

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS
Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA PELA MODIFICAÇÃO
DE REGIÕES PRÓXIMAS À SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL**

FERNANDO GRANIERO ECHEVERRIGARAY

Caxias do Sul

2014

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIAS DOS
MATERIAIS

ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA PELA MODIFICAÇÃO
DE REGIÕES PRÓXIMAS À SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

FERNANDO GRANIERO ECHEVERRIGARAY

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade de Caxias do Sul, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Engenharia e Ciência dos
Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Cesar Aguzzoli

Co-orientador: Prof. Dr. Israel J. R. Baumvol

Caxias do Sul

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS – BICE – Processamento Técnico

E18e Echeverrigaray, Fernando Graniero, 1987 -

Estudo da ação antimicrobiana pela modificação de regiões próximas a superfície de aço inoxidável / Fernando Graniero Echeverrigaray - 2014.
76 f. : Il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, 2013.

“Orientação: Prof. Dr. Cesar Aguzzoli, Co-orientação: Prof. Dr. Israel J. R. Baumvol.”

1. Biofilmes. 2. Aço inoxidável. 3. Materiais – Teste. I – Título.

CDU 2.ed.: 579.26

Índice para o catálogo sistemático:

1. Biofilmes	579.26
2. Aço inoxidável	669.14.018.8
3. Materiais - Teste	620.1

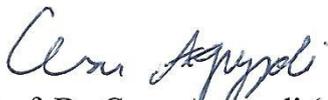
Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecário
Marcelo Votto Teixeira – CRB 10/1974

**ESTUDO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA PELA MODIFICAÇÃO DE
REGIÕES PRÓXIMAS À SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL**

FERNANDO GRANIERO ECHEVERRIGARAY

Dissertação de Mestrado julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Materiais da Universidade de Caxias do Sul. Área de concentração: Processamento e Simulação de Materiais.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Cesar Aguzzoli (orientador)
Universidade de Caxias do Sul



Prof. Dr. Marcos Antonio Zen Vasconcellos
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Dr. Marcelo Giovanela
Universidade de Caxias do Sul



Profa. Dra. Jadna Catafesta
Universidade de Caxias do Sul

Dedicado à minha família.

“A civilização, obviamente, sempre foi moldada pela tecnologia [...]. Os instrumentos e a organização do trabalho – dois elementos daquilo que chamamos de tecnologia – sempre moldaram tanto o que o homem faz quanto o que pode fazer.”

Peter F. Drucker

“God made solids, but surfaces were the work of the Devil...”

Wolfgang Pauli

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ter mostrado o caminho certo e ter aberto esta oportunidade de realizar o mestrado.

Aos meus pais Sérgio e Silvana, e aos meus irmãos Sérgio, Daniel, Felipe e Ana por terem me guiado e apoiado na jornada em busca do conhecimento. Ao Dr. Luiz F. Bonotto que unido à família sempre acreditou em mim e esteve ao meu lado, mesmo em tempos difíceis. Às minhas sobrinhas Sofia e Alice que com suas brincadeiras e alegria contagiante trouxeram-me momentos de descontração e felicidade.

Ao orientador Dr. Cesar Aguzzoli pela amizade, dedicação, paciência, apoio, incentivo e tempo despendido na realização deste trabalho. Sem o qual este projeto nunca haveria sido realizado.

Ao co-orientador Dr. Israel J. R. Baumvol pela valiosa orientação e por compartilhar de seu vasto conhecimento científico que foi indispensável na realização deste trabalho.

Ao Paulinho e Gervaldo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul que sempre se dispuseram em auxiliar na manutenção do equipamento de implantação de íons, quando nada mais parecia dar certo.

Agradeço a todos os colegas de trabalho pela amizade e carinho, em especial, Tatiana P. Soares, Indiana P. Facchin, Alan De Castro e Ana Elisa, onde juntos iniciamos uma valiosa jornada de trabalho e estudos, formando um círculo de amizade e companheirismo.

