]. No entanto são técnicas não preventivas, pós-contaminação, tóxicas a nível ambiental, para além de serem dispendiosas. Por este motivo, a pesquisa continua a ser ativamente efetuada para encontrar alternativas, sendo o uso de materiais semicondutores fotocatalíticos apontados como uma abordagem promissora [11]. O uso de pós ou de revestimentos de materiais inorgânicos aplicados a superfícies tem sido bem sucedido, com aplicações na indústria alimentar e têxtil, no tratamento de água, biomateriais e materiais cirúrgicos [10] [12] [13].

As nanopartículas semicondutoras mencionadas neste campo são as de ZnO, TiO₂ e Ag₂O. No presente trabalho, o objetivo é avaliar a possibilidade de utilizar filmes finos de ZnO, monolíticos e co-depositados com outros materiais, pois este material cerâmico é descrito como potencial redutor da atividade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [14].

Os materiais médicos com atividade biológica ativa são frequentemente compostos por um material base, de preço acessível, e revestidos por materiais bioativos, neste caso para a prevenção da colonização por bactérias. A redução do preço e do peso final dos produtos é assim conseguida com o uso de substratos mais leves e baratos. Os revestimentos podem ser feitos utilizando diversas técnicas, sendo as de deposição em fase de vapor química e física as mais aplicadas na indústria. Neste trabalho iremos aplicar a técnica de pulverização catódica que é ideal dada a possibilidade de revestir substratos com formas variáveis e complexas [15].

A nanotecnologia estuda a síntese e caracterização de materiais nanométricos (uma dimensão inferior a 100 nms). O processamento de materiais a uma escala atômica permite o controle sobre características químicas, mecânicas, elétricas, estruturais, morfológicas e óticas onde o comportamento dos materiais é distinto do apresentado à escala volumétrica, possibilitando a criação de nanoestruturas e fases metaestáveis com propriedades não convencionais [1]. Uma revolução de materiais para aplicação em eletrônica, indústria têxtil, proteção ambiental, catalizadores e biotecnologia é esperada com a evolução dos processos de síntese de nanomateriais nos próximos anos [12]. As nanopartículas de prata com elevada atividade antibacteriana são atualmente utilizadas em próteses, materiais dentários e revestimentos de feridas, sobretudo sobre a forma de compósitos [16]. Esta classe de materiais resulta da junção de dois ou mais materiais quimicamente distintos, de modo a que o material obtido possua melhores propriedades do que cada um dos materiais que o constituem.

1.3 Óxido de Zinco e Atividade Antibacteriana

O óxido de zinco é um óxido metálico usado frequentemente para aplicações elétricas. É um semicondutor do tipo n, conhecido por ter uma larga energia de banda (3,1 a 3,3 eV) com elevada energia de ligação (60 meV, à temperatura ambiente). Estas características fazem do ZnO um composto notável para aparelhos optoeletrônicos, sensores e coletores de energia.

O ZnO apresenta ligações iônicas Zn-O fortes, conferindo-lhe uma longa estabilidade, elevada seletividade e resistência ao calor. Apresenta também elevada atividade catalítica e fotoquímica absorvendo radiação UV (280-400 nm), o que faz com que seja usado frequentemente na indústria cosmética como aditivo em protetores solares [1].

O possível uso de ZnO tem sido cada vez mais descrito como potencial inibidor de crescimento bacteriano e antifúngico. É considerado um material GRAS “*Generally Regarded as Safe*” pela U.S. Food and Drug Administration (21CFR182.8991), o que demonstra a sua segurança e potencial para aplicação em materiais biomédicos [17]. *Roselli* e colaboradores, em 2003, descreveram a capacidade do ZnO em inibir a adesão e a internalização da bactéria *Escherichia coli*, (*E. coli*), em células intestinais, diminuindo o número de infecções [18]. A inibição do crescimento e o aumento da morte bacteriana da *E. coli* é conseguida a 100 % para concentrações entre 3 a 10 mM de nanopartículas de ZnO [19]. Um estudo liderado por *K.M.Reddy* confirma esta toxicidade, onde descreve efeitos letais sobre bactérias Gram-negativas, *E. coli*, e Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, mas para exposições de igual concentração a linfócitos T primários humanos os efeitos eram insignificantes [20].

O óxido de zinco pode ser encontrado na forma estrutural de wurtzite, blenda ou pedra de sal. A conformação da wurtzite tem um empacotamento hexagonal e é termodinamicamente estável em condições ambientais. Os átomos de zinco são coordenados em tetraedros e cada ião

zinco é rodeado por 4 oxigénios e vice-versa, desta forma os iões zinco e oxigénio alternam ao longo do eixo-c um com o outro [1]. A estrutura do óxido de zinco em blenda é metastável. As estruturas cristalinas estão representadas na figura 1.3, onde as esferas pretas são referentes aos átomos oxigénio e as cinzentas aos átomos de zinco.

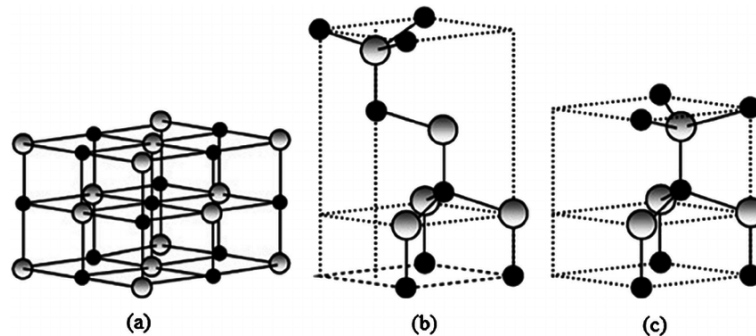


Figura 1.3: Estruturas cristalinas do ZnO. a) Rock salt; b) blenda e c) wurtzite. [1]

O mecanismo de atuação do ZnO sobre as bactérias ainda não foi completamente compreendido e várias teorias surgem na tentativa de explicar o processo. Um dos meios de atuação está associado aos iões Zn^{2+} que, ao serem absorvidos para o meio intracelular, desregulam as concentrações iónicas causando desordem no microorganismo ao nível da produção de ATP e da replicação de DNA. A toxicidade também está associada a alterações na permeabilidade da membrana devido à acumulação e à dissolução de NPs. Isto leva a uma perda de integridade com rotura das membranas e vazamento do citoplasma [1] [17]. Outros autores consideram a formação de ROS (Espécies de Oxigénio Reativas, do inglês, *Reactive Oxygen Species*) como o principal fator de inibição bacteriana, dado que provocam reações oxidativas em todo o sistema.

A ação de nanopartículas de ZnO sobre *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) foi estudada por Yanping Xie, com o objetivo de determinar o processo de multiplicação bacteriana. Uma análise SEM (Microscopia Eletrónica de Varrimento, do inglês Scanning Electron Microscopy) detetou alterações na morfologia da *C. jejuni* com passagem da forma espiralada para um formato cocóide, sendo que esta alteração conformacional é tipicamente observadas em situações de *stress*. Por esta razão, os autores selecionaram e analisaram os genes envolvidos em processos de *stress*, patogenicidade e produção de toxinas, tendo sido detetada uma sub-expressão de 3 genes: (i) o *katA*, um gene associado à inativação de H_2O_2 e à formação de intermediários tóxicos; (ii) o *ahpC* que destrói intermediários de peróxido de hidrogénio e repara moléculas que sofrem danos por oxidação; e (iii) o *dnaK* expresso em situações gerais de *stress* em *C. jejuni*. Estes resultados apontam para a formação de *stress* oxidativo causado por concentrações elevadas de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) intracelular e sob a membrana das bactérias, durante a sua exposição a ambientes com ZnO. No final do estudo as bactérias expostas a este cerâmico foram colocadas num meio propício ao seu crescimento. No entanto, não se observou nenhum aumento do número celular, sendo portanto todo este mecanismo um processo bactericida [17].

Devido à grande variedade de propriedades/características que os materiais abióticos podem ter na interface com as células procariotas, é apresentada uma breve revisão das principais.

1.3.1 Tamanho e organização estrutural

Quando se trata da utilização de partículas, o comportamento em relação às células procariotas depende da geometria e do tamanho das partículas, bem como da sua área superficial.

O processo de morte bacteriana pode iniciar-se pela chegada e ancoragem das bactérias à superfície através de interações moleculares e forças eletrostáticas que causam alterações conformacionais levando à morte celular [21]. Quanto menor a dimensão da partícula, maior a facilidade de penetração transmembranar. Acresce o facto de, quanto menor a partícula de ZnO, mais rápida é a cinética de dissolução e, conseqüentemente, a formação do ião Zn^{2+} é também mais rápida, o que promove um incremento da toxicidade do composto e da interferência com as atividades enzimáticas [1].

A concentração de ZnO na superfície e a organização estrutural são fatores a ter em consideração. Com efeito, NPs tubulares conseguem mais facilmente penetrar as paredes celulares que moléculas circulares com igual composição química, pois a proporção de facetas ativas está diretamente ligada à atividade reativa [1].

1.3.2 Dopagem e tratamento térmico

Com o intuito de aumentar a produção de ROS alguns estudos sugerem tratamentos térmicos por forma a incrementar a presença de oxigénio na superfície. O uso de agentes promotores de reações com o oxigénio, é também referido, com especial atenção para os materiais metálicos [1]. Um exemplo é a formação de filmes nanocompósitos de óxido de zinco (ZnO) e prata (Ag). O ZnO é um material do tipo n, com uma função trabalho de 5,2 eV e afinidade eletrónica de 4,3 eV. O Ag₂O tem uma função trabalho inferior a 5 eV e um potencial de ionização de 5,3eV. O efeito bactericida destes compósitos tem origem nas heterojunções, onde os eletrões com origem no ZnO difundem-se para o Ag₂O e, no sentido contrário, as lacunas com origem no Ag₂O difundem para o ZnO, até que os níveis de energia de *Fermi* estejam alinhados e em equilíbrio [10]. A energia de banda do Ag₂O, por ser inferior à do ZnO, tem como consequência a formação de um maior número de eletrões e pares de lacunas nas bandas de condução e valência do Ag₂O. Após a excitação, os eletrões gerados são transferidos para o ZnO, devido ao campo elétrico gerado na heterojunção p-n. Este campo elétrico tem a capacidade para retardar as recombinações dos transportadores de eletrões e aumentar o tempo de vida das fotorreações na superfície dos filmes. Se o tempo de vida dos transportadores de eletrões for superior ao da fotorreação geram-se espécies de oxigénio ativas, ROS [10]. O H_2O_2 é um dos exemplos destes produtos e tem a capacidade de atravessar membranas biológicas através de reações de

peroxidação lipídica. Após a sua entrada para o meio intracelular o H_2O_2 danifica o DNA e as enzimas. Os iões superóxidos (O_2^-) também conseguem penetrar as biomembranas e atuar tanto como agente redutor como oxidante. Uma entrada simultânea de H_2O_2 e O_2^- pode também causar a rotura da membrana celular. Em último caso, as espécies podem reagir no meio intracelular e originar radicais de hidroxilo OH^\bullet que inativam a célula. [10]

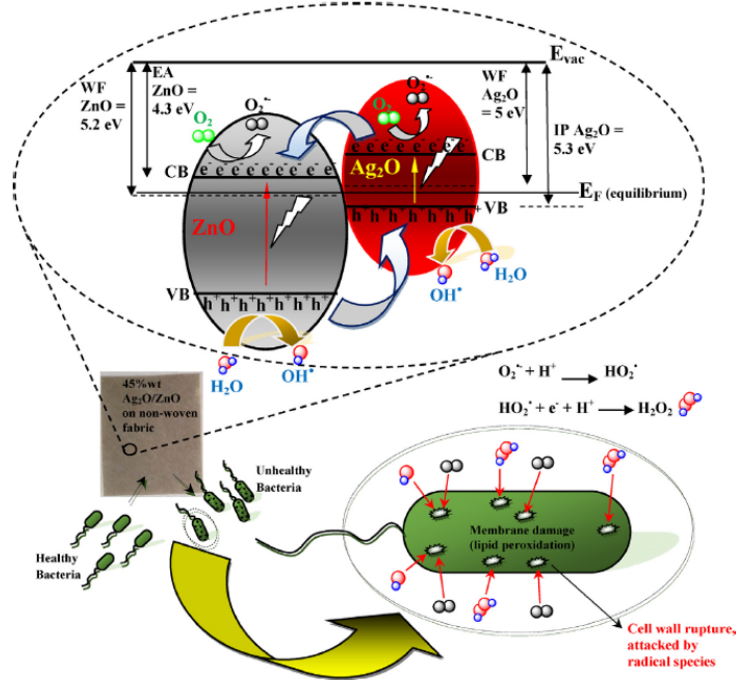


Figura 1.4: Indução do mecanismo bactericida de filmes compostos de ZnO/Ag₂O por fotocatalise [10]

Este é um exemplo prático de como a formação de um material híbrido potencia as capacidades antibacterianas do ZnO. Os preços da prata tornam difícil a produção deste composto de ZnO a nível comercial, sendo que a procura de materiais com efeitos equivalentes mas economicamente mais acessíveis, seja o novo passo para a futura comercialização de ZnO como possível revestimento antibacteriano [10] [22]

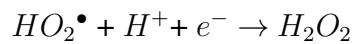
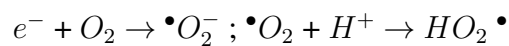
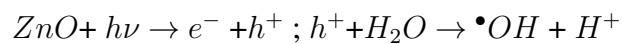
1.3.3 Influência da radiação Ultra-Violeta

A inibição do crescimento bacteriano é alcançada no escuro, embora com diminuição na sua eficiência [10]. A literatura refere, frequentemente, os benefícios associados à incidência de radiação Ultra-Violeta (UV) sobre filmes de ZnO, com a promoção do processo de oxidação foto-induzido, dada a elevada atividade catalítica e fotoquímica do ZnO, para radiações com comprimentos de onda entre os 280 e os 400 nm [10] [23] [24].

A superfície da região de depleção eletrónica do ZnO está associada a espécies de oxigénio negativas, O_2^- , O_2^{2-} , fracamente absorvidas. Com a incidência da radiação UV estas espécies

são removidas da superfície, o que leva à redução da mesma e, conseqüentemente, a uma melhoria da condutividade [1].

A superfície de ZnO apresenta alguns defeitos onde se criam pares de elétrons-lacuna (e^- , h^+). Estas falhas têm a capacidade de dissociar as moléculas de H_2O em OH^- e H^+ . As moléculas de oxigénio são transformadas em radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$), que, como consequência, reagem com H^+ e geram radicais HO_2^\bullet . Estes interagem com os elétrons do meio produzindo aniões de peróxido de hidrogénio HO_2^- , que, em reação com os hidrogénios, vão originar H_2O_2 com a capacidade de penetrar a parede celular e causar a morte bacteriana [25].



Singh [25] defende que o efeito antibacteriano baseia-se, em grande parte, na capacidade de formação do peróxido de hidrogénio, H_2O_2 , uma vez que é a única molécula capaz de perturbar os fosfolipídios insaturados presentes nas membranas, através de reações de peroxidação, ao contrário dos radicais hidroxilo e dos superóxidos que têm cargas negativas e ficam assim impedidos de penetrar as membranas [1] [25].

Dado que este trabalho incide no ZnO, mas sob a forma de filmes finos, em seguida vai ser apresentada uma breve revisão sobre a particularidade do tipo de crescimento dos filmes finos sejam eles monolíticos ou compósitos.

1.4 Mecanismo de Crescimento dos filmes finos

Uma das propriedades que influencia o comportamento das espécies biológicas quando em contacto com uma superfície é a sua morfologia/topografia. No caso de revestimentos, a morfologia superficial é consequência do modo de crescimento do próprio filme, podendo ele ser do tipo colunar ou não, com variação do diâmetro das colunas. A formação colunar inicia-se por nucleações na superfície dos substratos. O processo de crescimento ocorre pela contínua chegada dos adátomos que colidem no substrato e iniciam nucleações sucessivas formando "ilhas" depositadas na superfície. A figura 1.5 esquematiza o Modelo de Estrutura de Zona - Modelo de Thornton [26] que relaciona a evolução da morfologia da seção transversal do filme fino em função da razão Temperatura do substrato (T_s) / Temperatura de fusão do material em deposição (T_m).

As dimensões laterais das fibras/colunas são dependentes da densidade de nucleação e, a orientação das colunas, pelos movimentos dos agregados. É possível identificar 3 regiões distintas. A Zona I ocorre devido à negligenciável difusão dos adátomos resultando num filme

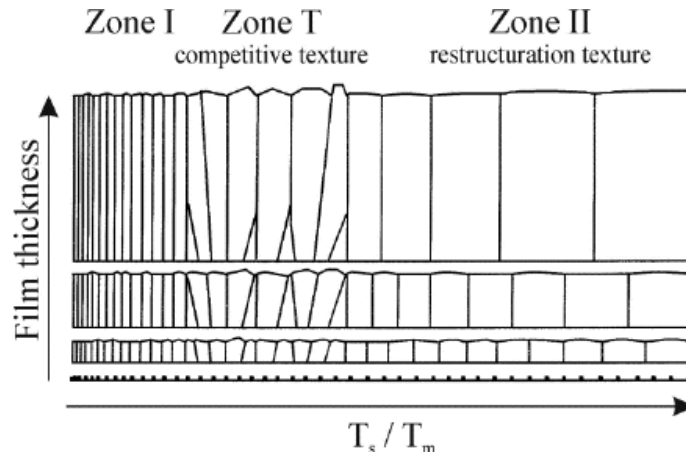


Figura 1.5: Modelo de Estrutura de Zona para a formação de filmes. Representação da estrutura dos filmes com base na sua espessura e Temperatura do substrato(T_s)/Temperatura de fusão do material em deposição(T_m) [26]

poroso tanto inter como intra colunar. A Zona T, localizada entre as zonas I e II, onde, com o aumento de temperatura, os efeitos da difusão dos adátomos ganham influência no regime de crescimento, existindo competição entre aglomerados adjacentes. As estruturas ganham uma conformação em "V" nas zonas próximas da camada de nucleação e culminam em estruturas colunares de maior diâmetro. Com o aumento da temperatura, as formações colunares apresentam um crescimento mais orientado devido à maior mobilidade das partículas. A zona II ocorre a temperaturas elevadas, onde as partículas com elevada energia cinética colidem umas com as outras promovendo a sua aglomeração e difusão em massa. Deste modo, ocorre a minimização das energias de interface e de superfície. O diâmetro das colunas aumenta com o aumento da razão T_s/T_m [26]. Com o aumento da temperatura, as taxas de difusão atômicas são superiores às de deposição e, como consequência, as colunas adquirem uma ponta mais planar. [27]

A figura 1.6 esquematiza o crescimento dos filmes de ZnO, onde podemos observar a formação de dois tipos de estruturas colunares. Este fenómeno é explicado pelo arrefecimento do substrato em relação ao meio de deposição que gera uma diminuição da difusão de adátomos na interface entre o substrato e o filme. Com a formação do primeiro tipo de estrutura colunar, o próprio material depositado gera uma camada térmica que impede os efeitos de arrefecimento do substrato e, conseqüentemente, leva a uma maior liberdade de movimento das espécies, que formam a segunda camada colunar, pelo que a maior difusão dá origem a estruturas mais largas e compactas, características da zona II [28].

O estudo conduzido por *Carvalho* [28] mostrou que os filmes finos de espessura compreendida entre os 50 e 100 nm apresentam uma menor atividade antibacteriana quando comparados com filmes mais de 200 e 600 nm, para o caso da *E. coli*. O artigo descreveu a atividade antibacteriana com não só um aumento do tempo de geração, como também com uma diminuição, para 45%, da taxa de crescimento das bactérias presentes no final do estudo. Uma explicação

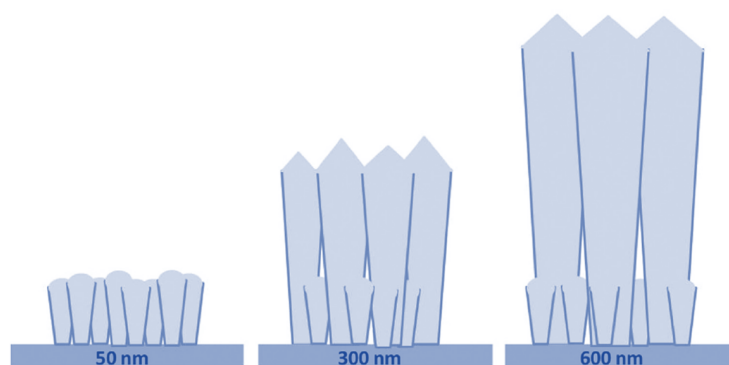


Figura 1.6: Esquema de crescimento dos filmes de ZnO com o aumento de espessura. Figura adaptada de [28]

para esse facto é dada pelo aumento da área superficial, devido ao aumento do comprimento da coluna, permitindo assim uma maior difusão dos iões Zn^{2+} . O comprimento e largura colunar e os espaços entre as colunas acessíveis serão os três grandes factores que vão influencia a área ativa das superfícies. Segundo o mesmo estudo, existe um valor máximo de espessura para o qual a taxa de morte bacteriana estabiliza independentemente da espessura do filme, sendo por isso a gama de 200 a 600 nm a ideal para revestimentos antibacterianos [28].