À Universidade de Caxias do Sul por disponibilizar o LESTT e LPN para a modificação superficial das amostras e a realização das análises de GD-OES e MEV, e o Instituto de Biotecnologia para a realização dos ensaios biológicos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por disponibilizar o Laboratório de Implantação Iônica para a realização da análise de RBS.

Enfim, agradecimentos são inúmeros, pois várias pessoas fizeram parte desta conquista. Agradeço a todos pelo carinho e por terem acreditado no meu potencial.

Muito obrigado!

Resumo

Os biofilmes constituem uma nova forma de vida que oferece maior resistência aos micro-organismos, protegendo-os contra agressões físicas e químicas do meio envolvente, o que facilita a sua adaptação em condições adversas. O desenvolvimento de biofilmes patogênicos em superfícies de contato nas áreas da saúde (próteses e instrumentos cirúrgicos) e alimentícia (equipamentos e tubulações) é a principal causa do acréscimo de contaminações que podem, eventualmente, originar problemas de saúde pública e de ordem econômica. Para prevenir, controlar ou erradicar biofilmes, alternativas tecnológicas vêm sendo desenvolvidas e testadas em materiais com propriedades antimicrobianas. Dentro deste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar as propriedades antimicrobianas dos íons prata (Ag^+) implantados no aço inoxidável austenítico AISI 304 a baixa energia (4 keV) no equipamento *Ion Plating Diversified* (IPD). As bactérias estudadas foram *Escherichia coli* (IBEc 101) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). As simulações de Monte Carlo previram para uma determinada energia de polarização, o perfil de dose e profundidade de íons Ag^+ implantados no aço. A análise físico-química apresentou doses de prata, na ordem de grandeza de 10^{16} átomos/cm² em profundidades menores do que 10 nm. A densidade areal de átomos de prata implantados foi influenciada pela relação entre o índice de corrente de emissão e o tempo de processo. Os resultados microbiológicos obtidos apresentaram uma significativa redução na aderência bacteriana (95% de *E. coli* e 90% de *S. aureus*) em relação aos seus controles. Porém, impurezas como o oxigênio encontrado na superfície das amostras alteraram a capacidade de aderência das células bacterianas. A variação do pH do meio de cultura fez com que a repulsão eletrostática entre as células bacterianas e a superfície sólida aumentasse para valores de pH próximos da neutralidade e diminuísse para valores de pH não alcalinos, interferindo desta forma, na adesão das bactérias. Ainda que faltem dados que comprovem seu rendimento e o custo total do produto tratado, existe uma enorme perspectiva de tornar o processo IPD em escala industrial.

Palavras-chave: Biofilmes, propriedades antimicrobianas, implantação iônica a baixas energias, íons de prata, aço inoxidável.

Abstract

The biofilms are a new form of life that offers greater resistance to microorganisms, protecting them against physical and chemical aggressions of the surroundings, which facilitate its adaptation in adverse conditions. The development of pathogenic biofilms on contact surfaces used in the health and food industries is the main cause of increased contamination that can, eventually, lead to public health problems and economic order. To prevent, control or eradicate biofilms, technological alternatives are being developed and tested in materials with antimicrobial properties. Within this context, this study aimed to evaluate the antimicrobial properties of silver ions (Ag^+) implanted on the surface of austenitic stainless steel AISI 304 by the technique of ion implantation at low energy (4 keV) in an Ion Plating Diversified (IPD) equipment. The bacteria studied were *Escherichia coli* (IBEc 101) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). The simulations Monte Carlo has predicted for a given energy of polarization, the dose and depth profile of ions Ag^+ implanted in steel. Physico-chemical analysis presented doses of silver, in the order of magnitude of 10^{16} atoms/cm² at depths less than 10 nm. The areal density of silver atoms implanted was influenced by the relationship between the emission current index and the process time. The microbiological results obtained showed a significant reduction in bacterial adhesion (95% for *E. coli* and 90% for *S. aureus*) in relation to its controls. However, impurities such as oxygen found on the surface of samples altered the adhesion of the bacterial cells. The variation of the pH of the culture medium caused the electrostatic repulsion between bacterial cells and solid surface increases to pH values close to neutrality and to shrink to no alkaline pH values, interfering in this way, in the adhesion of bacteria. Missing data yet proving their income and the total cost of the product treated, there is a huge prospect of making the process IPD on an industrial scale.

Keywords: Biofilms, antimicrobial properties, low energy ion implantation, ions of silver, stainless steel.

Sumário

Lista de Siglas e Abreviaturas	i
Lista de Símbolos	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Equações	vi
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	5
2.1. Biofilmes	5
2.1.1. Micro-organismos formadores de biofilmes.....	6
2.1.2. Mecanismo de adesão e formação de biofilmes microbianos.....	8
2.1.3. Aspectos físicos, químicos e biológicos na adesão microbiana.....	11
2.1.4. Importância e impacto dos biofilmes nas atividades humanas	13
2.1.5. Estratégias desenvolvidas no controle de biofilmes.....	14
2.2. Modificação superficial através de processos de feixe de íons	15
2.2.1. Engenharia de superfícies	15
2.2.2. Implantação iônica	16
2.2.3. <i>Ion Plating</i>	19
2.2.4. Implantação iônica a baixa energia por <i>Ion Plating Diversified (IPD)</i>	20
2.3. Prata ionizada como agente antimicrobiano	23
2.3.1. Mecanismos de ação dos íons prata	24
2.4. Técnicas de caracterização	26
2.4.1. <i>Stopping and Range of Ions in Matter - SRIM</i>	26
2.4.2. Espectrometria de retro-espalhamento Rutherford (RBS)	27
2.4.3. Espectroscopia de emissão ótica por descarga luminescente (GD-OES).....	29
2.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	31
2.4.5. Espectrofotometria de ultravioleta-visível	32
3. Materiais e métodos	33
3.1. Preparação das amostras.....	33
3.2. Implantação de íons Ag ⁺ a baixa energia por <i>Ion Plating Diversified (IPD)</i>	34
3.3. Caracterização da modificação superficial	36
3.3.1. Simulação de Monte Carlo pelo software SRIM	36
3.3.2. Análise por feixe de íons	36
3.3.3. Determinação do perfil de profundidade	37

3.3.4. Avaliação morfológica e estrutural das bactérias aderidas	37
3.4. Ensaio biológicos.....	37
3.4.1. Seleção das espécies bacterianas formadoras de biofilmes	38
3.4.2. Meio de cultura	38
3.4.3. Preparação da suspensão bacteriana.....	38
3.4.4. Ensaio de antibiofilme bacteriano	38
3.4.5. Tratamento de desoxidação	39
4. Resultados e Discussão	40
4.1. Análise da superfície modificada	40
4.1.1. Estudo da energia de implantação dos íons pela simulação de Monte Carlo	40
4.1.2. Avaliação das doses implantadas	41
4.1.3. Análise de profundidade	43
4.1.4. Imagens da adesão bacteriana na superfície do aço inoxidável.....	44
4.2. Resultados biológicos.....	45
4.2.1. Análise da aderência de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> na superfície do aço inoxidável	45
4.2.2. Biofilme bacteriano	46
4.2.3. Influência do pH na adesão de <i>E. coli</i> à superfície de aço inoxidável	47
5. Conclusões	49
6. Perspectivas	51
7. Referências	52
Anexo A	59
Anexo B	60