A influência que vários elementos ou compostos químicos podem produzir na atividade antibacteriana dos filmes de ZnO é também um dos objetivos do presente trabalho. Assim, é apresentada uma breve revisão da literatura em relação aos diferentes tipos de materiais que vão ser utilizados na co-deposição dos filmes finos de ZnO, a saber: carbono (cerâmico), cobre (metálico) e poliamida (polímero)

Carbono

Os filmes de carbono são descritos na literatura como materiais com características antibacterianas, resistentes à adesão e colonização bacteriana e por isso apontados como potenciais revestimentos para implantes, devido ao seu baixo coeficiente de atrito e ao facto de serem quimicamente inertes [29] [30]. Zhou, descreveu o revestimento de aço inoxidável com carbono através da técnica de plasma. As propriedades antibacterianas de filmes de carbono hidrogenado amorfo e filmes de carbono sem hidrogénio foram estudadas, utilizando a *E. coli*, e observaram uma diminuição no número de colónias em 15 e 33%, respetivamente, quando comparados com os substratos originais não revestidos. Esta discrepância de valores entre os dois filmes, cuja diferença está na presença ou ausência de hidrogénio, pode ser um indicador de que este elemento tem um papel importante nas propriedades antibacterianas do carbono. Uma possível explicação, dada pelos autores afirma que os filmes de carbono enfraquecem as interações químicas de adesão bacteriana. A presença de hidrogénio vai diminuir as interações entre o

carbono e as bactérias, reduzindo assim o desempenho antibacteriano [10]. Os resultados do trabalho de *Chu* mostraram que a energia livre dos filmes de carbono é energeticamente adversa à adesão bacteriana [29].

Cobre

As capacidades antibacterianas do cobre são bem conhecidas e comparáveis às do ouro e prata com a vantagem de ser um material economicamente mais acessível. O cobre antimicrobiano foi incluído no Top 10 da “New & Emerging Health Technology Watch List 2014” como material com potencial de aplicação nas unidades de cuidados de saúde. A nível hospitalar está presente em maçanetas e armações de janelas e camas. A desvantagem deste elemento está na sua baixa resistência a fatores ambientais sofrendo uma rápida oxidação quando aplicado em superfícies [8] [16] [31].

Alguns metais, como o cobre, são descritos como agentes antibacterianos eficientes e os seus mecanismos de atuação têm sido estudados ao longo dos anos, com algumas das propostas representadas na figura 1.7. O primeiro contacto dos metais sob a forma de NPs ou sob a forma iónica, com a parede bacteriana causa a degradação da matriz polissacarídea extracelular. Como consequência, a célula perde a sua conformação original ficando frequentemente alongada e perdendo o contacto com as outras células. Inicia-se assim uma promoção das superfícies livres disponíveis para futura interação entre as bactérias e os metais. As NPs ou as iões metálicos causam *stress* na parte externa da parede, causando invaginações e perfurações. O fluxo contínuo do metal, bem como o aumento de *stress* na membrana, causa perfurações na parede celular e leva à libertação do material intracelular e à perda da estrutura. Em seguida, ocorre a translocação e a internalização dos metais para o meio intracelular diminuindo a eficiência energética da célula, interferindo na produção de ATP e afetando a replicação de DNA. O metal vai também promover a formação de ROS, que como já referido, vai causar *stress* oxidativo na célula. A acumulação do metal nas membranas vai permeabilizá-las levando à libertação de moléculas intracelulares [21].

A literatura apresenta vários trabalhos que valorizam as capacidades antibacterianas de nanopartículas metálicas. O cobre é um desses elementos e a sua co-deposição com ZnO origina um filme híbrido cujo o efeito antibacteriano ainda não foi descrito. No entanto, é possível encontrar artigos que falam de filmes compósitos de ZnO e Ag. Tendo em conta que a prata e o cobre são elementos do mesmo grupo, é possível que o processo antibacteriano destes dois elementos ocorra segundo um mecanismo semelhante. Com efeito, um estudo em que se produziram filmes finos compósitos de ZnO e Cu^{2+} [11], concluiu que a modificação superficial com Cu^{2+} provoca uma indução na absorção de luz visível no ZnO por transferência de carga interfacial após irradiação com luz visível, tal como o descrito no trabalho de *Chuan* com Ag_2O . [10]

Um estudo comparativo de filmes de cobre (Cu) e óxido de cobre (CuO) foi realizado pela

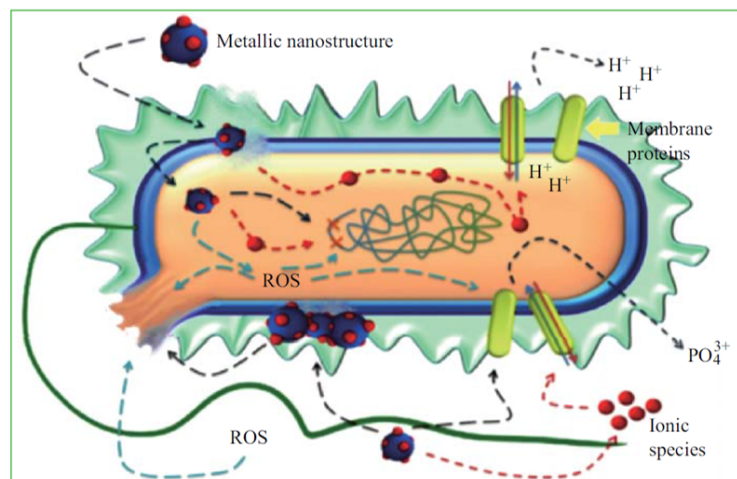


Figura 1.7: Representação do mecanismo de atuação de nanopartículas metálicas sobre bactérias [21]

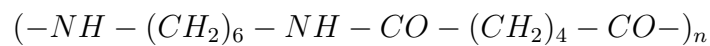
equipa de *O. Akhavan* [16]. Os filmes de Cu apresentaram um efeito bactericida mais eficaz pois têm uma capacidade de aceitação de elétrons superior à do CuO, o que resulta numa melhor transferência de nanopartículas entre a superfície (aceitadora de elétrons) e as bactérias (ligeiramente negativas). Esta transferência eletrônica é um dos mecanismos de atividade antibacteriana que leva à rotura das paredes celulares. Os CuO é um semicondutor que por foto-indução pode gerar pares de elétron/lacuna na superfície, aumentando em 22% a sua atividade antibacteriana. Os filmes de Cu reduzidos a 600 °C tinham um fino revestimento de CuO na sua superfície e, quando expostos às mesmas condições de foto-indução, aumentaram a sua atividade em 63%. As junções Cu-CuO que se formam são propícias à morte bacteriana, onde o CuO gera pares elétron-lacuna por foto-absorção e o Cu absorve os elétrons foto-excitados, separando os pares e levando a uma maior eficiência no processo de foto-inativação de bactérias. Em contradição com estes resultados, um estudo liderado por *C.C. Trapalis* [32], que preparou filmes finos de Cu/Si₂ por método de sol-gel, afirmou que estes materiais apresentaram propriedades 100% antibacterianas, com *E. coli*, em menos de 24 horas. Os revestimentos foram sujeitos a um tratamento térmico em atmosferas redutoras e oxidantes e concluiu que estas em nada eram úteis para a promoção da atividade antibacteriana. Nas considerações finais o aumento das concentrações de Cu e baixas temperaturas de tratamento térmico foram considerados os factores que mais promoviam as capacidades antibacterianas.

Outro estudo, conduzido por *Ben-Sasson*, descreveu a funcionalização de filmes finos de poliamida cobertos por Nps de cobre com um agente de revestimento (Polietilenoimina), através da técnica de dessalinação por osmose reversa. As membranas nativas, apresentava inicialmente carga negativa devido aos grupos carboxilo, mas o revestimento com NPs de Cu alterou a carga superficial para valores positivos. Após 1 hora de contacto com as superfícies o número de células vivas na membrana diminuiu para $87\% \pm 0.2\%$, $96\% \pm 3\%$, e $79.5\% \pm 13\%$ para *E. coli*, *P.*

aeruginosa e *S. aureus*, respetivamente, relativamente aos controlos. Uma proposta apresentada para os resultados foi dada pela toxicidade das NPs de Cu e pelas alterações fisicoquímicas das membranas funcionalizadas. Os autores indicam que o revestimento com NPs de Cu não alterou significativamente a rugosidade das superfícies nem a molhabilidade das mesmas, atribuindo os resultados às membranas positivas que promoveram a adesão bacteriana e desta forma as Nps de Cu tiveram um efeito mais tóxico sobre as bactérias que estavam mais aderidas à superfície, levando a uma redução de 80 a 95% de células vivas aderidas à superfície [31].

Poliamida

A poliamida (PA) é frequentemente utilizada na indústria têxtil, em isolamentos de cabos, embalagens alimentares e no meio hospitalar como invólucro de material esterilizado e fios de suturas. É frequentemente designada por Nylon® e, é um polímero termoplástico, hidrófobo, com uma boa estabilidade térmica e mecânica e elevada flexibilidade. Neste trabalho será utilizada a poliamida 6,6 que tem como unidade de repetição:



cujas macromoléculas se encontram ligadas entre si por ligações secundárias:

$N - H - \cdots O = C <$, como o apresentado na figura 1.8 [33].

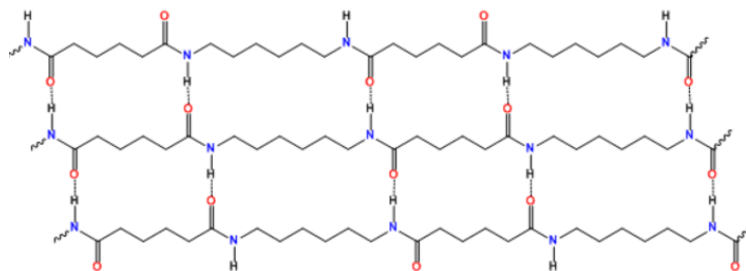
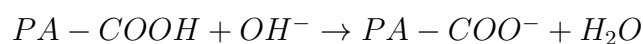
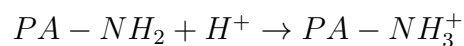


Figura 1.8: Organização estrutural da poliamida 6.6 [34]

Os grupos amina (NH_2) e carboxílico ($COOH$) conferem à poliamida um caráter anfotérico, onde, na presença de água, a ionização dos grupos ocorre dependente do pH e acessibilidade de cada um dos grupos presentes no polímero, de acordo com as seguintes expressões [35]:



No trabalho desenvolvido por *Kumar* indicava que microcompósitos prata incorporados em poliamida 6 e 66 exibiam fraco poder antibacteriano, com uma diminuição de concentração da *E. coli* e *S. aureus* num fator de 10, com um contacto durante 7 dias e com 8 wt% de Ag [36]. Outro estudo, liderado por *Liu* apresenta uma eficácia superior para a poliamida 6 dopada com

prata de tamanho nanométrico com 2 wt%, onde foi reportado a morte total de *E. coli* ao fim de 24 horas. Esta eficácia manteve-se durante 100 dias [37]. Embora os testes não tenham sido efetuados com as mesmas condições, podemos afirmar que o uso de nanocompósitos apresenta resultados significativamente melhores. *C.Damm* e colaboradores, noutro estudo, demonstraram que a poliamida 6, PA6, quando conjugada com prata forma um nanocompósito que expressa comportamento antibacteriano em contacto com *E. coli*. Os resultados mostraram que a concentração de bactérias, quando expostas ao compósito de PA6, aumentam por um fator de 2, após 24h, o que indica que a PA6 sustenta o crescimento bacteriano de *E. coli*. No entanto, o mesmo ensaio foi feito com um nanocompósito de partículas de prata e PA6 onde foi observada a diminuição da concentração de bactérias nas suspensões, após 24h, indicando a morte das mesmas. O autor defende que a morte bacteriana foi devida aos iões metálicos libertados das superfícies. O processo de difusão dos iões de prata da superfície ocorre nas zonas amorfas do polímero, o que quer dizer que a taxa de libertação do ião metálico está dependente do grau de cristalinidade do polímero [36].

Capítulo 2

Materiais e Métodos

Os materiais e os métodos experimentais utilizados para atingir os objetivos do trabalho serão sumarizados nesta secção com uma descrição dos materiais, dos instrumentos e dos métodos.

2.1 Materiais

Alvos

Neste trabalho foram utilizados 4 alvos; óxido de zinco (Goodfellow - pureza 99,99 $\varnothing=100\text{mm}$); grafite (Testbourne Ltd., UK - pureza 99,9 %, $\varnothing=100\text{mm}$); cobre (Goodfellow - 99,99% de pureza, $\varnothing=100\text{mm}$) e poliamida 6,6 (Goodfellow - pureza 99,99%, $\varnothing=100\text{mm}$).

Substratos

Os filmes foram depositados sobre três substratos devido às diferentes necessidades das várias técnicas de caracterização; uma lamela de vidro ($25\times 70\times 2\text{mm}$), aço inoxidável 316L (AISI) ($10\times 10\times 1\text{mm}$), e silício (Si) ($\cong 1\times 1,2\text{cm}$). A limpeza dos substratos foi feita com detergente e água, seguida de um banho em etanol durante 15 minutos em ultrassons. Antes de serem colados ao porta-substratos com cola de prata, os substratos foram secos em corrente de ar quente.

2.2 Pulverização Catódica

A pulverização catódica é uma técnica que permite revestir materiais através da deposição de um filme sobre o material a modificar (substrato). Neste trabalho foram utilizados geradores de radiofrequência (r.f.) para efetuar a ejeção de material a partir do alvo.

O processo é baseado numa descarga de eletrões entre um cátodo (onde se coloca o alvo) e um ânodo (onde se coloca os substratos), colocados a uma distância constante, numa câmara

com atmosfera rarefeita. Após a introdução de um gás não reativo (Ar) é efetuada uma descarga ao estabelecer uma diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo. Deste modo há aceleração das partículas presentes no plasma em direção ao cátodo. Quando as energias e massas destas são suficientes para transmitir ao material do alvo uma energia superior à barreira de potencial de superfície, dá-se ejeção de átomos ou *clusters* de átomos, o que promove a ejeção do material em todas as direções e deposição nas paredes da câmara e no ânodo sob a forma de revestimento. As taxas de ejeção do material são proporcionais às energias das partículas de bombardeamento até um certo valor ótimo, a partir do qual a taxa de ejeção é constante mesmo para energias superiores.

Os parâmetros utilizados na deposição influenciaram as propriedades/características dos revestimentos. Com efeito, o tempo de deposição tem influência na espessura dos filmes, que como já referido na literatura, terá interferência na atividade antibacteriana apresentada pelos filmes. A pressão no interior da câmara irá influenciar o percurso médio livre das partículas. Pressões elevadas originam um grande número de colisões dentro do plasma, o que tem como consequência a chegada de partículas ao ânodo sem energia suficiente para efetuar a nucleação o que também se traduz numa diminuição da espessura. No entanto, pressões demasiado baixas diminuem a probabilidade de um eletrão promover diversas colisões com os átomos de gás. A determinação da pressão ideal é um fator importante para uma deposição eficiente. Outro parâmetro a ser avaliado é a potência que se fornece ao sistema e que está relacionada com a taxa de ejeção, onde uma maior diferença de potencial promove o aumento da corrente iónica.

Neste estudo foi utilizado o equipamento Edwards Coating System modelo E306A, com 2 geradores de radiofrequência, o Huttinger, modelo RFG 1000 RF, que alimentou o alvo de óxido de zinco e o gerador Eni Power Systems, modelo OEM12-05, que alimentou os alvos de grafite, cobre e poliamida. Os dois cátodos têm geometria planar o que permite a deposição simultânea de materiais com diferentes fluxos de ejeção. O gás de descarga foi argon com 99,9999% de pureza.

A limpeza por plasma ocorreu antes das deposições de forma a limpar resíduos presentes nos alvos e substrato. O processo de limpeza teve a duração de 5 minutos, a 0,7 Pa e com potência de 150 W sobre o alvo de ZnO.

Após a determinação dos parâmetros ótimos, as condições de deposição foram estabelecidas, tendo sido adotada uma nomenclatura ao longo deste trabalho onde as deposições de testes preliminares (Zn1, Zn2, Zn3 e Zn4) são pertencentes ao Grupo I. As deposições que deram origem aos filmes compósitos Zn5 (carbono,C), Zn6 (cobre, Cu) e Zn7 (poliamida, PA) serão pertencentes ao Grupo II. As condições de deposição estão sumarizadas na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Condições de deposição

	$P_{inicial}(Pa)$	$T_{f\text{limpeza}}(^{\circ}C)$	$P_{dep}(Pa)$	$t_{dep}(s)$	Alvo1 $W.cm^{-2}$	Alvo2 $W.cm^{-2}$	$T_f(^{\circ}C)$
Zn1	$8,9 \times 10^{-4}$	51	0,7	1800	3,18	-	169
Zn2	$6,0 \times 10^{-4}$	52	1,2	1800	3,18	-	158
Zn3	$7,9 \times 10^{-4}$	54	0,7	1800	4,46	-	189
Zn4	$6,8 \times 10^{-4}$	52	0,7	900	3,18	-	137
Zn5	$8,3 \times 10^{-4}$	31	0,7	900	3,18	2,55	132
Zn6	$8,6 \times 10^{-4}$	37	0,7	900	3,18	0,76	134
Zn7	$7,2 \times 10^{-4}$	34	0,7	900	3,18	0,76	109

2.3 Técnicas de Caracterização

2.3.1 Microscopia Eletrônica de Varrimento

A microscopia eletrônica de varrimento também conhecida pela sigla SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*, é uma técnica que permite a caracterização morfológica da superfície dos materiais.

Um feixe de elétrons, convergido por campos magnéticos, é acelerado por um ânodo. Esse feixe incide sobre a amostra e como resultado da interferência ocorre difusões e emissão de elétrons. Das colisões inelásticas surgem elétrons secundários quando as espécies atingidas pelo feixe absorvem energia e libertam um elétron próprio da superfície da amostra e permite assim criar uma imagem da morfologia superficial.

Para além de absorvidos, os elétrons podem também ser difundidos. Esta interação com o material ocorre a uma maior profundidade do que a que origina os elétrons secundários. Estes são designados de elétrons retrodifundidos, e têm um fluxo eletrônico proporcional ao número atômico dos elementos presentes na amostra, originando assim uma imagem com diferentes tons de cinza [38] [39] [40].

A espessura dos filmes é observada após a fratura da superfície revestida através de uma micrografia transversal. Neste trabalho foram utilizados dois equipamentos, um com um filamento de tungstênio da marca JOEL modelo-XL30 e outro com canhão de emissão por efeito de campo (FEG – do inglês “*Field Emission Gun*”) marca FEI Quanta 400 FEG ESEM.

2.3.2 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica, também conhecida como AFM, do inglês *Atomic Force Microscopy*, é usada para caracterização topográfica de superfícies através das interações entre uma ponta sensível acoplada a um braço mecânico, o *cantilever*, e a superfície da amostra [41].

A superfície pode apresentar diferentes respostas relativamente à presença da ponta dependendo da distância relativa entre as estruturas. Com a aproximação da ponta à superfície da amostra surge um regime atrativo onde predominam forças *Van der Waals*. Com a contínua

aproximação da ponta há uma conversão para o regime repulsivo entre as orbitais dos átomos da superfície da amostra e os da ponta do microscópio que impelem a agulha no sentido contrário devido à predominância de forças eletrostáticas [42].

A técnica de AFM faz um varrimento da amostra, nas 3 dimensões x,y,z . O *cantilever* oscila com base no movimento da ponta quando sujeita às interações com a superfície (forças de atração ou repulsão). A detecção das oscilações é feita por um feixe laser que incide na parte superior espelhada do *cantilever* e reflete o raio. Este é lido num fotodetector que localiza as variações nanométricas através de variações na posição e intensidade do raio refletido. Estes sinais, após processamento, permitem a criação de uma imagem topográfica com resolução atômica [41] [43].

A ponta da agulha pode estar em modo de contacto direto com a superfície, em modo-não-contacto, onde o varrimento e leitura da amostra é feito pelas forças interatômicas, ou em modo intermitente, onde o *cantilever* oscila na sua frequência de ressonância tocando gentilmente a superfície da amostra a cada ciclo de oscilação (modo *tapping*) [44].

O microscópio utilizado foi o modelo diInnova da marca Veeco com uma ponta de silício da marca Bruker, com frequência de ressonância, f_0 , de 150kHz e constante de mola, k , entre 10 N.m^{-1} em modo de contacto intermitente. O tratamento de imagens e de dados foi efetuado no programa “*Gwyddion*”.

2.3.3 Difração de Raios X

A difração de raios X, XRD, do inglês *X-Ray Diffraction*, permite caracterizar a microestrutura e o grau de organização estrutural [45].

A difração de raios X utiliza um feixe de radiação monocromático sobre as superfícies. Os materiais cristalinos são compostos por unidades celulares que se repetem regularmente no espaço com distâncias uniformes e que vão influenciar o padrão de difração onde diferentes planos de átomos dos materiais cristalinos vão difratar os raios X, como o representado na figura 2.1 [46].

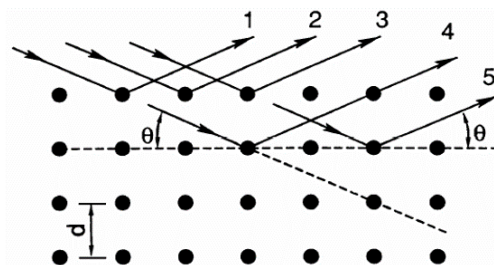


Figura 2.1: Difração de raios X sobre uma estrutura cristalina [46].

Se a diferença de espaçamento para planos sucessivos é um número inteiro de comprimentos

de onda, ocorre a conjugação das ondas e surge um feixe difratado de forte intensidade [47].

Este comportamento é descrito pela lei de Bragg:

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

onde d representa o espaço interplanar, θ o ângulo de incidência entre o feixe incidente e os planos cristalinos, n a ordem de reflexão (número inteiro) e λ o comprimento de onda do feixe.

A estrutura atômica é deduzida pela forma como os raios interagem com as superfícies e são difratados em diferentes direções e intensidades, para diferentes ângulos ou comprimentos de onda incidentes [46]. Os padrões dos cristais são definidos por 3 integradores, h , k e l , denominados por índices de *Miller* que descrevem a ordem de difração das ondas difratadas [47] [48].