Lista de Siglas e Abreviaturas

UCS	-	Universidade de Caxias do Sul
UFRGS	-	Universidade do Rio Grande do Sul
LESTT	-	Laboratório de Engenharia de Superfície e Tratamentos Térmicos
LPN	-	Laboratório de Propriedades Nanomecânicas
LII	-	Laboratório de Implantação Iônica
IB	-	Instituto de Biotecnologia
AISI	-	<i>American Iron and Steel Institute</i>
ISO	-	<i>International Organization for Standardization</i>
ASTM	-	<i>American Society for Testing Materials</i>
LB	-	<i>Luria Bertani</i>
SRIM	-	<i>Stopping and Range of Ions in Matter</i>
IBA	-	<i>Ion Beam Analysis</i>
RBS	-	<i>Rutherford Backscattering Spectrometry</i>
GD-OES	-	<i>Glow-Discharge Optical Emission Spectroscopy</i>
SEM	-	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SIMS	-	<i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>
XPS	-	<i>X ray Photoelectron Spectroscopy</i>
UV/Vis	-	Ultravioleta/Visível
EPS	-	<i>Extracellular polymeric substances</i>
QS	-	<i>Quorum sensing</i>
AI	-	Auto-indutora
PVD	-	<i>Physical Vapor Deposition</i>
IAD	-	<i>Ion Assisted Deposition</i>
IVD	-	<i>Ion Vapor Deposition</i>
IP	-	<i>Ion Plating</i>
IPD	-	<i>Ion Plating Diversified</i>
BIAS	-	Voltagem aplicada a um transistor ou outro dispositivo eletrônico
RF	-	Rádiofrequência
TD	-	Tratamento de desoxidação
ddp	-	Diferença de potencial

Lista de Símbolos

keV	-	Quilo elétrons-volt
Å	-	Angstroms
Ag ⁺	-	Íons prata
AgO	-	Óxido de prata
OH ⁻	-	Hidróxido
H ₃ O ⁺	-	Hidrônio
NaOH	-	Hidróxido de sódio
NaCl	-	Cloreto de sódio
PBS	-	Tampão fosfato salino
Ag	-	Prata
Cu	-	Cobre
Au	-	Ouro
Zn	-	Zinco
Sn	-	Estanho
Si	-	Silício
Bi	-	Bismuto
Pt	-	Platina
O	-	Oxigênio
Ar	-	Argônio
He ⁺	-	Íons de Hélio
K	-	Fator cinemático
E	-	Espalhamento
E ₀	-	Energia inicial
Q	-	Quantidade de átomos/cm ² do elemento
A	-	Área abaixo do sinal correspondente no espectro medido
N	-	Número total de íons incidentes
Z	-	Número atômico
M1	-	Massa atômica da partícula incidente
M2	-	Massa atômica da partícula do alvo
θ	-	Ângulo da trajetória da partícula antes e depois do espalhamento

Lista de Figuras

Figura 1 - Simulação do perfil de concentração/profundidade dos íons implantados no aço inoxidável (a) média energia (100 keV) e (b) baixa energia (4 keV).....	4
Figura 2 - Representação da parede celular das bactérias Gram-positiva <i>Staphylococcus aureus</i> e Gram-negativa <i>Escherichia coli</i>	7
Figura 3 - Esquema dos estágios do desenvolvimento de biofilmes.	9
Figura 4 - Representação esquemática das etapas envolvidas na adesão de biofilmes	13
Figura 5 - Esquema da divisão da engenharia de superfícies.....	16
Figura 6 - Esquema de um implantador iônico.....	17
Figura 7 - Interações dos íons incidentes com a superfície do material alvo	17
Figura 8 - Principais etapas e componentes do processo de implantação iônica a baixas energias por IPD (a) canhão de elétrons; (b) ionizador; (c) câmara de implantação e (d) porta-amostra polarizado com alta tensão (BIAS) de - 4 keV	20
Figura 9 - Esquema da deflexão dos elétrons primários em direção ao centro do cadinho e a evaporação do material de interesse	18
Figura 10 - Esquema do feixe de elétrons induzindo a formação dos íons	18
Figura 11 - Representação da trajetória de penetração de íons pesados (efeito cascata).....	19
Figura 12 - Redução de biofilme de <i>Pseudomona fluorescens</i> (24 h) na presença e ausência de prata.....	20
Figura 13 - Estudo da interação dos Ag^+ com as células de (a) <i>E. coli</i> e (b) <i>S. aureus</i>	21
Figura 14 - Representação da ligação dissulfeto na molécula da proteína e o rompimento dessa ligação pelos íons Ag^+	22
Figura 15 - Esquema representativo das ligações entre as bases purinas e pirimidinas da molécula de DNA	22
Figura 16 - Esquema experimental de uma análise por RBS.	23
Figura 17 - Representação dos processos de perda de energia por retroespalhamento, a partir da superfície e em profundidade na amostra.....	24
Figura 18 - Princípio de funcionamento do equipamento de GD-OES	25
Figura 19 - Esquema de captação da assinatura ótica característica de cada elemento.	26
Figura 20 - Imagem de MEV das bactérias (a) <i>Staphylococcus aureus</i> e (b) <i>Escherichia coli</i>	27
Figura 21 - Dimensões da placa de AISI 304 após a implantação de íons Ag^+	30
Figura 22 - Equipamento de implantação iônica a baixa energia baseado no <i>Ion Plating</i>	30
Figura 23 - Etapas do procedimento realizado durante os ensaios biológicos.	35