Neste estudo foi utilizado o equipamento de micro difração *Pan Alytical*, modelo X'Pert, usando uma tensão de aceleração de 40 kV e uma intensidade de corrente de 35 mA, equipado com detector unidirecional. Este equipamento possui anticátodo de Cobre com $\lambda(K\alpha_1)=0,15406$ nm. Os ensaios foram efetuados em modo contínuo com um detector PIXcel, com um intervalo de difração 2θ compreendido entre 10° e 100° com um passo de 0,1 e tempo de aquisição de 0,5 s por passo. A identificação das fases presentes nos filmes foram feitas por comparação da posição dos picos presentes nos difractogramas com os valores tabelados nas fichas ICDD5, apresentadas no anexo 22.

2.3.4 Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier, frequentemente denominada FTIR, do inglês *Fourier Transform InfraRed*, utiliza radiação infravermelha sobre uma amostra. A técnica cria um espectro de absorvência, para diferentes números de onda, onde se define uma relação entre a absorção de energia e a frequência de vibrações das ligações covalentes do material. A radiação absorvida estimula níveis de energia específicos do material, correspondentes a grupos químicos funcionais específicos, que podem sofrer fenômenos de alongamento, torção e rotação. Os picos de absorvência serão correspondentes às frequências de vibração entre as ligações covalentes e o tamanho dos picos têm uma proporção direta com a quantidade relativa dessas ligações na amostra. Assim, para além de permitir identificar os grupos funcionais presentes na amostra com frequências vibracionais próprias, permite também avaliar a qualidade e consistência das amostras [40] [42].

Para esta caracterização foi utilizado o substrato de aço devido às ligações metálicas que vão permitir uma análise sem interferências do substrato, pois a FTIR deteta apenas ligações covalentes.

A caracterização foi feita com o Espectrómetro Frontier (FT-NIR/MIR) da Perkin Elmer, equipado com um detector FR-DTGS e um divisor de feixe de KBr. O registo dos espectros foi

efetuado com resolução 4.0 cm^{-1} com 16 acumulações e recorrendo à técnica de amostragem não destrutiva de refletância total atenuada (ATR).

2.3.5 Espectroscopia de Fotoeletrão X

A Espectroscopia de Fotoeletrão X, também conhecida como XPS, *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, permite identificar e quantificar o tipo de ligações presentes na superfície de um material até 10 nm de profundidade através da incidência de raios X monocromáticos sobre a amostra o que induz a emissão de eletrões [42].

A energia cinética com que um eletrão é libertado depende das energias de ligação na superfície e radiação incidente. Durante o processo um detetor determina a velocidade com que os eletrões são libertados da amostra e conseqüentemente a energia cinética dos mesmos. A energia cinética dos eletrões emitidos é inversamente proporcional à energia de ligação. Ao estabelecermos esta relação podemos determinar o valor da energia de ligação do eletrão emitido. A configuração eletrónica específica e única dos elementos presentes é encontrada e é determinado os tipos de ligação que se estabelecem entre os elementos [49].

O espectrofotómetro utilizado neste estudo foi o *Kratos Axis Ultra HSA* equipado com fonte de raios X com radiação monocromática Al-K α ($\lambda = 0,83401 \text{ nm}$). Os fotoeletrões foram detetados a 90° em relação a superfície do material.

2.3.6 Espectroscopia do Visível/UV

A espectroscopia do Visível-Ultravioleta direciona um feixe de radiação eletromagnética monocromática nas gamas do visível/UV (200-800 nm) sobre a amostra, e deteta a intensidade de energia absorvida pela mesma. A energia absorvida é descrita pela lei de Beer-Lambert, onde a quantidade de luz absorvida (A), depende da concentração do meio absorvente (c), do coeficiente de absorção da espécie absorvente (α) e da espessura do meio ótico (l) [50] [38].

$$A = \alpha \cdot c \cdot l$$

A obtenção dos espectros foi feita com o espectrofotómetro Jasco V-530 sobre as lamelas de vidro revestidas. Dado que se trata de um espectrofotómetro com duplo feixe, no local de referência foi colocada uma lamela de vidro não revestida.

2.3.7 Medição dos Ângulos de Contacto Estático

A medição do ângulo de contacto estático entre um líquido e uma superfície depende de vários factores como a rugosidade, a topografia e a composição química. Esta técnica, permite, entre outros, avaliar a hidroflicidade/ hidrofobicidade das superfícies [51] [52].

Considerando uma superfície plana, o ângulo de contacto estático pode ser definido como resultado do equilíbrio mecânico de uma gota em repouso sobre uma superfície sólida e plana sujeita a 3 tensões superficiais. A relação entre as três tensões de interface está representada na figura 2.2; tensão líquido-vapor (γ_{lv}), tensão sólido-vapor (γ_{sv}) e tensão sólido-líquido (γ_{sl}) e no ponto de interseção das mesmas, θ , é o ângulo formado pela tangente do ponto de contacto [53].

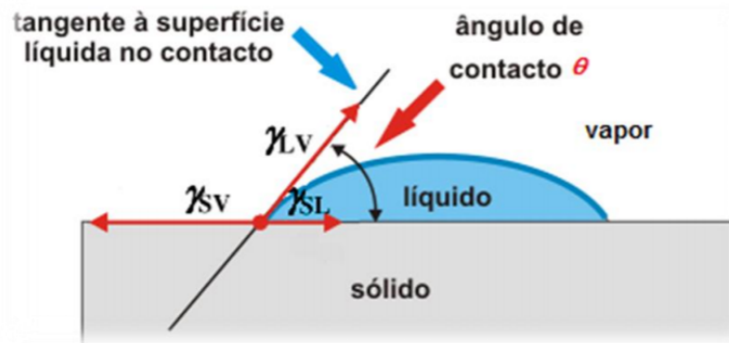


Figura 2.2: Representação das três tensões de interface resultantes do equilíbrio mecânico de uma gota em repouso sobre uma superfície sólida [53]

A equação de *Young* permite relacionar todos os parâmetros:

$$\gamma_{lv} \cdot \cos\theta = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}$$

$$\cos\theta = \frac{\gamma_{sv} - \gamma_{sl}}{\gamma_{lv}}$$

Dada a utilização pretendida, contacto com superfícies biológicas, é considerado que se o ângulo θ for inferior a 65° graus diz-se que a superfície tem uma boa molhabilidade, e é hidrofíla, se pelo contrário, for superior a 65° graus diz-se que a superfície é hidrófoba [53] [38].

A medição do ângulo de contacto estático foi feita com o aparelho *Dataphysics, modelo OCA 20* com uma gota de $10 \mu\text{l}$ de água destilada. Cada medição foi repetida 5 vezes em cada superfície e o valor médio calculado.

2.3.8 Potencial Eletrocinético

As superfícies apresentam grupos químicos capazes de sofrer ionizações e produzir uma superfície carregada com uma absorção preferencial por determinadas cargas. O potencial zeta, ζ , permite avaliar o comportamento das superfícies quando em contacto com eletrólitos.

O potencial zeta é medido no plano de cisalhamento entre o material a analisar e os eletrólitos direcionados sob pressão para a superfície. As partículas carregadas formam uma camada imóvel de contra-íons fortemente ligados na interface líquido-superfície, a camada de *Stern*. Numa segunda camada mais externa, porque a organização iônica é mais difusa, devido às

forças de ligação mais fracas, camada de *Gouy-Chapman*, ocorre quebra de ligações devido à tensão de corte provocada pela pressão do eletrólito.

O potencial da interface entre a camada de *Stern* e a de *Gouy-Chapman* é conhecido como potencial zeta e é função da carga superficial e composição do meio que a circunda e correlaciona a repulsão eletrostática na interface [54]. Esta pode ser correlacionada com a corrente gerada pela passagem do eletrólito através da equação de *Helmholtz-Smoluchowski*:

$$\zeta = \frac{dl}{dp} \times \frac{\eta}{\varepsilon \times \varepsilon_0} \times \frac{L}{A}$$

onde, $\frac{dl}{dp}$ representa o declive da curva de corrente em função da pressão; η a viscosidade do eletrólito; ε a constante dielétrica do eletrólito; ε_0 a permissividade em vácuo; L o comprimento do canal de medição e A a área transversal do canal de medição [54].

Os filmes foram analisados pelo equipamento SurPASS, da AntonPaar com uma célula de medição de aperto. O eletrólito utilizado nas medições foi KCl 1 mM, a pH 7,0.

2.4 Testes Bacterianos

2.4.1 Avaliação da resistência/susceptibilidade bacteriana a Zn^{2+}

A avaliação da resistência microbiana ao ião de zinco (Zn^{2+}) consistiu na determinação da concentração mínima inibitória, CMI, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*, MIC, ao sulfato de zinco, $ZnSO_4$, para 18 estirpes da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade de Coimbra. O $ZnSO_4$ foi selecionado, com base na sua constante de dissolução que origina o ião Zn^{2+} e que, segundo a literatura, será um dos responsáveis pela toxicidade dos filmes em estudo. As estirpes selecionadas foram; *A37T2*, *B29T1*, *M47T1*, *M24T3*, *Rhodanobacter sp. A2-61*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli 40*, *Ochrobactrum tritici 5bv11*, *Ochrobactrum tritici SCII24*; *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Bacillus subtilis*, *Microbacterium sp.3A* e *Pseudomonas fluorescens*.

Os ensaios foram realizados em meio R2A (extrato levedura 0.5g/l ; peptona 0.5g/l ; caseína 0.5g/l; ácido fólico 0.001g/l; amido 0.5g/l; piruvato 0.3g/l; fosfato de potássio 0.3g/l; sulfato de magnésio 0.024 g/l; agár 15g/l) suplementados com concentrações crescentes. Em seguida foram preparadas suspensões bacterianas equivalentes a 0,5 unidades de turbidez na escala de *McFarland* e 5 μ L de cada suspensão foram colocados sobre os meios de cultura R2A com as diferentes concentrações de sulfato de zinco. As placas foram incubadas durante 5 dias à temperatura de 25°C e os crescimentos bacterianos foram avaliados após 2 e 5 dias de incubação.

Da avaliação dos resultados dos MICs, duas bactérias foram selecionadas para análise dos filmes em ensaios futuros, uma com elevada resistência e outra sensível ao ião Zn^{2+} , a saber *P.*

aeruginosa e *S. aureus*.

2.4.2 Avaliação do efeito de diferentes filmes no crescimento bacteriano

Os filmes depositados sobre silício foram testados em meio líquido e sólido. Os quatro filmes de composição distinta, Zn4, Zn5, Zn6 e Zn7, que correspondem a ZnO, ZnO/C, ZnO/Cu, ZnO/PA, respectivamente, foram avaliados pela resposta que apresentavam à colonização das duas bactérias selecionadas no teste anterior. As superfícies, colocadas em microplacas de 12 poços, foram inicialmente desinfetadas com 2 mL de solução de etanol a 70% durante 10 minutos com agitação 50 rpm. As superfícies foram depois secas por evaporação natural durante 20 minutos.

Ensaio em meio líquido

Os ensaios em meio líquido foram realizados para avaliar a adesão bacteriana às superfícies, a capacidade de produção de biofilme sobre essas superfícies e a possível inibição de crescimento bacteriano.

As bactérias selecionadas foram usadas para a preparação de suspensões em meio líquido R2, com 0,5 unidades de turbidez na escala de *McFarland* e incubados a 36° a 130 rpm. Após 24 horas, as suspensões foram diluídas para uma densidade óptica igual a 0,2, e 2 mL destas suspensões foram colocados nos poços 12 poços como o ilustrado na figura 2.3. As superfícies revestidas foram adicionadas aos poços de forma a ficarem completamente submersas nas suspensões, tendo todos os ensaios sido efetuados em duplicado.

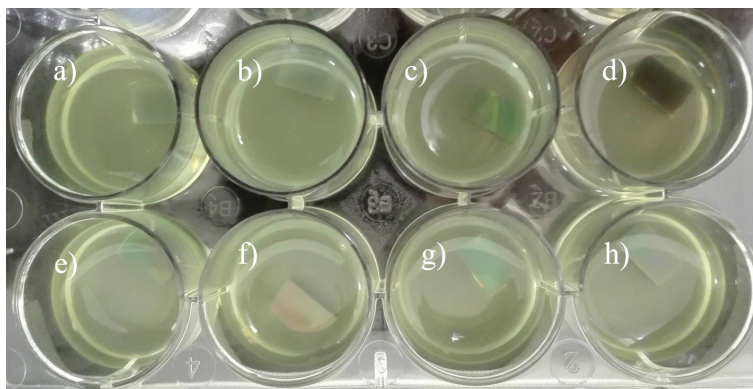


Figura 2.3: Microplaca de 12 poços com superfícies submersas em 2mL de inóculo de *P.aeruginosa*

Os ensaios decorreram segundo três condições de crescimento (A, B, C) numa estufa com agitação, 110 rpm, a 36° C durante 38 horas.

Condição A: Com incidência de luz visível constante sobre a cultura;

Condição B: Com crescimento no escuro;

Condição C: Com pré tratamento UV. As microplacas foram sujeitas a um tratamento de 15 minutos sob luz ultra-violeta de comprimento de onda 365 nm a uma altura de 13,8 cm. Posteriormente foram incubadas no escuro.

As superfícies, antes de observadas em SEM, foram sujeitas a um processo de limpeza, fixação e desidratação. A limpeza foi efetuada com 2 mL de solução tampão fosfato salino, por duas vezes, de forma a retirar as células que não aderiram à superfície. A fixação foi realizada com 2mL de solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v). A etapa da fixação permitiu a manutenção da estrutura das células antes da etapa de desidratação. O processo de desidratação foi realizado através da adição de 2 mL de soluções de etanol a 70, 80, 90, 95 e 100% (v/v). Cada uma das etapas (limpeza, fixação e desidratação) descritas teve uma duração de 10 minutos com agitação, 110 rpm.

Ensaio em meio sólido

As superfícies Zn4, Zn5, Zn6 e Zn7 foram também testadas em meio sólido de forma a avaliar se possuíam caráter antibacteriano e quando em contacto direto com os meios de cultura, com a difusão de iões e ROS com consequente produção de halos de inibição.

As suspensões das bactérias anteriormente selecionadas com 0,5 unidades na escala de *McFarland* foram preparadas e 100 µL destas foram espalhadas sobre o meio R2A, com o auxílio de uma alça de *Drigalsky* de forma a obter um espalhamento bacteriano homogêneo sobre o meio de cultura. Os testes decorreram em três condições diferentes (D, E, F) e com incubação numa estufa a 36°C, durante 38 horas.

Condição D: As superfícies revestidas dos filmes foram colocadas em contacto direto com as bactérias e incubadas com incidência de luz constante sobre o fundo das placas de *Petri*;

Condição E: As superfícies revestidas dos filmes foram colocadas em contacto direto com as bactérias e incubadas no escuro;

Condição F: Após o processo de limpeza, os filmes foram expostos a um tratamento de 15 minutos de luz UV de comprimento de onda 365 nm a uma altura de 13,8 cm. Após o tratamento UV, as superfícies revestidas dos filmes foram colocadas em contacto com as bactérias e incubadas no escuro.

Os testes de avaliação de halos de inibição são geralmente realizados usando discos onde a medição do halo é feita partindo do centro da circunferência até à zona de crescimento bacteriano [55]. No entanto, dado que as superfícies em estudo têm geometria retangular, a medição dos halos foi feita perpendicularmente ao limite externo das superfícies até ao início da área de crescimento bacteriano.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Morfologia/ Topografia

A análise morfológica por SEM permitiu a observação das topografias da secção transversal dos revestimentos. Como já referido as deposições efetuadas neste trabalho podem ser divididas em dois grupos; o grupo I (Zn1, Zn2, Zn3, Zn4), que engloba as deposições teste que serviram para selecionar as condições de deposição e o grupo II que originou as superfícies compósitas (Zn5, Zn6 e Zn7).

De acordo com o diagrama de *Thorton*, figura 3.1, podemos observar o tipo de morfologia transversal e superficial expectável considerando as condições de deposição e a temperatura de fusão (T_m) do material que constitui os revestimentos. As deposições dos filmes foram efetuadas a 10 mTorr (0,70 Pa). A temperatura média final de 141°C medida na parede da câmara de deposição, indica que a temperatura de deposição é muito mais elevada o que, em princípio situará a razão T/T_m na zona T ou entre esta e a zona 2. Quando as forças de coesão, entre as partículas do filme, são superiores à força de adesão entre os átomos do filme e do substrato, o revestimento cresce por camadas. Pelo contrário se as forças adesivas forem superiores às coesivas, os átomos fixam-se fortemente ao substrato e as espécies que vão chegando crescem em volta destes, formando um crescimento por "ilhas", originando um crescimento colunar. Condições de deposição semelhantes às utilizadas neste trabalho foram descritas na literatura como dando origem a estruturas da zona T e zona II. [28].

A influência de 3 parâmetros foi estudada; o tempo, a pressão e a potência fornecida ao alvo. Na figura 3.2 podem ser observadas as morfologias superficial e transversal dos filmes finos do grupo I, que revelam, de acordo com o diagrama de *Thorton*, morfologias típicas da zona T e zona II, o que está de acordo com o anteriormente referido.

A influência da pressão de deposição foi avaliada pela comparação dos filmes Zn1 e Zn2, com deposições a 0,7 Pa e 1,2 Pa, respetivamente. O aumento de pressão causou uma diminuição na espessura do filme que passou de 1650 nm para 1150 nm. Com efeito, para uma pressão

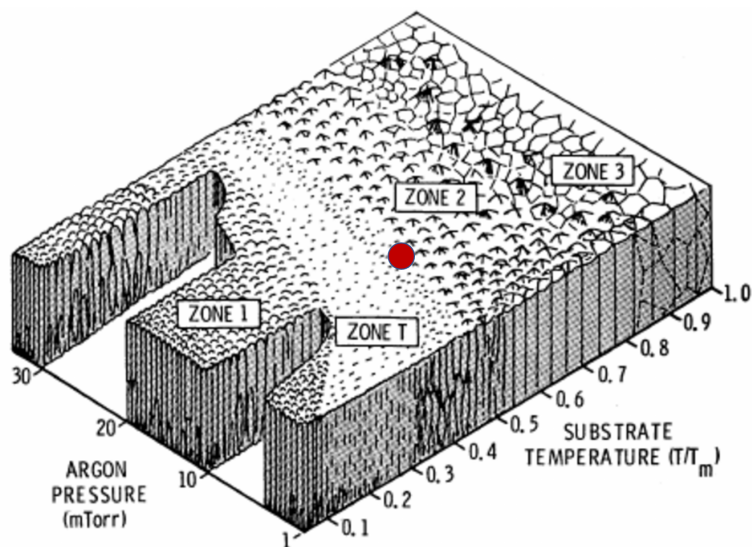


Figura 3.1: Diagrama de Thornton com as condições de deposição efetuadas ao longo deste trabalho assinaladas a vermelho. Figura adaptada de [56]

mais elevada o caminho médio livre das partículas ejetadas diminui, isto é, a probabilidade do número de colisões com outras partículas aumenta. Este facto tem como consequência a perda de energia das partículas ejetadas do alvo, bem como desvios no seu percurso o que implica que podem não ficar com a energia suficiente para chegar ao substrato ou podem ser “desviadas” e serem depositadas nas paredes da câmara.

Os filmes Zn1 e Zn3 foram depositados com parâmetros de deposição iguais à excepção da potência do alvo. O filme Zn1 foi depositado com uma densidade de potência de $3,18 \text{ W.cm}^{-2}$ e o Zn3 com $4,46 \text{ W.cm}^{-2}$. As micrografias apresentam espessuras semelhantes para os dois filmes, evidenciando que o aumento do número de partículas ejetadas é semelhante para as duas densidades de deposição utilizadas. No entanto, a secção transversal é ligeiramente distinta, apresentando estruturas colunares de maiores dimensões, para a densidade de deposição mais elevada. Com efeito, neste caso aumenta a taxa de ejeção do material do alvo o que faz com que a quantidade de adátomos que chega ao substrato seja maior. Por este motivo os agregados de ilhas crescem rapidamente e formam zonas de sombra na zona do substrato adjacentes a elas, o que induz um crescimento não uniforme do filme originando uma superfície acidentada.

O último parâmetro a ser analisado é o do tempo de deposição. O filme Zn1 foi depositado durante 30 minutos e apresenta uma espessura de 1650 nm e o filme Zn4, depositado durante 15 minutos conta com 500 nm de espessura. Segundo a literatura os filmes que apresentam maior poder antibacteriano normalmente apresentam espessuras compreendidas entre os 200 e 600 nm [28], sendo a deposição Zn4 a mais indicada. Para além deste facto, que resulta da aplicação final para os filmes finos estudados, a escolha de uma espessura mais baixa prende-se também com o tipo de morfologia superficial (consequência observada transversalmente).

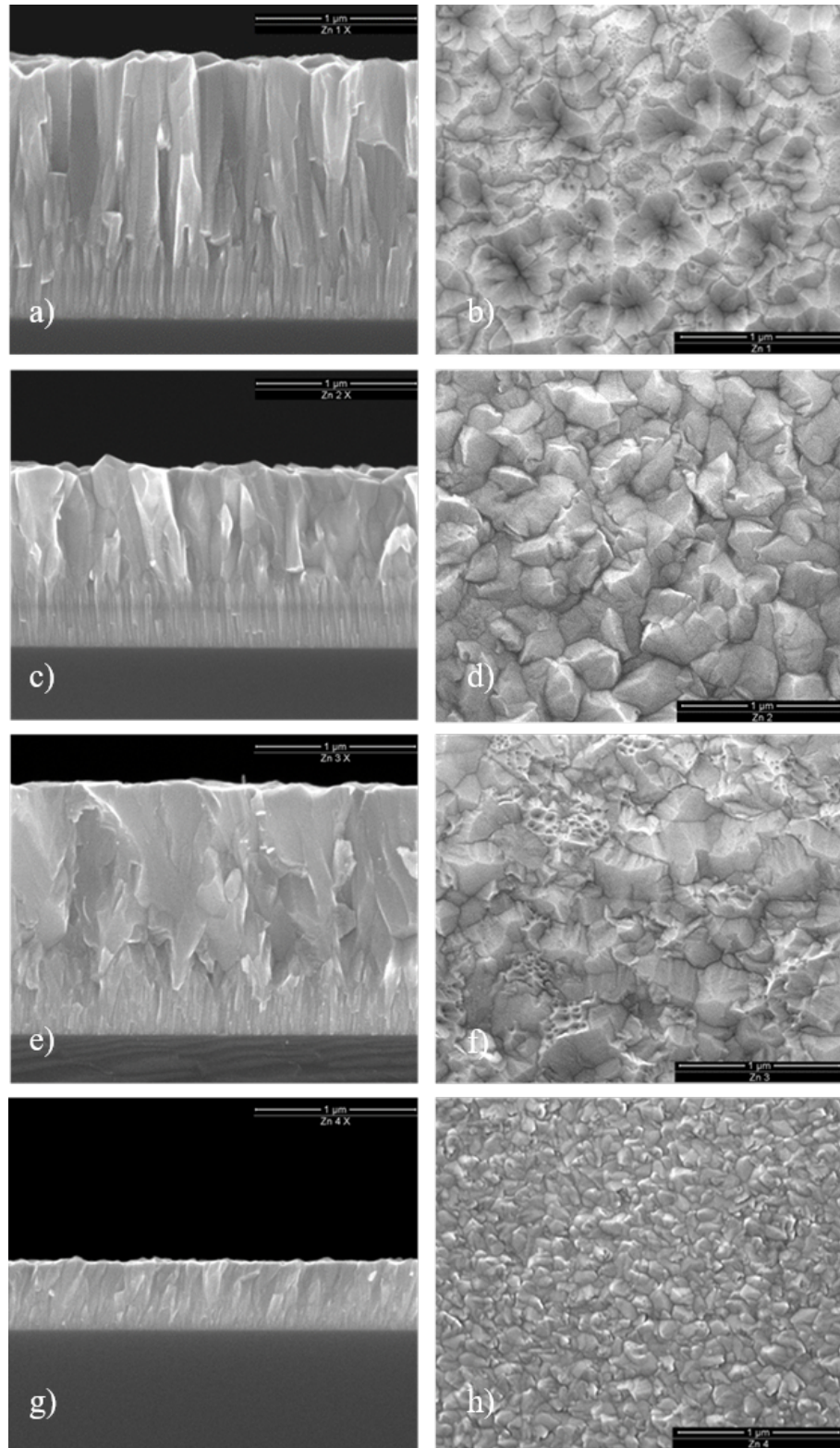


Figura 3.2: Micrografias SEM da secção transversal(a, c, e, g) e da superfície(b, d, f, h) das deposições do grupo I - a, b) Zn1; c, d) Zn2; e, f) Zn3; g, h) Zn4

Todos os filmes até agora analisados apresentam um crescimento em colunas com reduzida dimensão até cerca de 600-700 nm de espessura, valor a partir do qual as colunas aumentam de diâmetro. Este facto foi observado em todos os filmes, independentemente da variação de parâmetros de deposição utilizados, o que está de acordo com o descrito na literatura. Com efeito, e de acordo com o já referido, com a formação da primeira estrutura colunar (até cerca de 600 – 700 nm), o próprio material depositado gera uma membrana térmica que impede os efeitos de arrefecimento do substrato e, conseqüentemente, leva a uma maior liberdade de movimento das espécies que formam a segunda camada colunar que, devido a uma maior difusão dão origem a estruturas mais largas e compactas, características da zona II do diagrama de *Thorton*.

Acresce o facto que a seleção do filme fino Zn4 permite que nos estudos de interação da superfície com as células procaríotas apenas a química da superfície seja responsável pelos resultados e não a sua topografia, uma vez que a superfície dos filmes Zn1, Zn2 e Zn3, são bastante distintas com variações pico/vale superiores às observadas para Zn4.

As condições de deposição foram determinadas após a análise do grupo I, com a determinação de um tempo de deposição de 15 minutos, uma pressão de 0,7 Pa e uma densidade de deposição de 3,18 W.cm² para o alvo de ZnO. Os filmes Zn4 foram usados como filmes monolíticos para o desenvolvimento dos filmes compósitos. Os filmes compósitos foram obtidos por co-deposição com alvos de carbono (Zn5 densidade de deposição de 2,55 W.cm²), de cobre (Zn6) e de poli-amida (Zn7), ambos com densidades de deposição de 0,76 W.cm².

As micrografias da superfície destes filmes são muito semelhantes à observada para o filme Zn4, como pode ser observado para a superfície Zn7, figura 3.3, que é representativa das superfícies dos filmes do grupo II.

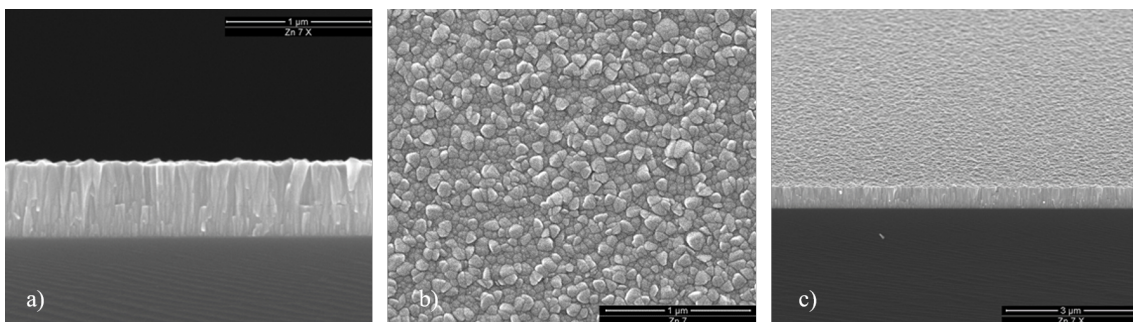


Figura 3.3: Micrografias do filme fino Zn7, a)secção transversal, b)superfície e c)substrato inclinado

As espessuras dos filmes foram estimadas pelas micrografias transversais e apresentada na tabela 3.1. O filme compósito de cobre (Zn6) foi o que apresentou maior espessura devido ao seu elevado rendimento de pulverização do elemento metálico, o que implica que a quantidade de espécies ejetadas do alvo, por cada ião Ar⁺ incidente, é superior. O filme Zn5 apresenta a menor espessura pois o carbono apresenta um muito baixo rendimento de pulverização.

Tabela 3.1: Espessura dos filmes medidas nas micrografias SEM transversais

Zn1	Zn2	Zn3	Zn4	Zn5	Zn6	Zn7
1635nm	1135nm	1613nm	455nm	385nm	705nm	522nm

As micrografias das secções transversais dos filmes Zn6 e Zn7, na figura 3.4, permitem observar que a co-deposição com qualquer um dos materiais não induz alterações significativas na morfologia, quando comparados com o filme monolíticos de ZnO.

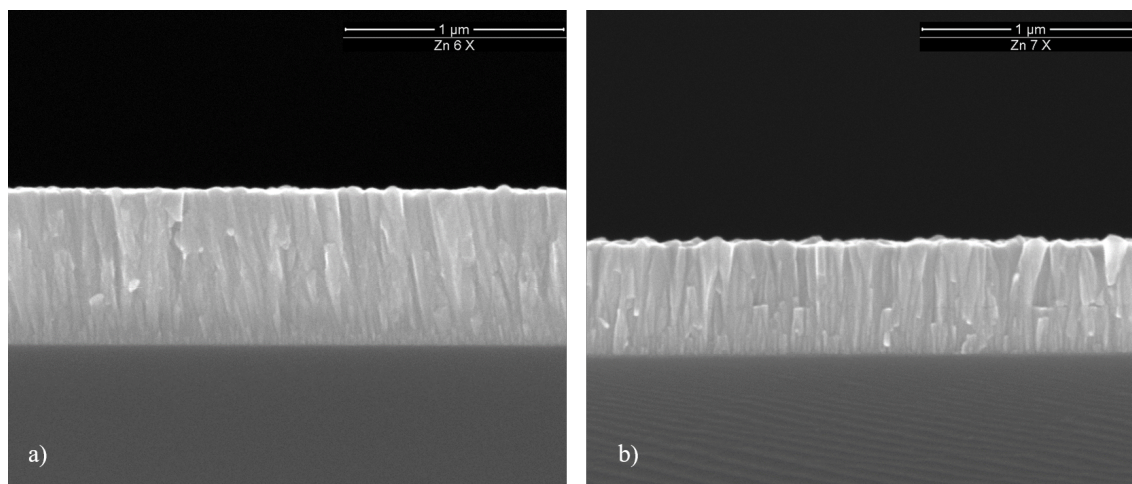


Figura 3.4: Micrografias da secção transversal dos filmes Zn6 (a) e Zn7 (b)

A caracterização por AFM permitiu uma caracterização topográfica mais precisa. As imagens foram tratadas no programa *Gwyddion* com o alinhamento das superfícies através de uma função polinomial de terceiro grau.

A figura 3.5 apresenta as imagens obtidas por AFM para os filmes do grupo II, onde no lado esquerdo estão as imagens topográficas e no lado direito as imagens de fase. É possível identificar partículas bem definidas, sendo a superfície Zn5 a que apresenta as de maiores dimensões seguida da Zn7 e com a Zn6 a apresentar as partículas mais pequenas.

A imagem de fase permite visualizar a presença de materiais distintos numa superfície. Em todos os filmes a presença do segundo material ocorre preferencialmente na fronteira das partículas. Comparando as imagens de fase das três superfícies podemos afirmar que o filme fino Zn5, figura 3.5 é o que tem maior densidade de material co-depositado, seguido do Zn7 e Zn6.

Análise da rugosidade

A rugosidade de uma superfície é definida pelas irregularidades em relação a uma linha média ao longo da área em análise. Dois indicadores frequentemente usados para definir a rugosidade de um material são a raiz quadrada da rugosidade média R_{ms} (ou S_{ms} , no caso de

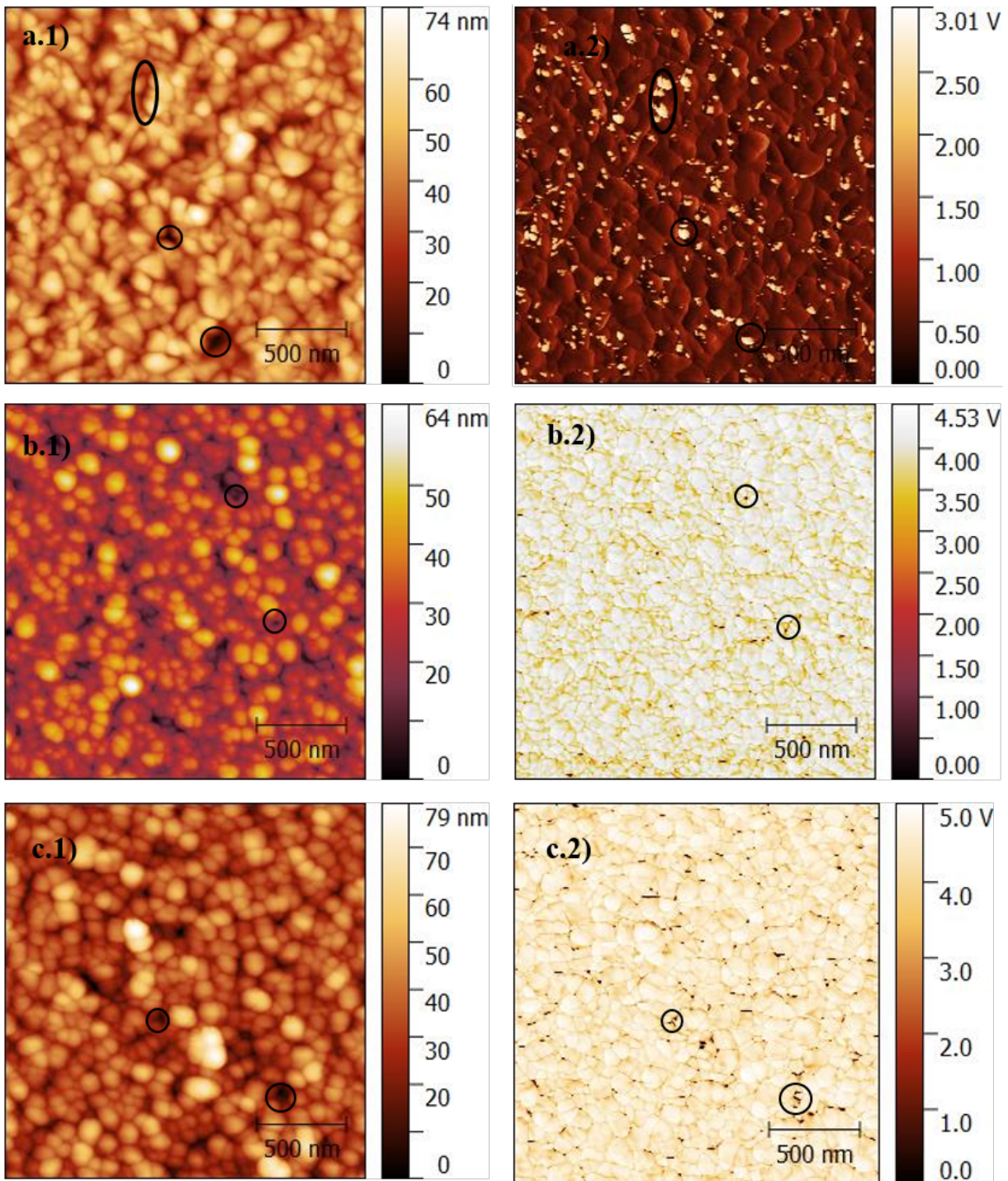


Figura 3.5: Imagens AFM dos filmes a)Zn5, b)Zn6 e c)Zn7. Imagens topográficas na coluna da esquerda e de fase na da direita.

superfícies) e que representa a raiz quadrada do valor médio do quadrado das distâncias Z_i dos pontos i do nível médio da superfície:

$$R_{ms} = (1/N \times \sum Z_i^2)^{1/2}$$

O nível médio da superfície é a linha imaginária que serve de referência para as medições da

rugosidade. Esta linha é paralela à superfície, onde numa vista de perfil os somatórios das áreas contidas entre cada lado da linha são iguais. Assumindo que as variações de altura são medidas como Z_i na direção $\pm Z$, o nível médio da superfície deve satisfazer a seguinte equação:

$$\sum Z_i = 0$$

A rugosidade média, R_a (ou S_a para superfícies) é definida pela média dos valores absolutos das variações Z_i medidas com referência no nível médio da superfície:

$$R_a = 1/N \times \sum |Z_i|$$

Superfícies niveladas, com pequenos desvios de Z_i apresentam valores R_{ms} e R_a semelhantes. No entanto, se existirem lacunas ou vales e picos elevados, o valor de R_{ms} será maior que o de R_a [41]. A razão R_{ms}/R_a permite também avaliar se a rugosidade da superfície segue uma distribuição Gaussiana, que se verifica se os valores estiverem próximos de 1,25 e não superiores a 1,31. Caso o valor da razão esteja compreendido neste intervalo podemos aplicar algumas relações estatísticas como o conceito de curtose, *kurtosis*, R_{ku} :

$$R_{ku} = \frac{1}{NR_{ms}^4} (\sum_{i=1}^K Y_i^4)$$

onde Y é a altura do perfil no ponto i . Este parâmetro mede a distribuição dos picos relativamente ao plano médio, onde superfícies pontiagudas terão $R_{ku} > 3$, superfícies achatadas, $R_{ku} < 3$ e para superfícies completamente aleatórias $R_{ku} = 3$. A simetria das variações do perfil sobre o plano médio também foi calculada e, é tipicamente referida como *skewness*, R_{sk} [43] [41]. Este parâmetro tem grande sensibilidade para desvios ocasionais de elevada amplitude. Estes parâmetros foram determinados automaticamente pelo programa *Gwyddion*, e apresentados na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Tabela de parâmetros de rugosidade

	Sa (nm)	Sms(nm)	Sms/Sa	Skewness	Kurtosis
Zn1	20,35	26,12	1,28	-0,51	0,75
Zn2	17,21	21,36	1,24	-0,04	-0,173
Zn4	8,79	10,98	1,25	-0,14	-0,08
Zn5	7,78	9,81	1,26	-0,02	0,06
Zn6	6,72	10,16	1,51	-	-
Zn7	8,08	10,4	1,29	0,48	0,80

Como esperado, as superfícies do grupo I, que tiveram maior tempo de deposição, apresentaram maior rugosidade, pois as formações colunares formaram diâmetros de maiores dimensões, dando origem a superfícies mais acidentadas.

As rugosidades S_{ms} e S_a apresentam valores semelhantes para todas as superfícies com tempo de deposição de 15 minutos e, à exceção da superfície Zn6 seguem todas uma distribuição Gaussiana quanto à sua rugosidade em relação à escala da imagem.

Todos os filmes analisados apresentam valores de *kurtosis*, R_{ku} , inferiores a 3 o que indica que não existem picos ou vales com valores muito discrepantes da linha média e que a superfície apresenta irregularidades suaves.

A análise da assimetria, *skewness*, R_{sk} , apresenta valores negativos para todos os filmes à exceção do Zn7. Os valores negativos deste parâmetro revelam que os vales são dominantes na superfície para os filmes Zn1, Zn2, Zn4 e Zn5. O filme Zn7 apresenta pelo contrário maior número de picos.

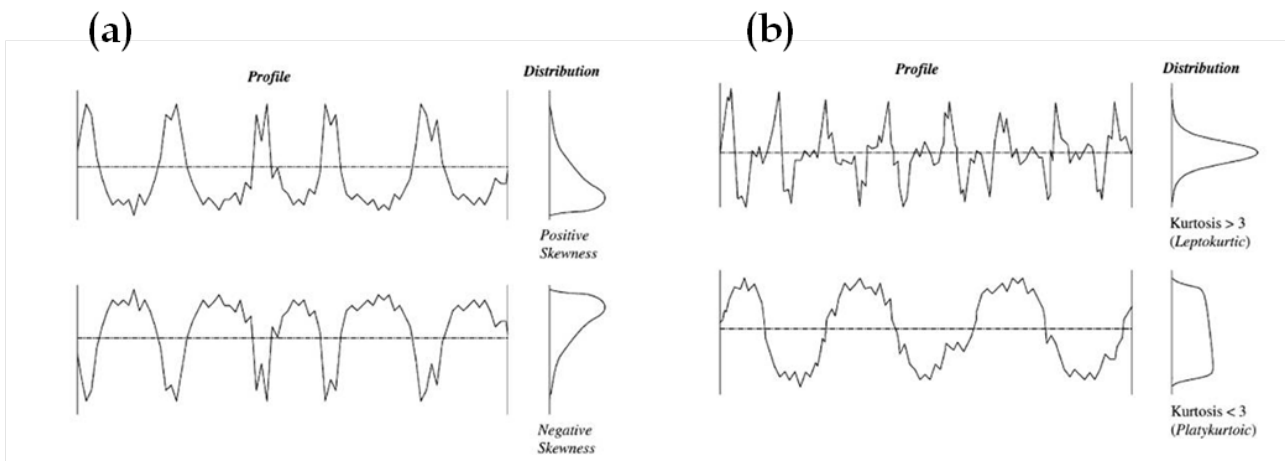


Figura 3.6: Esquema de a) *Skewness* e b) *kurtosis* [57]

3.2 Estrutura

O ZnO pode cristalizar sobre 3 formas estruturais; blenda, *rock salt* ou wurtezite [1] [58]. A análise, por difração de raios X, foi feita sobre o alvo e nos revestimentos depositados sobre superfícies de vidro.

A figura 3.7 apresenta o difractograma do alvo de ZnO, com picos de difração para valores de 2θ de $31,65^\circ$, $34,35^\circ$, $36,15^\circ$, $47,45^\circ$, $56,45^\circ$, $62,75^\circ$, $66,25^\circ$, $67,85^\circ$, $68,95^\circ$, $72,65^\circ$, $76,85^\circ$, $81,45^\circ$, $89,65^\circ$. Estes foram identificados com sendo os planos do ZnO, de acordo com a ficha ICDD 01-075-0576 *The International Centre for Diffraction Data*, presente no anexo, na figura 22.

Os difractogramas das superfícies estão presentes na figura 3.8. No grupo de deposições I foram alteradas a pressão, a potência e o tempo de deposição. Os planos de difração presentes são os mesmos que foram identificados para o alvo, o que é natural dado tratar-se do mesmo

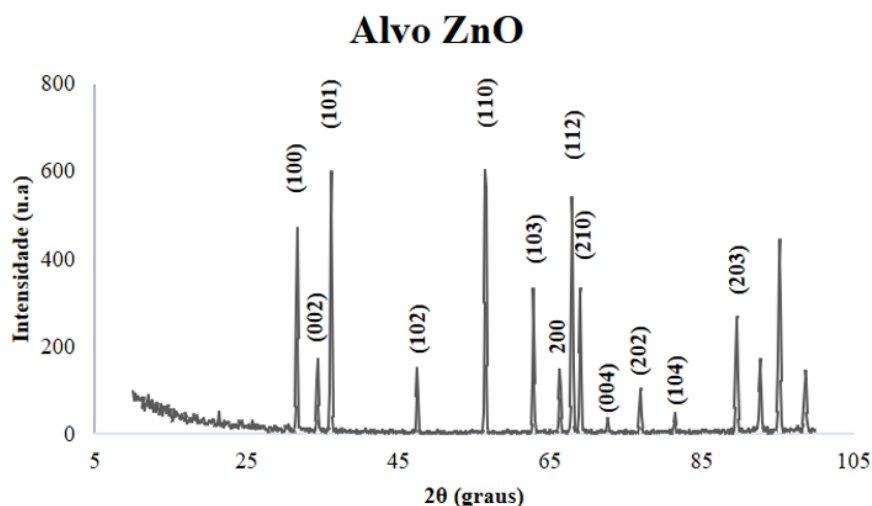


Figura 3.7: Difractograma do alvo de ZnO

material. No entanto, é visível que as intensidades relativas dos picos não são as observadas para o alvo, ocorrendo uma orientação preferencial segundo o plano (0 0 2). As superfícies Zn1, Zn2 e Zn3 apresentam picos bem definidos onde os pequenos valores de largura a meia altura (FWHM), são indicadores de tamanho de cristalite micrométrica. Por outro lado o filme Zn4 apresenta picos mais largos com algumas bossas que correspondem a um material nano-cristalino.