Figura 24 - Simulação do perfil de concentração/profundidade de implantação de íons Ag^+ a baixas energias	36
Figura 25 - Simulação do perfil de concentração/profundidade a baixa energia (4 keV) e a média energia (100 keV) de polarização no processo de implantação iônica.	37
Figura 26 - Espectro de RBS que mostra a coleta do valor da área de prata de uma amostra da série I	37
Figura 27 - Densidade areal de átomos de prata por centímetro quadrado em função da corrente de emissão utilizada nas implantações.	38
Figura 28 - Perfil de profundidade dos elementos químicos constitutivos das amostras da série: (a) I; (b) II; (c) III e (d) IV.....	39
Figura 29 - Perfil de GD-OES das amostras da série III acondicionadas: (a) ar atmosférico e (b) vácuo	40
Figura 30 - Imagens de MEV mostrando a adesão de <i>E. coli</i> das amostras da série III (a) e (b) não tratadas; (c) e (d) tratadas com íons Ag^+	41
Figura 31 - Adesão da <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> à superfície do AISI 304, sem e com implantação de íons Ag^+ (Série III) e, sem e com tratamento de desoxidação (TD).....	42
Figura 32 - Formação de biofilme de <i>E. coli</i> à superfície do AISI 304, sem e com implantação de íons Ag^+ (Série III) e, sem e com tratamento de desoxidação (TD).....	43
Figura 33 - Influência do pH no processo de adesão das células de <i>E. coli</i> à superfície de aço inoxidável.....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Lista parcial de infecções e doenças humanas envolvendo biofilmes patogênicos.....	2
Tabela 2 - Diferenciação da composição química da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	3
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens da técnica de implantação iônica.	14
Tabela 4 - Desenvolvimento da técnica de implantação iônica na modificação de biomateriais	15
Tabela 5 - Vantagens e desvantagens de um equipamento do tipo <i>Ion Plating</i>	16
Tabela 6 - Comparativo das análises de perfil de profundidade GD-OES, SIMS e XPS	27
Tabela 7 – Mostra os valores estabelecidos pela norma ATM A204 e a composição do AISI 304, para fins de comparação	29
Tabela 8 - Condições das implantações iônicas a baixa energia (4 keV).	31

Lista de Equações

Equação 1 - Fator cinemático	24
Equação 2 - Quantidade de átomos/cm ² do elemento.....	25

1. Introdução

O controle de micro-organismos patogênicos é um campo que abrange diferentes aspectos da natureza e da vida humana. A investigação da adesão inicial de micro-organismos e o posterior desenvolvimento do biofilme em superfícies sólidas são dois fatores cruciais para o desenvolvimento de materiais com propriedades antimicrobianas. Estes materiais visam obter o controle sobre o impacto dos biofilmes, não só na área da engenharia, mas também, na área da saúde, como a ciência marinha, a indústria alimentícia e a biomedicina [1 - 3].

Dentre os materiais utilizados nas áreas mencionadas, destacam-se os aços inoxidáveis com excelente resistência à corrosão, fadiga e fratura. Estas ligas metálicas são empregadas em instrumentos cirúrgicos, implantes em menor escala e no processamento e armazenamento, de alimentos e bebidas. Embora seja uma superfície lisa e de fácil higienização, comparada com outros materiais, ainda está sujeita ao acúmulo de comunidades microbianas [1]. Estes micro-organismos, como as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, e leveduras como *Candida albicans* e *Cryptococcus albidus*, podem manter-se imóveis na superfície do material por um longo período de tempo até se proporcionar o seu desenvolvimento na forma de um biofilme [4 - 6].

Na ciência médica, a formação de biofilmes bacterianos apresenta, geralmente, um caráter nocivo que está associado a um grande número de problemas de saúde, tais como aqueles listados na Tabela 1 [7]. Recentemente, pesquisas relataram contaminações cruzadas de pacientes associadas à formação de biofilmes bacterianos em instrumentos e dispositivos médicos, como por exemplo, na superfície de implantes (contaminado) e no tecido de hospedeiros (não contaminado). Uma vez constituídos, os biofilmes agem como fontes potenciais de contaminação por células de micro-organismos patogênicos, liberadoras de toxinas e causadoras de inflamações e infecções. Nestes casos, os implantes infectados requerem cirurgias e intervenções médicas extensas, e dispendiosas, e o tratamento pode levar meses. De acordo com a literatura, a melhor estratégia para combater contaminações associadas a implantes é prevenir que elas ocorram. Isto de fato é possível, pois a infecção bacteriana é inicialmente planctônica (livre flutuação), e somente após uma fase aguda a bactéria adere e elabora uma matriz de biofilme [8 - 11].

Nos equipamentos da indústria de alimentos, os biofilmes representam também um risco potencial de contaminação microbiana, que pode comprometer a qualidade dos alimentos e da saúde pública [12]. A acumulação de biofilmes em equipamentos pode, ainda, causar efeitos danosos como perdas de eficiência em permutadores de calor, perdas de carga em dutos e tubulações, assim como a aceleração da corrosão de materiais [2;12].

Tabela 1 – Lista parcial de infecções e doenças humanas envolvendo biofilmes patogênicos [9].

Infecções ou doenças	Espécies bacterianas formadoras de biofilmes
Pneumonia por fibrose cística	<i>Pseudomona auriginosa</i> e <i>Burkholderia cepacia</i>
Otite média	<i>Haemophilos influenzae</i>
Periodontite	Bactérias anaeróbicas orais Gram-negativas
Osteomielite	Várias espécies de bactérias e fungos, geralmente misturadas
Cáries dentais	Cocos Gram-positivos acidogênicos (ex.: <i>Streptococcus</i>)
Infecções do músculo-esqueleto	Cocos Gram-positivos (ex.: <i>Staphylococcus</i>)
Prostatite bacteriana	<i>Escherichia coli</i> e outras bactérias Gram-negativas
Endocardite de válvula nativa	<i>Streptococcus</i> do grupo viridans
Infecções nosocomiais	
Pneumonia	Bacilos Gram-negativos
Suturas (pontos cirúrgicos)	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Vias arteriovenosas	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Tubos endotraqueais	Uma variedade de bactérias e fungos
Cistite por cateteres urinários	<i>Escherichia coli</i> e outros bacilos Gram negativos
Cateteres Hickman	<i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Candida albicans</i>
Cateteres centrais venosos	<i>Staphylococcus epidermidis</i> e outros
Válvulas mecânicas do coração	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>
Enxertos vasculares	Cocos Gram positivos
Bloqueio do conduto biliar	Uma variedade de bactérias entéricas e fungos
Dispositivos ortopédicos	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>epidermidis</i>
Próteses	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>epidermidis</i>
Lentes de contato	<i>Pseudomona auriginosa</i> e cocos Gram-positivos

Alternativas tecnológicas vêm sendo desenvolvidas e testadas visando o controle dos micro-organismos, dentre elas a modificação de superfícies, como aço inoxidável, com a incorporação de metais com atividade antimicrobiana, como prata (Ag), por meio de diversas técnicas, entre as quais a implantação iônica [3; 4 - 6; 13 - 16].