Os planos correspondentes à estrutura cristalina do ZnO hexagonal são os planos (1 0 1), (0 0 2) e (1 0 0) [48]. O pico de difração (0 0 2), é comum a todas as superfícies e, tal como nos difractogramas do grupo I, sugere uma orientação preferencial dos filmes segundo este plano de difração. Este pico é indicador de uma orientação preferencial sobre o eixo-c perpendicular ao substrato. Esta organização surge como resultado da orientação preferencial pela minimização das tensões internas e da energia de superfície, o que causa a deposição segundo o plano de maior densidade atômica, o plano (0 0 2) [28] [59] [60] [61].

A ausência de picos característicos de carbono ou poliamida nas superfícies Zn5 e Zn7 era já esperada, pois estes materiais, após pulverização, não apresentam ordem estrutural, isto é, são amorfos.

No entanto, também no caso da superfície Zn6 não é visível nenhum pico de difração associado ao cobre. Este facto pode ser devido a um, ou à conjugação, de dois fatores: i) a quantidade de cobre presente no filme não corresponde a 5% do volume analisado, condição para ser detetado por XRD ou; ii) o cobre está sob a forma oxidada e é amorfo. No caso da superfície Zn7 a drástica diminuição das intensidades dos picos de difração associada à ausência da orientação preferencial segundo o plano (0 0 2) indica que a incorporação de poliamida durante a deposição do ZnO é responsável por uma total desorganização da estrutura do filme cerâmico, sendo que

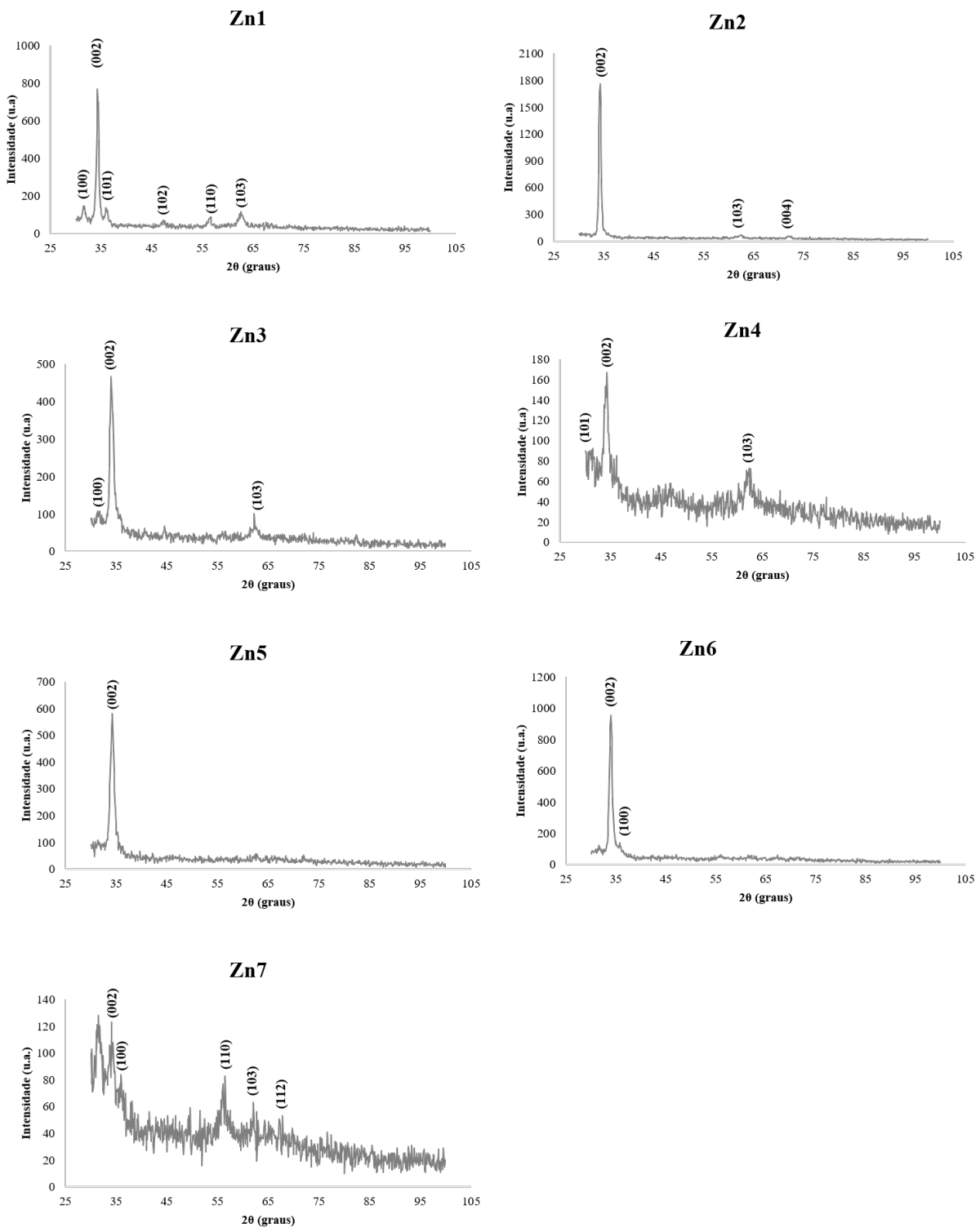


Figura 3.8: Difractogramas dos filmes finos dos grupos I e II

o compósito resultante é amorfo.

A caracterização por difração de raios X, associada à visualização, nas imagens de fase de

AFM, das dimensões dos materiais co-depositados com o ZnO permitem afirmar que se tratam de filmes nanocompósitos.

3.3 Análise Química

A caracterização FTIR para o alvo foi feita para números de onda compreendidos entre os 500 e 4000 cm^{-1} , onde o espectro apresentado na figura 3.10 representa o intervalo de 1400 a 3600 cm^{-1} . O pico referente à vibração de Zn-O, está presente de acordo com a literatura para valores entre os 410 e 510 cm^{-1} , no entanto, a caracterização FTIR efetuada neste trabalho inicia-se aos 500 cm^{-1} e não detetou este pico, sendo provável que se encontre em valores inferiores à gama estudada. Os restantes picos identificados para o alvo e restantes superfícies estão resumidos na tabela 3.3.

Na superfície Zn4 podemos observar o pico correspondente ao alongamento da ligação Zn-O, aos 510 cm^{-1} .

A análise do filme Zn5, com carbono, confirma a presença das ligações Zn-O tanto no modo alongamento como de deformação angular, e permite identificar as ligações C=C e C=O. Para além da ligação O-H, é também detetável a ligação Si-O, que diz respeito à ligação entre o filme fino e o substrato de silício.

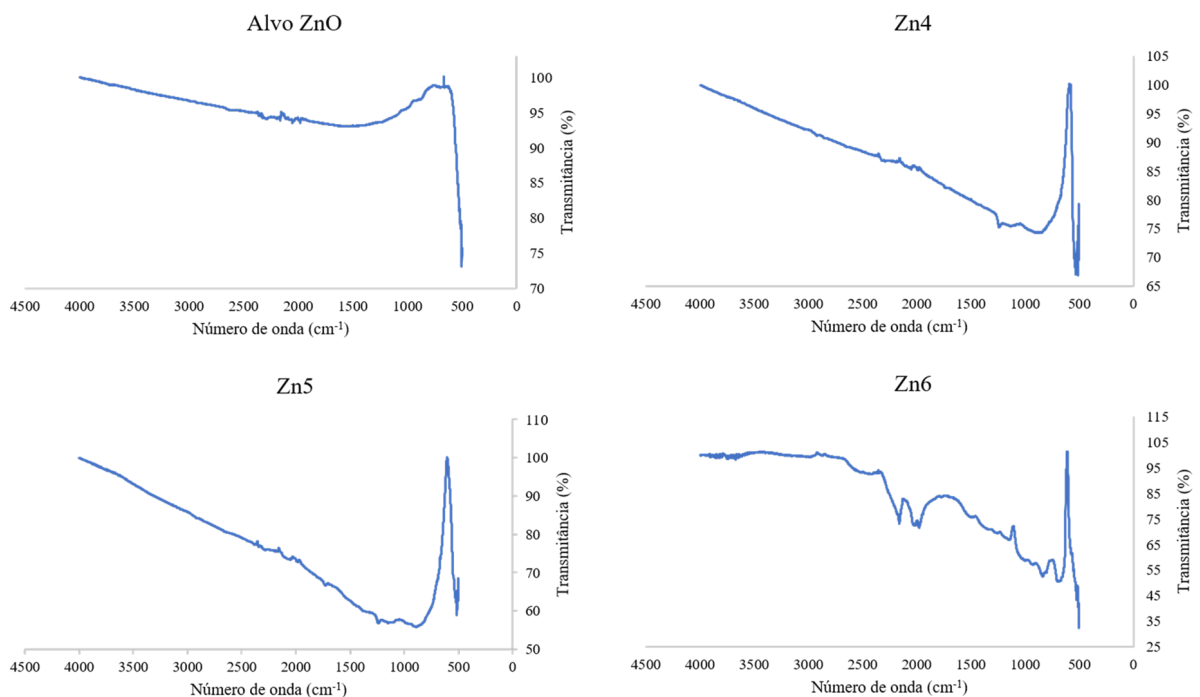


Figura 3.9: Espectros FTIR do alvo de ZnO e dos filmes finos Zn4, Zn5 e Zn6.

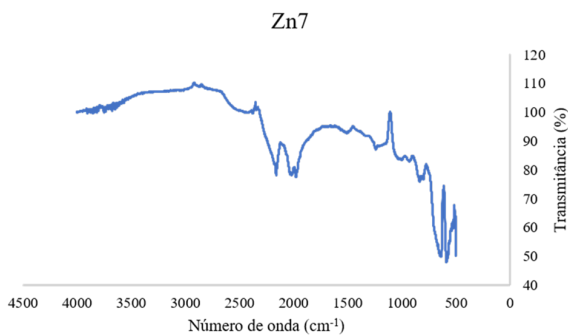


Figura 3.10: Espectro FTIR do filme fino Zn7.

Tabela 3.3: Identificação dos picos FTIR às ligações correspondentes

Superfícies	Números de onda (cm-1)	Ligações descritas na literatura
Zn1, Zn4, Zn5, Zn6, Zn7	510	Vibrações alongamento Zn-O [50] [62] [63] [45]
Zn6	620	Vibração da ligação Cu-O [62]
Zn5, Zn7	965	Alongamento das ligações N-H, C-H, C=C, C-C-C e C-H [1]
Zn5, Zn6	1140 e 1653	Vibrações de deformação angular Zn-O [64]
Zn5	1632 e 3450	Alongamento e deformação angular do grupo -OH [65]

No filme Zn6 é possível identificar aos 620 cm^{-1} a ligação Cu-O e as ligações Zn-O e Si-O. Este facto vem confirmar que, pelo menos alguma percentagem, de cobre se encontra sob a forma de óxido.

Por último, a co-pulverização com o alvo polimérico, Zn7, dá origem a várias ligações características da poliamida tais como as ligações N-H, C-H, C=C, C-C-C e C-H.

A análise XPS permite saber a composição química dos revestimentos até 10 nm de profundidade. A tabela 3.4 apresenta os valores da composição química em relação à amostra total dos elementos presentes nos filmes.

Tabela 3.4: Composição química (%) dos elementos presentes nos filmes através de XPS

	Zn1	Zn2	Zn3	Zn4	Zn5	Zn6	Zn7
C	–	–	–	–	48,7	–	10,0
N	–	–	–	–	–	–	0,3
O	57,2	71,7	54,3	53,2	32,6	64,7	55,0
Cu	–	–	–	–	–	7,8	–
Zn	42,8	28,3	45,7	46,8	18,7	27,5	34,7

Os filmes do Grupo I, à exceção do Zn2, apresentam valores relativamente semelhantes para todos os filmes, $\approx 45\%$ de óxido de zinco e $\approx 55\%$ de oxigénio.

As superfícies do grupo II, para além de zinco e oxigénio resultantes do alvo de ZnO, têm presentes na sua superfície os elementos dopantes. A superfície Zn5 é a que apresenta maior incorporação de material co-depositado, carbono, com quase 50% da sua composição, o que vem reforçar a maior densidade deste material observada nas imagens de fase em AFM.

A desconvolução dos espectros de alta resolução foi feita para os elementos presentes em cada filme, o que permitiu identificar os tipos de ligações presentes.

A desconvolução do filme Zn4, na figura 3.11, permitiu, como esperado, identificar a ligação Zn-O.

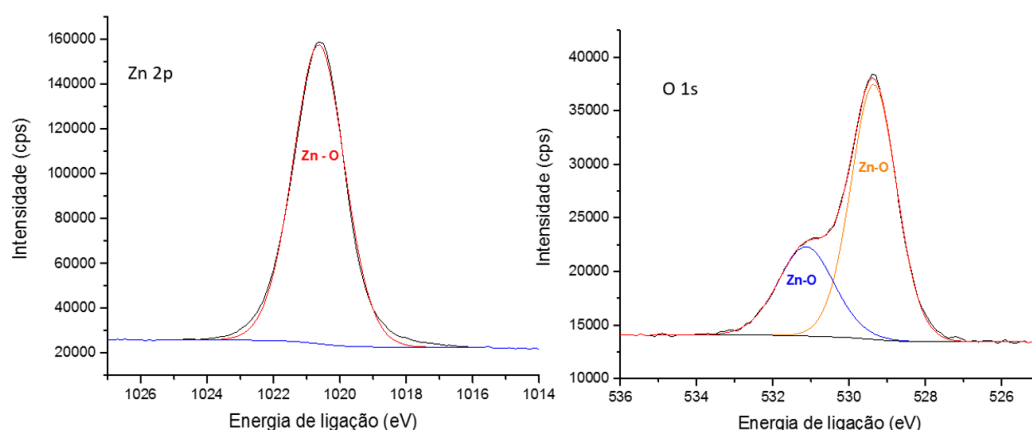


Figura 3.11: Desconvolução dos espectros XPS da superfície Zn4

O filme Zn5, cuja desconvolução está apresentada na figura 3.12, revela que o oxigénio, para além de se encontrar ligado ao Zn, tem alguma percentagem em ligações com o carbono. Por seu lado o espectro de carbono evidencia que, excluindo a ligação ao oxigénio, este elemento está presente sob a forma de carbono do tipo diamante (ligações com hibridização sp^3).

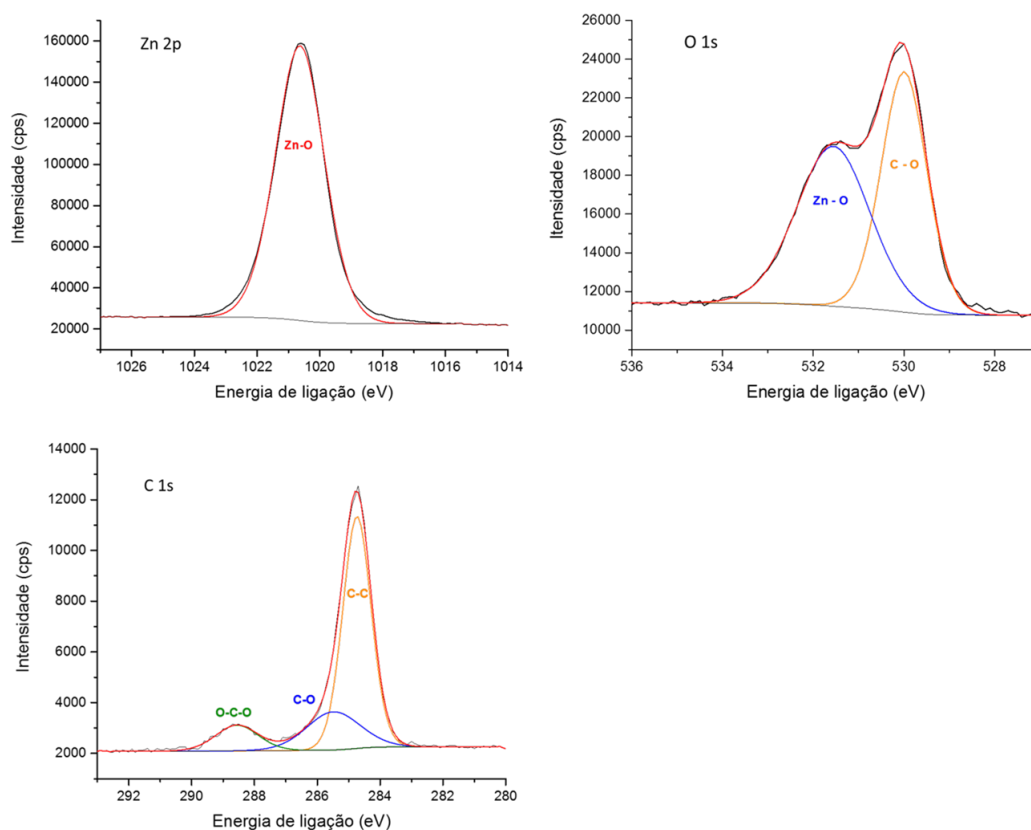


Figura 3.12: Desconvolução dos espectros XPS da superfície Zn5 para as orbitais Zn2p, O1s, C1s

As desconvoluções dos filmes Zn6 e Zn7 estão presentes na figura 3.13, e permitiram identificar as ligações oxidadas Zn-O, Cu-O e Cu-Cu, para o filme Zn6 e Zn-O, C=O, C-C, C-N, N-C=O e N-H para o filme Zn7. A técnica de XPS, vem assim confirmar o observado por FTIR e esclarecer o facto de não se encontrarem picos de difração relativamente ao cobre para o filme fino Zn6. Com efeito, não só a sua quantidade é relativamente reduzida, como parte do metal se encontra na forma oxidada (geralmente com estrutura amorfa), sendo que a percentagem que corresponde ao material na forma metálica fica abaixo do limite de deteção da técnica.

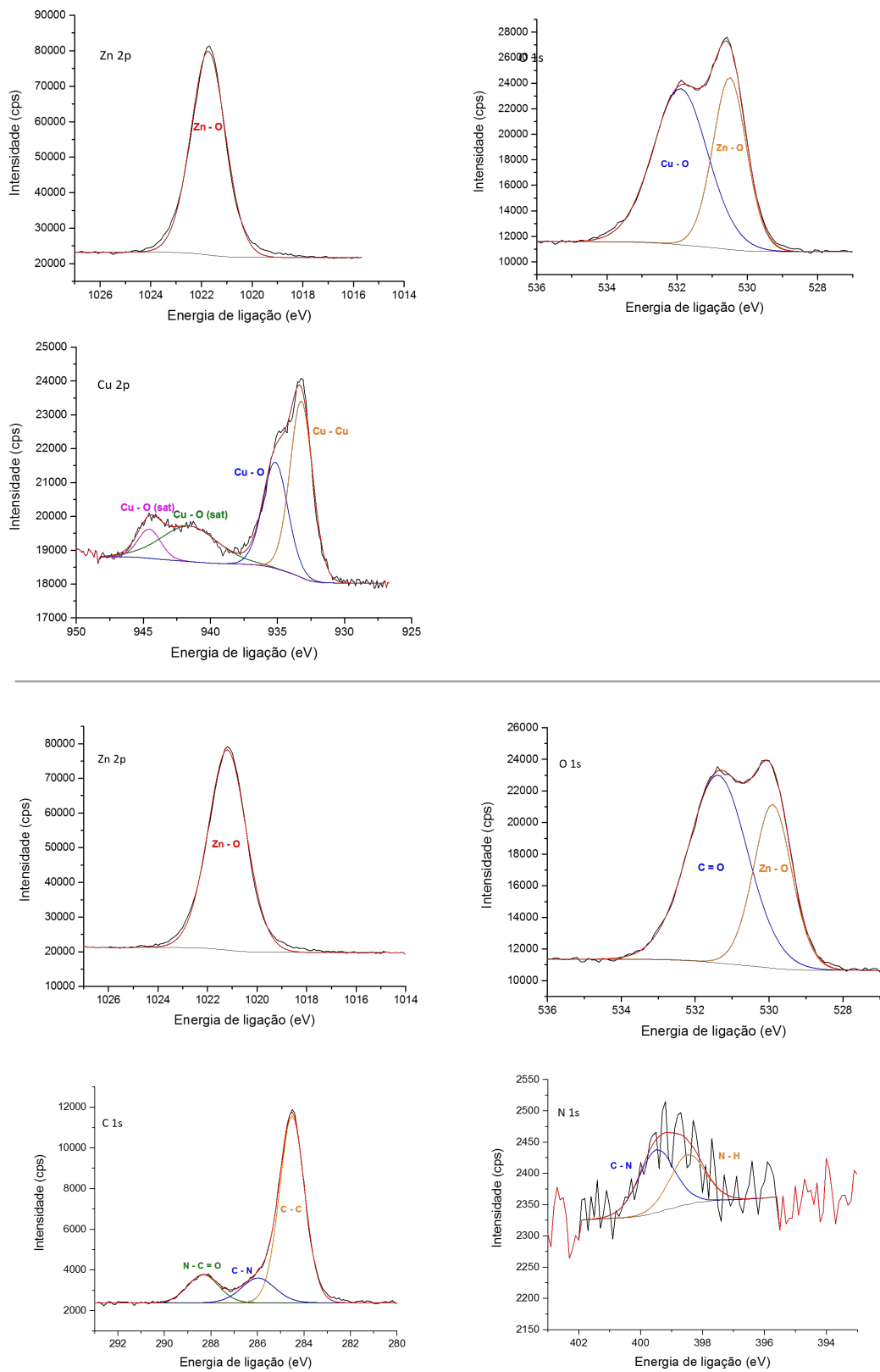


Figura 3.13: Desconvolução dos espectros XPS da superfície Zn6 (superiores) e Zn7 (inferiores)

3.4 Espectroscopia do Visível/UV

A análise de absorvência UV-Vis permite avaliar a capacidade das superfícies desenvolvidas produzirem ROS com efeitos antibacterianos, tal como descrito anteriormente, nos filmes depositados sobre as laminas de vidro. Os espectros de absorção UV-Vis dos filmes do grupo II estão representados na figura 3.14 para a gama de comprimentos de onda compreendida entre os 290 nm e 800 nm.

Um pico de absorção UV nos 360 nm é atribuído à transição HOMO-LUMO, *Highest Occupied Molecular Orbital-Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, que ocorre pela transição do elétron do ZnO da banda de valência para a banda de condução [66].

Os efeitos da dopagem com Cu aumentaram poder de absorção da radiação do filme em todo o espectro, promovendo uma absorvência na zona do visível, que era quase inexistente nessa gama de comprimentos de onda. Este facto leva à ativação do compósito para uma maior gama de comprimentos de onda, o que poderá ser benéfico para a atividade antibacteriana. A co-deposição com cobre permite identificar uma curva ligeira adicional no espectro a variar entre 400 e 500 nm, que corresponde à transferência de cargas interfaciais dos eletrões excitados da banda de valência do ZnO para os iões de Cu^{2+} [11].

Pelo contrário, o carbono e a poliamida diminuíram a capacidade de absorção dos filmes simples de ZnO na gama dos 290 aos 400 nm mas aumentaram a absorção de energia para radiações na zona do visível. A aresta característica do ZnO aos 360 nm também foi desviada para menores comprimentos de onda nos filmes compósitos de carbono e poliamida. O pico característico do ZnO aos 360 nm também foi desviado para menores valores de comprimentos de onda nos filmes compósitos de cobre e poliamida. Deve ainda ser realçado que também o filme com poliamida apresenta um ligeiro aumento de absorvência para comprimentos de onda entre os 380 a 450 nm.

O vale observado aos 660 nm é devido a uma falha no equipamento.

Espectro de Absorção UV-Vis

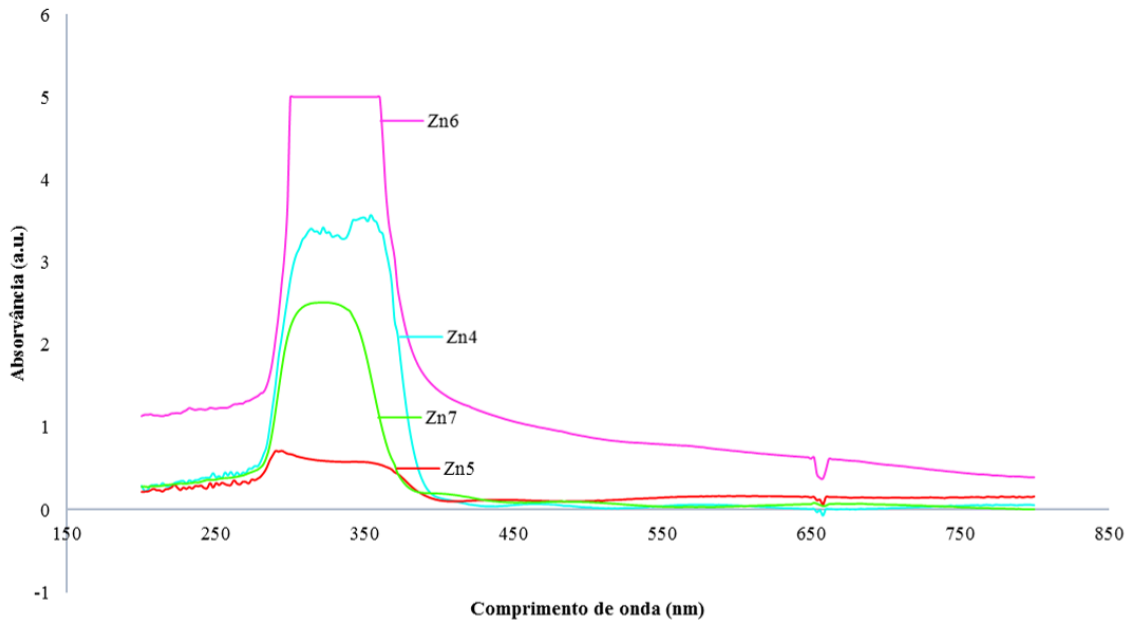


Figura 3.14: Espectro de absorvência VIS-UV para os filmes do grupo II

3.5 Molhabilidade

A diminuição da energia livre de superfície causa, frequentemente, um aumento no valor do ângulo de contacto [53].

Recentemente foi demonstrado que a adesão bacteriana é inequivocamente mediada pela diferença de energia superficial livre entre as células bacterianas e o substrato sólido [67]. Quanto menor esta diferença, maior o grau de adesão bacteriana. No presente trabalho não foram medidas as energias de superfície das estirpes bacterianas utilizadas. Assim a análise vai ser efetuada considerando apenas a hidrofobicidade e hidrofobicidade das superfícies desenvolvidas.

Na tabela 3.5 estão apresentados os valores médios e o desvio padrão do ângulo de contacto estático entre as superfícies depositadas e a água. O grupo I, cujas deposições foram feitas com o alvo simples de ZnO, apresentam valores semelhantes, o que indica que os diferentes parâmetros de deposição pouco alteram a natureza hidrofóbica/hidrofílica dos revestimentos.

Os filmes Zn5 e Zn7, dopados de carbono e poliamida, respetivamente, apresentam ângulos de contacto superiores, quando comparados aos filmes do grupo I, o que indica que estas superfícies apresentam características marcadamente hidrófobas. A dopagem com cobre, pelo contrário, diminuiu o ângulo de contacto para os 45°, o que pode ser devido à presença de mais material cerâmico (Cu-O) que contribui para o aumento da energia de superfície.

Tabela 3.5: Ângulos de contacto das superfícies em estudo

Zn1	Zn2	Zn3	Zn4	Zn5	Zn6	Zn7
61,8±0,2	69,1±0,7	63,8±1,3	61,2±1,4	96,1±2,2	45,4±1,2	97,8±2,9

No entanto, é importante relembrar que a rugosidade afeta a medição do ângulo de contacto e sabendo que as superfícies Zn1, Zn2 e Zn3 apresentavam uma topografia mais acentuada que as restantes não podemos fazer uma análise comparativa destas superfícies com as restantes. No entanto fazendo a comparação entre os restantes filmes, podemos afirmar, que, com base apenas nos valores dos ângulos de contacto estáticos, e sem considerar a química da superfície, o comportamento antibacteriano terá maior eficiência sobre a superfície Zn7 e seguido da seguinte ordem: Zn5 > Zn4 > Zn6.

3.6 Potencial Eletrocinético

A carga superficial dos filmes finos foi avaliada através da determinação do potencial zeta. A tabela 3.6 apresenta os valores médios avaliados com uma solução de KCl, 1mM e pH de 7,0. Como referido anteriormente, o potencial zeta depende da concentração de cargas que se acumulam na superfície quando em contacto com o eletrólito.

As paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem grupos funcionais acídicos e básicos associados a lipossacarídeos, fosfolípidos (no caso das Gram-negativas) ou peptidoglicano.

É a presença ou ausência destes grupos funcionais que define o comportamento eletrostático das bactérias em relação a superfícies abióticas e que permite a regulação da adesão bacteriana e interação com outros agentes. A maioria das bactérias apresenta uma carga superficial negativa que é equilibrada com contra-íões presentes no meio envolvente [55]. De forma a evitar a adesão as superfícies com potenciais zeta negativos terão teoricamente maior capacidade anti-aderente, pois as cargas irão repelir-se mutuamente.

É possível observar que a superfície Zn6 é a única com potencial zeta positivo, sendo as restantes teoricamente mais apropriadas para o uso de revestimentos que inibam a adesão bacteriana. O ângulo de contacto da Zn6 indicava-a como a superfície mais hidrófila e esta é também a única superfície com potencial positivo. Esta diferença tão grande de potencial sugere que o tipo de ligações e estrutura química desta superfície é completamente distinta das presentes nos restantes revestimentos.

Tabela 3.6: Potencial zeta dos filmes finos do Grupo II

Superfícies	Zn4	Zn5	Zn6	Zn7
Valor médio (mV)	-27,9 ± 3,0	-39,5 ± 2,2	+20,4 ± 4,9	-21,5 ± 4,5

Desta forma, com base no potencial eletrocinético prevê-se que a superfície Zn5 será a que terá melhores capacidades antibacterianas, seguida da Zn4, Zn7 e por fim a Zn6.

Com base apenas nestas duas últimas caracterizações é possível evidenciar que a previsão da atividade antibacteriana é bastante mais complexa do que escolher uma superfície hidrófila, ou uma superfície com potencial zeta negativo, pois por vezes, tal como no caso do filme fino Zn6, a mesma superfície associa propriedades/características que são contraditórias face ao descrito na literatura para a concepção de uma superfície ótima para um efetivo desempenho antibacteriano.

3.7 Testes Bacterianos

3.7.1 Avaliação da resistência/susceptibilidade bacteriana a Zn^{2+}

Os resultados do ensaio de determinação das CMI's para as 18 bactérias permitiu avaliar o comportamento das mesmas quando expostas ao ião Zn^{2+} , por forma a selecionar as duas estirpes para a realização de teste com as diferentes superfícies desenvolvidas neste estudo.

O crescimento em meio R2A suplementado com as diferentes concentrações de zinco foi avaliado ao fim de 5 dias de incubação e os resultados apresentados como resistente/susceptível na tabela 3.7.

Tabela 3.7: Resultados MIC após 5 dias de incubação onde (+) representa crescimento bacteriano (-) representa inibição do crescimento bacteriano

	R2A	1mmolar	2mmolar	3mmolar	5mmolar	7mmolar	10mmolar
<i>A37T2</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>B29T1</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>M47T1</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>M24T3</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>A2-61</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>P.Aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>S.Aureus</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>S.Pyogenes</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>E.Coli</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>E.Coli40</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>O.Tritici</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>5bvl1</i>	+	+	+	+	-	-	-
<i>S.Saprophylicus</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>K.Pneumoniae</i>	+	+	-	-	-	-	-
<i>Shifella Flexneri</i>	+	-	-	-	-	-	-
<i>B-Subtilis</i>	+	-	-	-	-	-	-
3A	+	-	-	-	-	-	-
<i>P.Fluorescencens</i>	+	+	+	+	-	-	-

P. aeruginosa, apresentou elevada resistência ao íon Zn^{2+} , 10 mmolar de $ZnSO_4$, ao fim de 5 dias e a *S. aureus* pelo contrário apresentou morte/inibição de crescimento aos 1 mmolar de $ZnSO_4$ ao fim do mesmo período de tempo. As distintas características morfológicas (cocos/bastonete ; Gram+/Gram-), diferentes graus de sensibilidade ao íon Zn^{2+} e as rápidas taxas de crescimento contribuíram para a seleção destas duas bactérias para os ensaios seguintes.

As estirpes da espécie *S. aureus* são consideradas agentes importantes nas transmissões nosocomiais. São bactérias esféricas (cocos), pertencentes ao grupo de bactérias Gram-positivo. Estão naturalmente presentes na pele e fossas nasais de pessoas saudáveis; no entanto, pode estar associada a infecções graves. Indivíduos com baixa imunidade estão mais susceptíveis à contaminação. Os mecanismos de virulência da *S. aureus* incluem toxinas, enzimas e moduladores imunológicos [68].

As estirpes da *P. aeruginosa* estão presentes em 11 % de todas as infecções nosocomiais, possuem uma morfologia de bastonete, não-fermentativas, Gram-negativas e, infetam principalmente indivíduos com sistemas imunitários debilitados. Colonizam rins, tratos urinários e vias respiratórias, causando infecções cirúrgicas e infecções de feridas, pneumonias e infecções do trato urinário [2].

3.7.2 Testes celulares

Os testes in vitro estão divididos em duas categorias; em Meio Líquido e Meio Sólido.

a) Ensaios em Meio Líquido

Após o período de 38 horas de contacto das superfícies revestidas com as estirpes *P. aeruginosa* e *S. aureus* os filmes finos foram depois observados por SEM para um estudo comparativo das diferentes superfícies em cada uma das condições de incubação.

A figura 3.15 apresenta as micrografias SEM das superfícies expostas a *P. aeruginosa*.

Da análise da figura 3.16 a), a uma menor escala, é visível a perda da forma de bastonete característico da *P. aeruginosa* para uma estrutura desidratada com perda do conteúdo intracelular. Este facto é atribuído à interação dos íões libertados/gerados pelas superfícies com a membrana das células, que alteram a sua permeabilidade e promovem a sua desintegração. Estas interações têm a capacidade de perturbar as membranas, o que se traduz na perda da função seletiva que alteram os processos de produção de ATP e de replicação de DNA. Este processo é dependente, da química e da topografia das superfícies. A formação de ROS, leva à oxidação das estruturas celulares e tem também influência neste processo. A representação esquemática

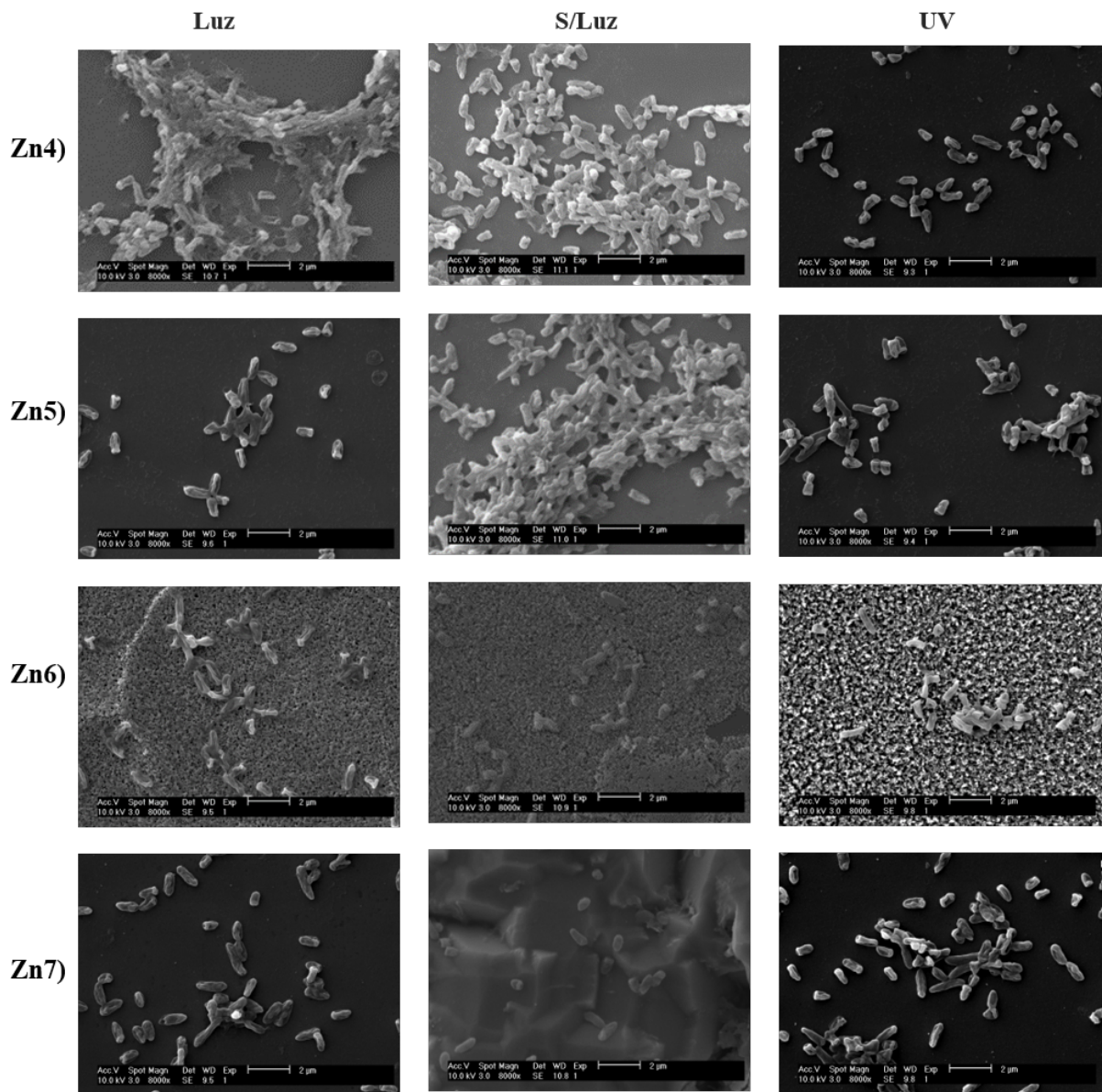


Figura 3.15: Micrografias SEM dos filmes em contacto com inoculados de *P. aeruginosa* incubados sobre diferentes condições de iluminação, em meio líquido.

destes mecanismos sobre as células está na figura 3.16 b) [21] [1].

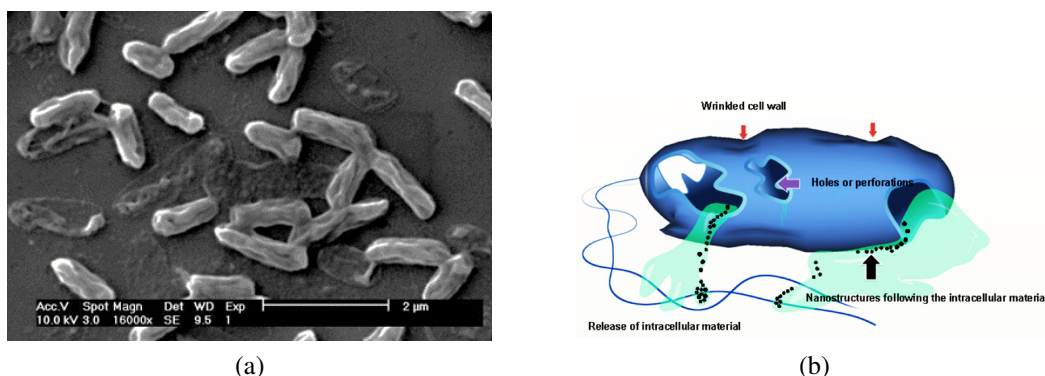


Figura 3.16: a) *P. aeruginosa* colapsada após exposição ao filme fino Zn4 sobre luz e b) Representação Esquemática apresentando rotura da parede celular e perda de conteúdo [21].

No grupo de superfícies que foram expostas à luz visível durante a incubação, podemos observar que todas as superfícies resultantes de co-deposição apresentam maior capacidade antimicrobiana do que a superfície só de ZnO (Zn4) onde, inclusivamente, é visível a formação de biofilme. As bactérias que estiveram em contacto com as superfícies nanocompósitas apresentam a estrutura alterada, possivelmente causada por stress oxidativo ou outro tipo de *stress* (por exemplo, interação com enzimas do processo de divisão celular). Estes resultados demonstram que os três materiais selecionados para a co-deposição incrementam a atividade antibacteriana do ZnO quando a incubação ocorre na presença de luz. O filme Zn5 é resultado da incorporação de carbono, e a junção dos dois materiais com características antibacterianas (ZnO e C) aumentou as capacidades antibacterianas dos filmes finos. O cobre é outro elemento com características antibacterianas já descritas na literatura [21], e a sua incorporação no ZnO fez com que o filme apresentasse o efeito cumulativo dos dois materiais, levando ao favorecimento do efeito bactericida. No entanto, dado o valor de potencial zeta desta superfície seria expectável uma fácil adesão das células procaríotas. A química desta superfície ao potenciar o efeito inibitório do Zn^{2+} com os iões Cu^{2+} , prevalece sobre o efeito da carga superficial. Pelo contrário, nunca foi atribuído capacidade antibacteriana à poliamida, no entanto, já foi reportado na literatura que a estrutura amorfa dos polímeros permite aumentar a cinética de libertação dos iões Zn^{2+} da matriz [36], sendo, provavelmente, este o processo dominante no filme Zn7 onde uma maior constante de ionização aumenta a capacidade antibacteriana quando comparado ao filme Zn4.

Quando a incubação ocorreu no escuro foi observada uma elevada taxa de crescimento bacteriano sobre os filmes Zn4 e Zn5. Este resultado era já esperado, uma vez que, na ausência de radiação, o mecanismo de produção de ROS tem menor eficiência. E revela que a capacidade antibacteriana observada quando a incubação ocorre à luz, é essencialmente devida à formação de ROS e em menor percentagem à libertação de espécies iónicas, no caso específico destas su-

perfícies. Com efeito, a formação dos iões deve ocorrer tanto com iluminação como na ausência de luz e, neste último caso, o filme Zn5 que tinha apresentado características antimicrobianas, aparentemente, apesar de libertar a mesma quantidade de iões é incapaz de reproduzir as anteriores características na ausência de radiação, logo a ausência de ROS produzidos pelo efeito de fotoativação aparenta ser o mecanismo predominante nestes filmes e a sua ausência leva, nos filmes Zn4 e Zn5, à formação de biofilme.

No entanto, os nanocompósitos com cobre e poliamida mantêm as capacidades antibacterianas demonstradas quando a incubação ocorre com iluminação. Dado que a incubação ocorreu no escuro o mecanismo de formação ROS não é o processo dominante para explicar a conservação das características antibacterianas. No caso da presença de cobre a libertação de iões Cu^{2+} parece ser determinante e, devido à presença de dois tipos materiais distintos, cerâmico e metal, pode inferir-se que a libertação dos cupriões favorecerá, por uma reação semelhante à de uma célula galvânica, a libertação concomitante de iões Zn^{2+} .