A implantação iônica consiste em introduzir espécies de elementos químicos em regiões relativamente próximas a superfície destes materiais, ao mesmo tempo em que preserva o volume e as propriedades físico-químicas do material original [13 - 16]. Tais elementos, como Ag, Cu, Au, Zn e Sn, apresentam ação contra uma ampla faixa de

micro-organismos. Dentre todos os íons metálicos, Ag^+ é o primeiro candidato utilizado em pesquisas para efeito antibacteriano, sem efeito tóxico aparente para as células humanas, quando em baixas concentrações, em comparação com os outros íons de metais pesados [3; 17 - 19]. Segundo estes estudos, a concentração ou dose máxima de implantação iônica pode atingir até 3×10^{17} átomos/cm² a uma profundidade de aproximadamente 30 nm quando aplicada uma energia de 100 keV (Figura 1a). Condições semelhantes a estas constataram um efeito antibacteriano de 99,5% na superfície de aços inoxidáveis [5; 6; 17; 18 - 20].

No entanto, as limitações encontradas no equipamento do método de implantação iônica, torna inatingível à produção industrial em larga escala, onde, em dados mais otimistas a área superficial implantada pode ser algo em torno de 4 cm² e com tempo de duração de 12 a 14 horas. Além disso, os íons implantados requerem uma energia mínima de 30 keV, para atingir concentrações de 1×10^{16} átomos/cm² em regiões próximas da superfície. Estes fatores elevam o custo total do processo, inviabilizando a aplicação prática baseada neste método [14; 16].

Embora existam muitos trabalhos com o propósito de modificação do aço inoxidável pela técnica de implantação iônica utilizando regimes de interação íons/superfície alvo de média energia (30 keV - 500 keV) e alta energia (> 500 keV), não há muitos estudos que relatam o seu emprego a baixas energias (0,1 - 10 keV) [4; 21]. Por isso, este trabalho mostra-se como um importante passo na pesquisa de novas tecnologias que podem ser empregadas para modificar a região próxima à superfície de metais.

Neste trabalho é proposto o método de implantação iônica a muito baixas energias, essencialmente inferiores a 4 keV, em um equipamento de *Ion Plating*. Através das simulações obtidas para esta técnica (Figura 1b), espera-se que um efeito antimicrobiano significativo possa ser obtido mediante a implantação de Ag^+ a baixas energias, com concentrações em torno de 1×10^{16} átomos/cm² em profundidades menores do que 10 nm. Este tratamento superficial visa inicialmente reduzir o número de contaminações por micro-organismos patogênicos pela prevenção ou erradicação do desenvolvimento de biofilmes, nas áreas da saúde e da indústria alimentícia.

O material implantado foi avaliado quanto as suas propriedades físico-químicas com o auxílio das técnicas de espectrometria de retro-espalhamento Rutherford (RBS) e espectroscopia de emissão ótica por descarga luminescente (GD-OES). O efeito sobre os micro-organismos testados (*E. coli* e *S. aureus*) foi avaliado através de testes de

aderência e formação de biofilmes obtidos por espectrofotometria de ultravioleta/visível (UV/Vis), após coloração celular com corante violeta genciana. O processo de adesão irreversível dos micro-organismos foi identificado por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