Quanto à reação das células na superfície do nanocompósito com a poliamida os resultados são semelhantes aos observados após incubação com iluminação o que vem reforçar que a química da superfície é mandatória no fenómeno de inibição do crescimento celular. Tal como referido anteriormente, este facto pode ser consequência da libertação de Zn^{2+} devido à presença da poliamida que ocorrerá, qualquer que sejam as condições de irradiação a que o sistema esteja sujeito durante a incubação.

A incubação no escuro com pré exposição a radiação UV apresentou benefícios na ativação das propriedades antibacterianas dos filmes Zn4 e Zn5, onde no primeiro os resultados foram mais lesivos que os apresentados para uma incubação feita sobre luz e o segundo apresentou resultados semelhantes à incubação com iluminação.

O ZnO, como já referido, apresenta elevada eficiência fotocatalítica, e a sua condutividade altera quando exposto a radiação UV, sendo que esta característica altera significativamente a interação do ZnO com bactérias. A iluminação UV causa a ruptura das ligações oxigénio na superfície, gerando ROS (peróxido de hidrogénio e super-óxidos) que provocam *stress* oxidativo nas membranas e estruturas celulares. Outro processo promovido pela radiação UV é a transferência dos eletrões das bandas de valência para as bandas de condução. Esta transferência resulta em lacunas nas camadas de valência que são essenciais para a criação dos radicais hidroxilo que irão também atuar como agentes oxidantes [1].

O filme Zn6, pelo contrário, apresentou resultados semelhantes para todas as condições de incubação. Este resultado não foi uma surpresa, pois a caracterização química, por FTIR e XPS, permitiu identificar a ligação Cu-O, indicando que o filme com cobre tem alguma percentagem do metal na forma de óxido. Segundo *Akhavan* as junções Cu-CuO que se formam são propícias à morte bacteriana, onde o CuO gera pares eletrão-lacuna por foto-absorção e o Cu absorve os eletrões foto-excitados, separando os pares e levando a uma maior eficiência no processo de

foto-inativação de bactérias [16]. Por outro lado, mesmo quando a incubação ocorre no escuro os resultados são semelhantes. Com efeito, a presença de óxidos metálicos (ZnO e CuO) que possuem uma percentagem de ligações iónicas, leva a que a libertação de iões Zn^{+2} e Cu^{+2} ocorra devido à presença de meio com elevada força iónica. Outro aspeto a considerar é o descrito por *Zhang* e colaboradores que observaram a formação de forças eletrostáticas entre *E. coli* e ZnO [69]. *Stoimenov* propôs também a interação eletrostática entre NPs e a superfície celular das bactérias como causa da inibição do crescimento celular, sendo que a carga bacteriana total é negativa, devido à formação excessiva de grupos carboxilo. Os mesmos defendem que as NPs de ZnO quando em suspensão têm carga positiva e tendo as bactérias cargas negativas, havia um complemento das forças eletrostáticas devido às cargas contrárias levando a uma forte ligação entre a superfície bacteriana e as NPs promovendo a lesão membranar [70]. A nossa caracterização de potencial eletrocinético indicou a superfície Zn6 (Cobre) como a única com carga positiva, o que indica que poderá ocorrer um mecanismo semelhante ao descrito por *Stoimenov* [1]. Esta teoria é também corroborada pelo presente trabalho, uma vez que o elevado poder tóxico desregula a homeostasia, por exemplo através da peroxidação lipídica, que obriga as bactérias a libertar o conteúdo intracelular. Com efeito, este mecanismo deve ser o que impera nas interações entre as bactérias e a superfície do filme Zn6, já que, independentemente das condições de exposição, o comportamento das bactérias é idêntico e a superfície do filme, após incubação, evidencia grandes alterações morfológicas que podem resultar da libertação do conteúdo intracelular.

O filme Zn7 não mostrou qualquer alteração no seu comportamento após a exposição a UV, sendo o seu efeito antibacteriano independente das condições de ausência ou presença de radiação durante a incubação. Este facto corrobora a teoria da incrementação de libertação de iões zinco devido à presença de polímero.

Deve ser referido, pois não é visível nas micrografias até agora apresentadas, que o filme Zn6 apresenta fissuração superficial. Este facto pode ser explicado pela menor adesão do filme ao substrato que acabou por fraturar devido à exposição à radiação UV, como pode ser observado na figura 3.17. O filme Zn6 é o que possui maior espessura, estando por isso sujeito a mais tensões intrínsecas que promovem o seu descolamento. Uma possível solução para evitar este fenómeno seria um menor tempo de deposição para este filme.

Ao contrário do que aconteceu com a *P. aeruginosa* as bactérias mantiveram a sua conformação esférica original e apresentam maior capacidade de colonização sobre as superfícies. O filme Zn4 apresenta à semelhança do observado com *P. aeruginosa*, uma superfície morfologicamente diferente, mas cujo grau de alteração agora depende das condições de exposição, tal como se evidencia na figura 3.18.

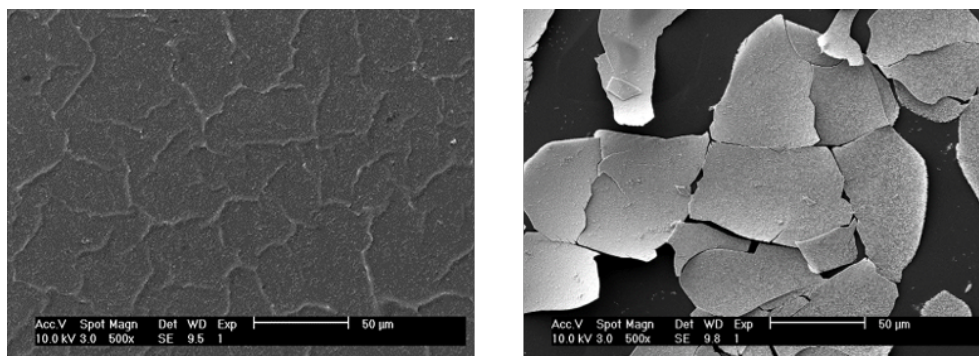


Figura 3.17: Superfícies danificadas de ZnO dopado com Cobre (Zn6) com; a) incubação sobre luz e b) com tratamento prévio UV

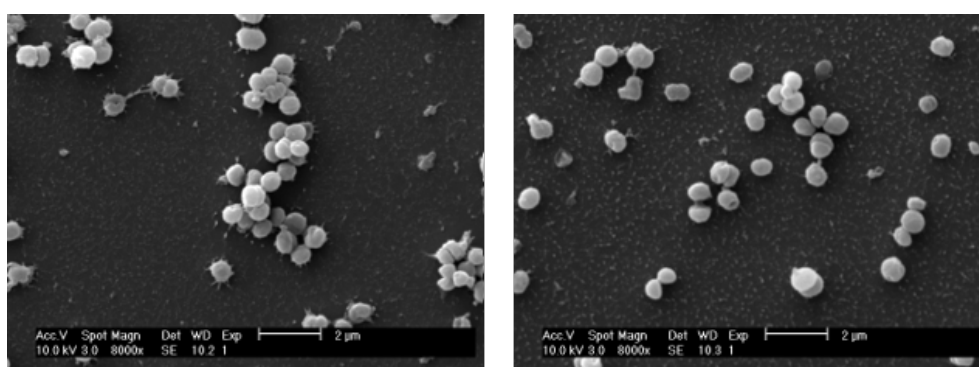


Figura 3.18: Superfícies Zn4 com incubação por luz e UV das bactérias *S. aureus*

A figura 3.19 apresenta as micrografias SEM para as superfícies expostas a *S. aureus*.

O grupo de superfícies exposto à luz apresenta a Zn6 como a mais lesiva sobre as bactérias, com uma pequena alteração no filme semelhante à verificada para a *P. aeruginosa*. Os filmes Zn4 e Zn5 apresentam efeitos semelhantes, com bactérias isoladas bem aderidas na superfície do filme. O revestimento com dopagem de poliamida apresentou resultados negativos, com a formação de agregados de bactérias numa fase inicial de formação de biofilme. Este resultado não deixa de ser surpreendente pois *S. aureus* apresentou, nos testes preliminares, uma elevada suscetibilidade ao ião zinco.

Os resultados com a *P. aeruginosa* mostraram que, em princípio, a libertação de iões metálicos é incrementado pela presença da poliamida. Com efeito, se este fosse o único mecanismo responsável pelo efeito antibacteriano o mesmo deveria ser observado na incubação com *S. aureus*, ao contrário do que efetivamente ocorreu. Face a estas observações tem que ser considerado que o fator forma da célula procariota (esférica) poderá ter também um papel importante na obtenção do efeito antibacteriano, pois terá uma área de superfície de contacto menor.

Os resultados da incubação no escuro revelaram a formação de biofilme sobre as superfícies Zn4, Zn5 e Zn7, sendo que nesta última o comportamento é semelhante ao da incubação com luz. Já as superfícies Zn4 e Zn5 apresentam uma perda do poder inibitório da adesão celu-

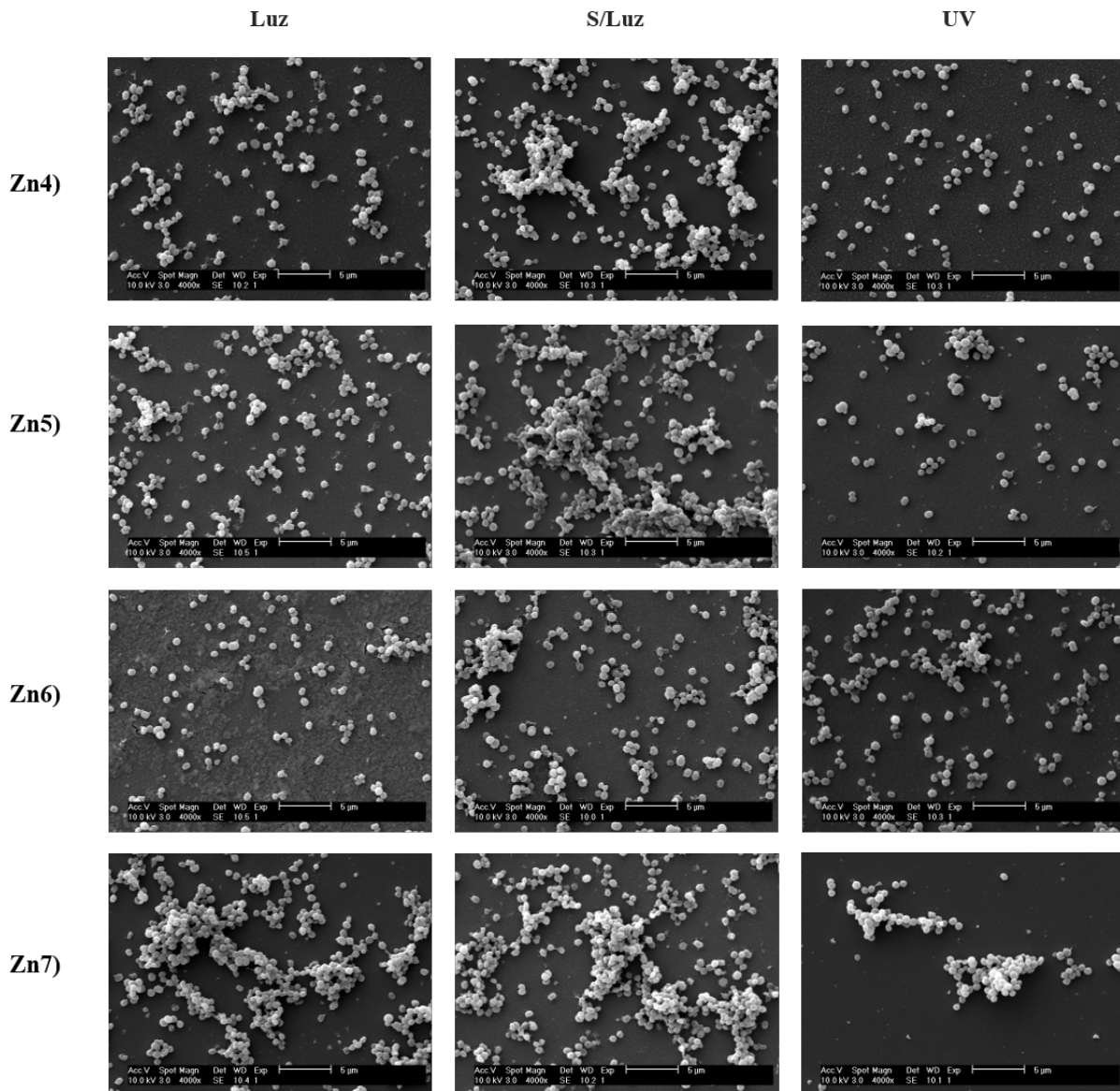


Figura 3.19: Imagens SEM dos filmes em contacto com inoculados de *S. aureus* incubada sobre diferentes condições em meio líquido

lar devido à incubação no escuro. O filme Zn6 foi, mais uma vez, o que apresentou menor colonização, sem estabelecimento de grandes aglomerados bacterianos, provando novamente os benefícios da presença de cobre.

O tratamento UV teve um impacto positivo em todos os filmes, sendo sobretudo evidente o aumento da capacidade antibacteriana das superfícies Zn4, Zn5 e Zn7.

A determinação do crescimento, na presença das superfícies modificadas, foi feita após 38 horas de incubação, estando os valores médios da DO apresentados na tabela 3.8. De lembrar que as DO das suspensões imediatamente antes de serem colocadas em contacto com as superfícies era de 0,2. A incubação das estirpes em meio R2A durante 38 horas leva à multiplicação celular. Como podemos observar houve um aumento das DO das suspensões em contacto com as superfícies. Dado que não ocupam o espaço todo no poço, as superfícies afetam, provavelmente, apenas as células em contacto com elas e os iões libertados são diluídos na cultura. A comparação entre as diferentes superfícies indica que estas não parecem afetar crescimento de *P. aeruginosa* e apenas a superfície Zn5 afetou a multiplicação de *S. aureus*.

Tabela 3.8: Densidades Óticas das suspensões, após 38 horas em contacto com as superfícies

	P. aeruginosa				S.aureus			
	Zn4	Zn5	Zn6	Zn7	Zn4	Zn5	Zn6	Zn7
Luz	1,01 ± 0,14	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,04	0,82 ± 0,03	0,81 ± 0,10	0,72 ± 0,09	0,95 ± 0,01	0,87 ± 0,03
S/Luz	0,82 ± 0,00	0,83 ± 0,02	0,81 ± 0,02	0,79 ± 0,01	0,75 ± 0,04	0,67 ± 0,02	0,74 ± 0,02	0,75 ± 0,3
UV	0,82 ± 0,01	0,84 ± 0,01	0,81 ± 0,03	0,82 ± 0,01	0,70 ± 0,00	0,66 ± 0,03	0,70 ± 0,24	0,75 ± 0,03

b) Ensaios em Meio Sólido

Para avaliar a capacidade de formação de halos de inibição do crescimento microbiano, devido à libertação iónica e de ROS, os filmes foram dispostos sobre meio sólido inoculado com *S. aureus* ou com *P. aeruginosa*, em diferentes condições de incubação. As placas de Petri foram analisadas ao fim de 16 e 38 horas de incubação, sendo os resultados apresentados para $t = 38$ horas.

Não foram observados halos de inibição nas superfícies em contacto com a *P. aeruginosa*, no período de incubação estudado, independentemente da superfície em estudo ou das condições de iluminação durante a incubação. Nos testes em meio sólido é necessário que a libertação de espécies com capacidade inibitória (iões e ROS) tenha que, não só ocorrer em concentrações suficientes, como também conseguir difundir através do meio sólido para que a inibição do crescimento das bactérias efetivamente ocorra e seja macroscopicamente visível. Por outro lado, convém lembrar que a *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, logo possui uma parede celular mais complexa e, portanto, mais resistente à entrada de iões do que as das Gram-positivas. Deste modo pode ser inferido que apesar de ocorrer a libertação de espécies ini-

bitórias, a sua difusão deve ser lenta e a concentração que chega à periferia do filme fino não é em concentração suficiente para causar inibição na *P. aeruginosa*, mas dado a maior sensibilidade da *S. aureus* a sua morte ocorreu para as concentrações libertadas.

Caso completamente distinto ocorreu com a estirpe *S. aureus* que apresentou sensibilidade a todas as superfícies desenvolvidas, com a formação de halos de inibição, tal como pode ser observado na, figura 3.20.

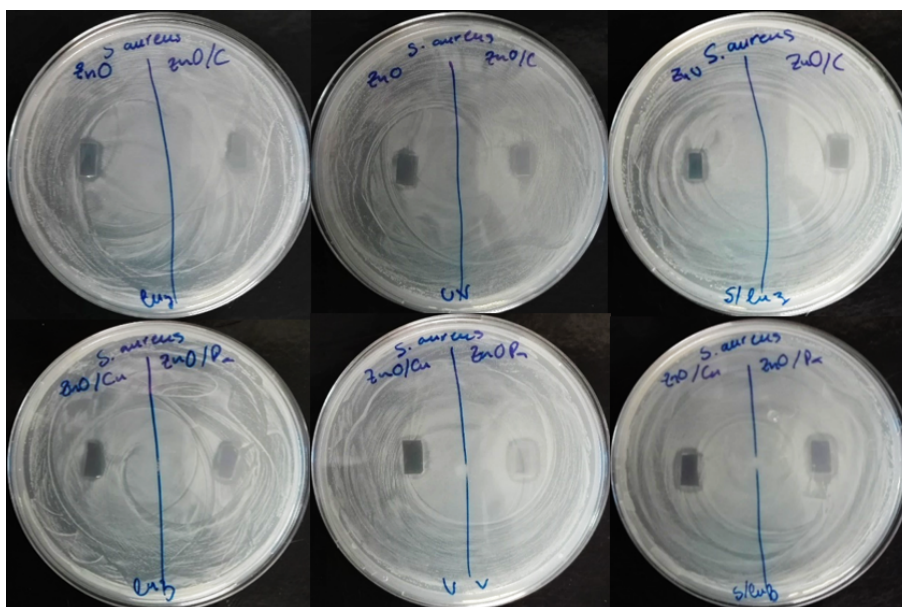


Figura 3.20: Halos de inibição criados em redor dos filmes finos sobre esfregaços de *S. aureus* após 38 horas de contacto.

A figura 3.21 mostra o pormenor do halo de inibição criado em redor do filme fino de ZnO em contacto com a *S. aureus* após 38 horas de incubação exposta à luz.



Figura 3.21: Halo de inibição criado em redor do filme Zn6 sobre esfregaços de *S.aureus* após 38 horas de contacto no escuro.

Os resultados para cada filme estão apresentados na tabela 3.9. Dado que as superfícies em estudo têm forma retangular optou-se por medir os valores dos halos tal como esquematizado na figura 3.18 e o valor apresentado sob a forma de intervalo entre os valores mínimos e máximo.

Tabela 3.9: Valores mínimos e máximos dos halos de inibição

Filme	Halos(mm)		
	Luz	UV	S/Luz
Zn4	1,2-2,3	0,9-2,3	1,2-2,3
Zn5	0,2-1,2	1,2-2,3	1,4-2,3
Zn6	1,2-1,4	0,2-2,3	1,7-2,6
Zn7	1,4-2,3	2,3-2,8	2,0-2,3

Os valores da tabela indicam que os halos de inibição formados são dependentes tanto da química superficial como das condições de iluminação durante a incubação. No entanto, é notório que, independentemente da superfície em estudo, os halos que resultam da incubação no escuro ou com pré-irradiação de luz UV apresentam valores iguais ou superiores aos observados quando a incubação é efetuada com iluminação constante. Este resultado, aparentemente contraditório com o até agora explicado, pode ter origem no facto de a exposição ser, nestes casos dos testes em meio sólido, efetuada pela irradiação do “fundo” da caixa de Petri, pois caso contrário a superfície dos filmes finos não seria iluminada. Assim, a luz inicialmente tem de atravessar o meio de cultura e só posteriormente atinge o filme. Por este motivo, não é possível determinar qual a quantidade de luz absorvida pelo meio, nem se ocorre absorção completa e seletiva de alguns comprimentos de onda, o que implicaria que o efeito de fotoativação possa não ocorrer.

Analisando as três condições de incubação para cada superfície é possível observar, considerando a maior dimensão de cada halo de inibição, que:

i) No caso da superfície Zn4 temos o mesmo valor de halo de inibição qualquer que seja a condição de incubação.

ii) A superfície Zn5 apresenta, claramente, maiores valores do halo de inibição quando incubada às escuras ou com pré-irradiação de UV, sendo estes valores superiores ao conseguido com iluminação. O percurso da luz fez com que esta passasse por vários materiais antes de atingir as superfícies revestidas, tendo este facto influenciado o comprimento de luz que atingiu os filmes e possivelmente interferindo nos resultados.

iii) Na superfície Zn6 a formação do halo de inibição é favorecida pela incubação no escuro, seguida pela condição de pré-irradiação e a inibição conseguida com iluminação é claramente inferior, que teve um efeito negativo sobre o efeito antibacteriano dos filmes.

iv) A superfície Zn7 apresenta maior poder de inibição do crescimento bacteriano quando pré-irradiada com luz UV, sendo que as duas outras condições de irradiação dão valores de halo de inibição semelhantes.

Os resultados indicam que, apesar do ZnO ser reportado na literatura como antibacteriano devido aos fenómenos decorrentes da fotoativação, a verdade é que, quando sob a forma de filme fino, o comportamento face às células procariotas é independente da presença de luz, o

que é uma vantagem dado que a capacidade de inibir o crescimento bacteriano ocorre, mesmo no escuro. Quando o filme de ZnO é co-depositado com outros materiais e ocorre a formação de nanocompósitos, o material adicionado contribui para o poder inibitório dos filmes, especialmente se a incubação ocorrer no escuro ou com pré-irradiação com UV. No caso da incubação com irradiação constante, os valores máximos dos halos de inibição ou são semelhantes (Zn7) ou são inferiores aos conseguidos pela superfície de ZnO.

O maior valor de halo de inibição foi medido na superfície Zn7 quando pré-irradiada com UV. Esta observação pode ser explicada pelo facto de a radiação UV ser responsável pela formação de radicais livres em cadeias poliméricas. Se estes radicais não formarem novas ligações vão incrementar substancialmente o número de espécies radicalares que podem ser libertadas por esta superfície, contribuindo para o maior poder inibitório deste nanocompósito quando testado nas condições descritas.

Conclusões

O trabalho apresentado teve como principal objetivo o estudo de filmes finos de ZnO, monolíticos e híbridos, depositados pelo processo de pulverização catódica.

Do trabalho realizado, as principais conclusões a retirar, no que respeita à deposição dos filmes finos, são:

- A técnica de pulverização catódica foi bem-sucedida na deposição de filmes finos monolíticos e híbridos, que apresentaram uma boa adesão aos substratos.
- Os filmes finos apresentaram uma estrutura cristalina de ZnO hexagonal dominante em todas as superfícies. O pico de difração (0 0 2), é comum a todas as superfícies e sugere uma orientação preferencial sobre o eixo-c perpendicular ao substrato. No entanto, a do filme com poliamida mostrou uma estrutura amorfa.
- A caracterização por AFM permitiu observar que a incorporação do material co-depositado com o ZnO dá-se preferencialmente na fronteira de grão. As imagens de fase permitiram concluir que os filmes híbridos são nanocompósitos.
- A carga superficial dos filmes finos depositados é negativa para todas as superfícies exceto quando o nanocompósito tem como reforço o cobre.
- A caracterização química, por FTIR e XPS, permitiu identificar a ligação Cu-O, indicando que o filme co-depositado com cobre encontra-se, pelo menos alguma percentagem, na forma de óxido.

As respostas das superfícies desenvolvidas foram avaliadas para determinar a sua resistência à colonização bacteriana. Para tal selecionou-se duas bactérias, a *P. aeruginosa* e a *S. aureus* que foram expostas a testes em meio líquido e sólido sob três condições de incubação; com luz visível; sem luz e com um pré-tratamento UV seguido de uma incubação no escuro. Os resultados evidenciaram que:

- Os filmes de cobre foram os que apresentaram melhor comportamento antibacteriano na incubação da *P. aeruginosa* para as três condições de irradiação. No entanto, o tratamento

UV também melhorou o comportamento dos filmes finos monolíticos e co-depositados com C, que exibiram efeitos semelhantes aos do cobre.

- A incubação com *S. aureus* apresentou a superfície híbrida de cobre como a mais ativa na morte bacteriana para uma indução sobre luz e no escuro. No entanto, o pré-tratamento UV potenciou as capacidades dos filmes monólitos e com reforço de C, sendo estes os que apresentaram melhores resultados nessas condições.
- Nenhuma superfície, em nenhuma condição de irradiação, foi capaz de promover a formação de halos de inibição com *P. aeruginosa*. Pelo contrário, todos os filmes finos, independentemente das condições de irradiação, foram capazes de formar halos de inibição quando em contacto com *S. aureus*.

Como propostas para trabalho futuro, nos filmes finos nanocompósitos, mais precisamente no caso do carbono e poliamida fazer variar as concentrações relativas destes elementos nos filmes finos de forma a avaliar como um aumento de concentração poderia promover melhores resultados.

Do ponto de vista estritamente microbiológico seria interessante avaliar a expressão diferenciada de genes na presença e na ausência das superfícies.

Um outro ponto a considerar seria caracterizar quais os tipos de polímeros, produzidos pelas bactérias como resposta à presença das superfícies, de forma a entender que tipo de alterações pretendem induzir no meio.

Bibliografia

- [1] A Sirelkhatim, S Mahmud, and Az Seenii. Review on Zinc Oxide Nanoparticles : Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Letters*, 7:219–242, 2015.
- [2] H. A. Khan, A. Ahmad, and R. Mehboob. Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7):509–514, 2015.
- [3] E G Berg. A New Spin On The Old Gram Stain. <http://cen.acs.org/articles/93/web/2015/04/New-Spin-Old-Gram-Stain.html>, 2015.
- [4] Niels Ho, Helle Krogh Johansen, Oana Ciofu, Claus Moser¹, and Zhi-jun Song. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(February):55–65, 2011.
- [5] J. Saldanha and D. Gomes. *Emprego de nanopartículas em estratégias de prevenção e tratamento de infeções relacionadas à formação de biofilmes bacterianos*. Trabalho de conclusão de curso, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2013.
- [6] J W Costerton, Philip S Stewart, and E P Greenberg. Bacterial Biofilms : A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(May):1318–1322, 1999.
- [7] Rodney M Donlan. Biofilms and Device-Associated Infections. *Special Issue*, 7(2):277–281, 2001.
- [8] J. G. Rocha. Instalações e Equipamentos de Saúde na Prevenção e Controlo das IACS concepção dos espaços e materiais de revestimento. http://www.apih.pt/congresso_2014/01_concepcao_espacos_materiais.pdf, 2014.
- [9] Laborial Laboratory solutions. BlauTouch. <http://www.laborial.com/blautouch.html>.
- [10] K. Chuang, H. Abdullah, S. Leu, K Cheng, and D. Kuo. Metal oxide composite thin films made by magnetron sputtering for bactericidal application. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, 337:151–164, 2017.
- [11] R Kumar, S Anandan, K Hembram, and Tata N Rao. Efficient ZnO-Based Visible-Light-Driven Photocatalyst for Antibacterial Applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6:13138–13148, 2014.
- [12] H A Ahammed, Mohammed, S Jayakumar, and K Vaideki. Use of zinc oxide nano particles for production of antimicrobial textiles. *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2(1):202–208, 2010.

- [13] Y Liu, J Padmanabhan, B Cheung, J Liu, Z Chen, S Altman, U D Schwarz, T Kyriakides, and J Schroers. Combinatorial development of antibacterial Zr-Cu-Al-Ag thin film metallic glasses. *Nature Publishing Group*, (February):1–8, 2016.
- [14] Thor A Soderberg, Bo Sunzel, Stig Holm, E Theodor, Goran Hallmans, and Staffan Sjoberg. Antibacterial Effect of Zinc Oxide In Vitro. pages 193–197, 1990.
- [15] D Wojcieszak, M Mazur, D Kaczmarek, B Szponar, M Grobelny, M Kalisz, A Pelczarska, I Szczygiel, A Poniedzialek, and M Osekowska. Structural and surface properties of semitransparent and antibacterial (Cu , Ti , Nb) Ox coating. *Applied Surface Science*, 380:159–164, 2016.
- [16] O Akhavan and E Ghaderi. Cu and CuO nanoparticles immobilized by silica thin films as antibacterial materials and photocatalysts. *Surface & Coatings Technology*, 205(1):219–223, 2010.
- [17] Y Xie, Y He, P L Irwin, T Jin, and X Shi. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7):2325–2331, 2011.
- [18] M Roselli, A Finamore, I Garaguso, Maria S Britti, and E Mengheri. Zinc Oxide Protects Cultured Enterocytes from the Damage Induced by *Escherichia coli* 1. *The Journal Of Nutrition*, (July):4077–4082, 2003.
- [19] R Brayner, R Ferrari-iliou, N Brivois, S Djediat, M F Benedetti, F Fie, and P Cedex. Toxicological Impact Studies Based on *Escherichia coli* Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. *Nano Letters*, 6(4):2–6, 2006.
- [20] K Reddy, K Feris, J Bell, and Wingett. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*, 90(213902):1–8, 2007.
- [21] C Gutiérrez, C Von Plessing, and A García. Metal nanostructures as antibacterial agents. pages 210–218, 2011.
- [22] H Abdullah, D Kuo, Y Kuo, F Yu, and K Cheng. Facile Synthesis and Recyclability of Thin Nylon Film- Supported n-Type ZnO / p-Type Ag O Nano Composite for Visible Light Photocatalytic Degradation of Organic Dye. *The Journal of Physical Chemistry*, pages 1–35, 2016.
- [23] Krishna R Raghupathi, Ranjit T Koodali, and Adhar C Manna. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. (27):4020–4028, 2011.
- [24] Ling Chuo, Shahrom Mahmud, Siti Khadijah, Mohd Bakhori, Amna Sirelkhatim, Dasmawati Mohamad, Habsah Hasan, Azman Seeni, and Rosliza Abdul. Effect of surface modification and UVA photoactivation on antibacterial bioactivity of zinc oxide powder. *Applied Surface Science*, 292:405–412, 2014.
- [25] B R Singh, A R Chowdhuri, B Das, A Le, T T Le, S Derman, B Mansuroglu, R S Patil, M R Kokate, M Potara, and E Jakab. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles — an antimicrobial study. *Science and Technology of Advanced Materials*, (9):7, 2008.

- [26] M Muhlbacher. *High-resolution characterization of TiN diffusion barrier layers High-resolution characterization of TiN diffusion barrier layers*. PhD thesis, Montanuniversität Leoben 10, 2015.
- [27] J W Shin, J Y Lee, T W Kim, Y S No, W J Cho, and W K Choi. Growth mechanisms of thin-film columnar structures in zinc oxide on p -type silicon substrates. *Applied Physics Letters*, 091911(88):2004–2007, 2006.
- [28] P Carvalho, P Sampaio, S Azevedo, C Vaz, J P Espinós, V Teixeira, and J O Carneiro. Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings. *Applied Surface Science*, 307:548–557, 2014.
- [29] H Zhou, L Xu, A Ogino, and M Nagatsu. Investigation into the antibacterial property of carbon films. *Diamond and Related Materials*, 17(July):1416–1419, 2008.
- [30] Sofiane Sedira, Slimane Achour, Ahmet Avci, and Volkan Eskizeybek. Physical deposition of carbon doped titanium nitride film by DC magnetron sputtering for metallic implant coating use. *Applied Surface Science*, 295:81–85, 2014.
- [31] Moshe Ben-sasson, Katherine R Zodrow, Qi Genggeng, Yan Kang, Emmanuel P Giannelis, and Menachem Elimelech. Surface Functionalization of Thin-Film Composite Membranes with Copper Nanoparticles for Antimicrobial Surface Properties. *Environmental Science & Technology*, 28:384–393, 2014.
- [32] C C Trapalis, M Kokkoris, G Perdikakis, and G Kordas. Study of Antibacterial Composite Cu / SiO₂ Thin Coatings. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 26:1213–1218, 2003.
- [33] I Factori. *Processamento e propriedades de compósitos de poliamida 6.6 reforçada com partículas de vidro reciclado*. Dissertação, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2009.
- [34] N Greeves. Nylon 6,6. http://www.chemtube3d.com/polymer/_Nylon66F.html, 2008.
- [35] L Tus, C Werner, and M Nitschke. Surface characterisation of NH₃ plasma treated polyamide 6 foils. *Colloids and Surfaces A*., 195:81–95, 2001.
- [36] C Damm, H Munstedt, and A Rosch. The antimicrobial efficacy of polyamide 6 / silver-nano- and microcomposites. *Materials Chemistry and Physics*, 108:61–66, 2008.
- [37] J Liu, D A. Sonshine, S Shervani, and R H. Hurt. Controlled Release of Biologically Active Silver from Nanosilver Surfaces. *ACS Nano*, 4(11):6903–6913, 2011.
- [38] E Weir, A Lawlor, A Whelan, and F Regan. The use of nanoparticles in anti-microbial materials and their characterization. *The Royal Society of Chemistry*, 133:835–845, 2008.
- [39] B Cheney. Introduction to Scanning Electron Microscopy. Technical report.
- [40] Jr. Sbaun Wihon C Ricbard Brundle Charles A. Evans. *Encyclopedia of Materials Characterization*. Manning Publications Co, 1992.

- [41] S Anandhan and S. Bandyopadhyay. Mapping of thermoplastic elastomeric nitrile rubber / poly (styrene-co-acrylonitrile) blends using tapping mode atomic force microscopy. *Journal of Materials Science*, 38:2793–2801, 2003.
- [42] M J Walzak, R Davidson, and M Biesinger. The Use of XPS , FTIR , SEM / EDX , Contact Angle , and AFM in the Characterization of Coatings. 7(June):317–323, 1998.
- [43] B R Kumar and T S Rao. AFM Studies on Surface Morphology, Topography and Texture of Nanostructured Zinc Aluminum Oxide Thin Films. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(4):1881–1889, 2012.
- [44] A P Marcelo, Rubens Bernardes F, Aldo E Job, Luiz A Colnago, and Jane E Frommer. Microscopia de Varredura por Força : uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros . 1997.
- [45] Z Orel, K Kogej, and M Zigon. Polyol-Mediated Synthesis of Zinc Oxide Nanorods and Nanocomposites with Poly (methyl methacrylate) Polyol-Mediated Synthesis of Zinc Oxide Nanorods and Nanocomposites with Poly (methyl methacrylate). *Journal of Nanomaterials*, 2012(June):9, 2012.
- [46] H Kahn. Difração de Raios X. Technical report, Material de Apoio para a disciplina PMI-2201, 2011.
- [47] Unknown. X-Ray Diffraction (Debye-Scherrer Method). http://physics.usask.ca/bzul-kosk/modphyslab/phys381manual/xray_diffraction_2004.pdf, 2004.
- [48] D I Rusu, G G Rusu, and D Luca. Structural Characteristics and Optical Properties of Thermally Oxidized Zinc Films. *Acta Physica Polonica A*, 119(6):850–856, 2011.
- [49] Philips MiPlaza Materials Analysis. X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS / ESCA), 2016.
- [50] T R Mothibinyane, G. Katumba, and B. W. Mwakikunga. FTIR and Raman Spectroscopy of Carbon Nanoparticles in SiO₂ , ZnO and NiO Matrices. *Nano Express*, 2008(3):421–426, 2008.
- [51] A Nakajima. Design of hydrophobic surfaces for liquid droplet control. *NPG Asia Materials*, 3(May):49–56, 2011.
- [52] A P Luz, S Ribeiro, and V C Pandolfelli. Artigo revisão : Uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários (Review article : Use of the wettability in the investigation of the corrosion. 54:174–183, 2008.
- [53] L. Marisa and V. Ferreira. *Revestimentos Hidrofóbicos*. Dissertação para obtenção do grau de mestre, Universidade Nova de Lisboa, 2013.
- [54] A V Delgado, F González-caballero, R J Hunter, and L K Koopal. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of Colloid and Interface Science*, 309:194–224, 2007.

- [55] E A Ostrosky, M K Mizumoto, M E L Lima, T M Kaneko, S O Nishikawa, and B R Freitas. Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(2):301–307, 2008.
- [56] A Anders. Film Deposition by Energetic Condensation. *Current Organic Chemistry*, 2008.
- [57] M. Giraldez and E. Yebra-pimentel. Hydrogel Contact Lenses Surface Roughness and Bacterial Adhesion. *INTECH*, 2012.
- [58] Santosh M Bobade. A reconstruction of cubic rs-ZnO on MgO (200) substrate through (100) plane of w- ZnO : rs-ZnO for transparent electronic application A reconstruction of cubic rs-ZnO on MgO (200) substrate through (100) plane of w-ZnO : rs-ZnO for transparent ele. *Applied Physics Letters*, 072102(100):0–4, 2012.
- [59] T Nishihara and J Xu. Control of preferred orientation for ZnO x films : control of self-texture. *Journal of Crystal Growth* 130, 130:269–279, 1993.
- [60] D Bao, H Gu, and A B. Sol – gel-derived c -axis oriented ZnO thin films. *D. Bao et al.rThin Solid Films*, 312:37–39, 1998.
- [61] D Klaitabtim, S Pratontep, and J Nukeaw. Effect of gas-timing technique on structure and optical properties of sputtered zinc oxide films. *Ceramics International* 34, 34:1103–1107, 2008.
- [62] P M Addahi, N S Hahtahmasebi, A K Ompany, and M M Ashreghi. Effect of doping on structural and optical properties of ZnO nanoparticles : study of antibacterial properties. *Materials Science-Poland*, 32(2):130–135, 2014.
- [63] K Segala, R L Dutra, A S Pereira, and T Trindade. In Situ and Ex Situ Preparations of ZnO/Poly-{trans-[RuCl₂(vpy)₄]/styrene} Nanocomposites. *Sociedade Brasileira de Química*, 21(10):1986–1991, 2010.
- [64] A B Lavand and Y S Malghe. Synthesis , characterization and visible light photocatalytic activity of carbon and iron modified ZnO. *Journal of King Saud University - Science*, Article in, 2016.
- [65] D Sharma, J Rajput, B S Kaith, M Kaur, and S Sharma. Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties. *Thin Solid Films*, 519(3):1224–1229, 2010.
- [66] A Naskar, S Bera, R Bhattacharya, P Saha, S S Roy, T Sen, and S Jana. Synthesis , characterization and antibacterial activity of Ag incorporated ZnO – graphene nanocomposite. *RSC Advances*, 6(January):88751–88761, 2016.
- [67] X Zhang, Q Zhang, T Yan, Z Jiang, X Zhang, and Y Zuo. Quantitatively Predicting Bacterial Adhesion Using Surface Free Energy Determined with a Spectrophotometric Method. *Environmental Science & Technology*, 49:6164–6171, 2015.
- [68] J Hasan, R J Crawford, and E P Ivanova. Antibacterial surfaces : the quest for a new generation of biomaterials. *Trends in Biotechnology May*, 31(5), 2013.

- [69] L Zhang, Y Ding, M Povey, and D York. ZnO nanofluids - A potential antibacterial agent. *Progress in Natural Science*, 18:939–944, 2008.
- [70] P K Stoimenov, R L Klinger, G L Marchin, and K J Klabunde. Metal Oxide Nanoparticles as Bactericidal Agents. *Langmuir*, (13):6679–6686, 2002.

Anexo

Name and formula

Reference code: 01-075-0576

ICSD name: Zinc Oxide

Empirical formula: OZn

Chemical formula: ZnO

Crystallographic parameters

Crystal system: Hexagonal

Space group: P63mc

Space group number: 186

a (Å): 3.2427

b (Å): 3.2427

c (Å): 5.1948

Alpha (°): 90.0000

Beta (°): 90.0000

Gamma (°): 120.0000

Calculated density (g/cm³): 5.71

Volume of cell (10⁶ pm³): 47.31

Z: 2.00

RIR: 5.53

Subfiles and Quality

Subfiles: Inorganic, Alloy, metal or intermetallic, Corrosion, Modelled additional pattern

Quality: Calculated (C)

Comments

ICSD collection code: 029272

References

Primary reference: Calculated from ICSD using POWD-12++, (1997)

Structure: Sabine, T.M., Hogg, S., Acta Crystallogr., Sec. B, 25, 2254, (1969)

Peak list

No.	h	k	l	d [Å]	2Theta[deg]	I [%]
1	1	0	0	2.80826	31.840	56.2
2	0	0	2	2.59740	34.503	41.2
3	1	0	1	2.47039	36.337	100.0
4	1	0	2	1.90683	47.653	21.5
5	1	1	0	1.62135	56.731	30.9
6	1	0	3	1.47393	63.016	27.2
7	2	0	0	1.40413	66.541	4.1
8	1	1	2	1.37538	68.120	22.7
9	2	0	1	1.35549	69.261	11.2
10	0	0	4	1.29870	72.759	1.8
11	2	0	2	1.23520	77.162	3.5
12	1	0	4	1.17875	81.610	1.8
13	2	0	3	1.09063	89.868	7.1

Stick Pattern

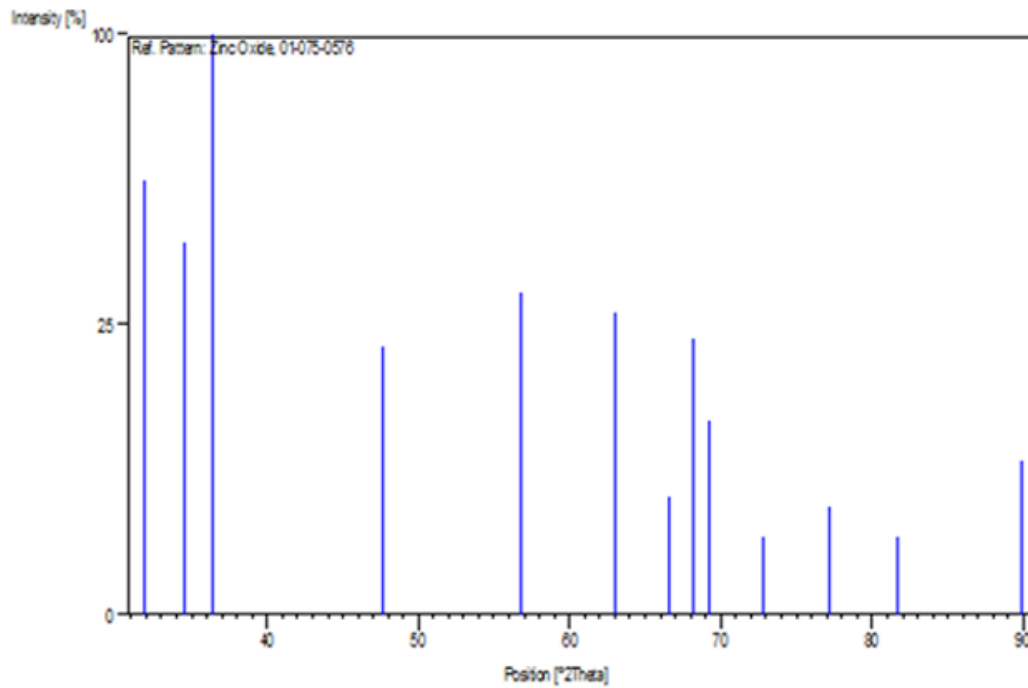


Figura 22: Anexo ficha ICDD 01-075-0576