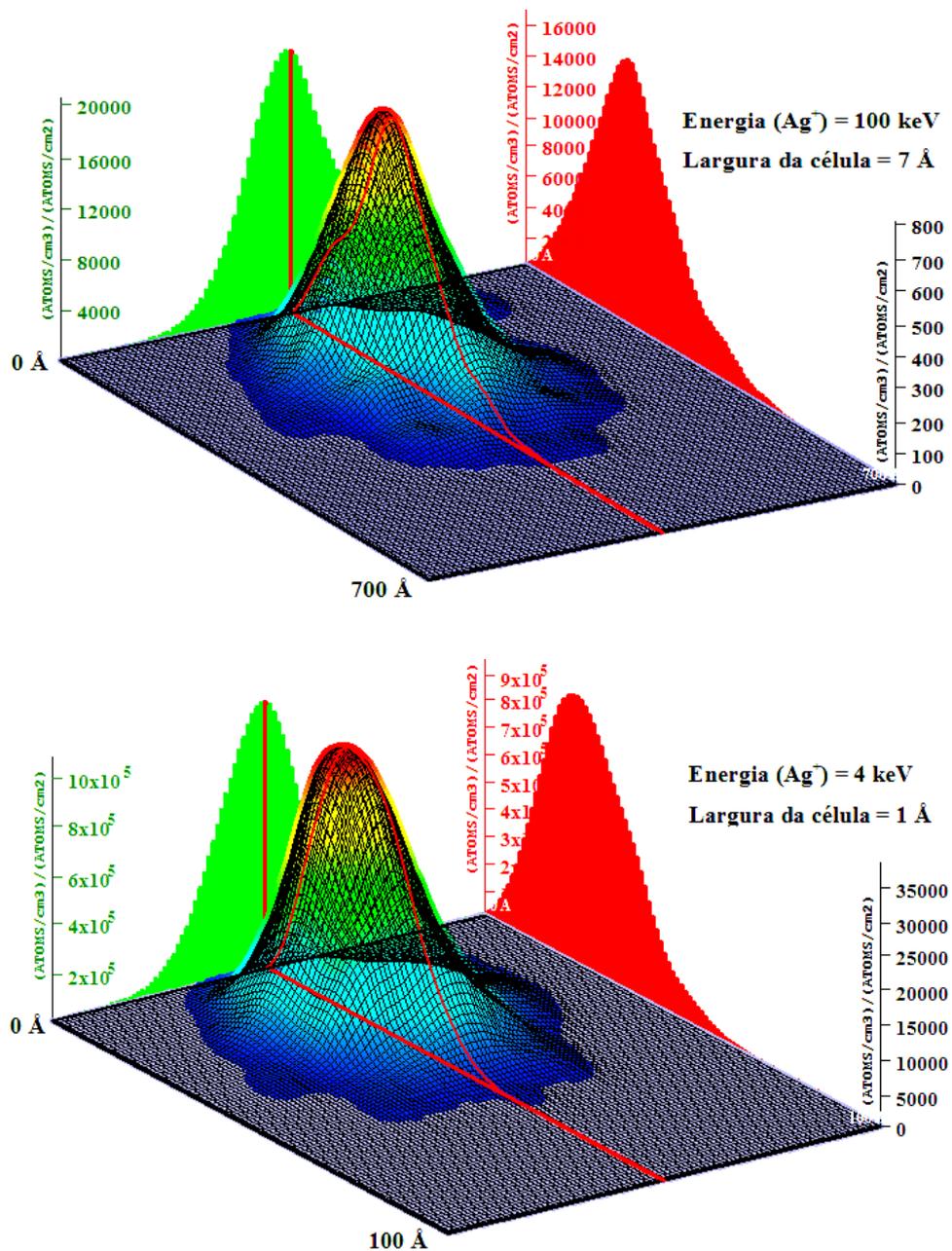


Figura 1 – Simulação do perfil de concentração/profundidade dos íons implantados no aço inoxidável (a) média energia (100 keV) e (b) baixa energia (4 keV). Os perfis foram obtidos através de simulações do software SRIM, as quais são descritas com detalhes nos subcapítulos 2.4.1 e 3.4.1.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Biofilme

O conceito de biofilme tem emergido gradualmente de estudos científicos durante longo período de tempo, porém, nas últimas três décadas, essa concepção tem avançado consideravelmente [22].

A primeira publicação detalhada sobre biofilmes foi descrita, na metade do século passado, pelo microbiologista Claude E. Zobell, do Instituto Scripps de Oceanografia, da Universidade da Califórnia. Neste estudo foi evidenciada a adesão de bactérias marinhas nos cascos de navios em diferentes tipos de superfícies submersas, incluindo vidro, metal e polímero. Constataram-se mais fragmentos de células agregadas em superfícies sólidas do que células individuais em suspensão [23]. A acumulação de biomassa nos cascos de navios é responsável pela diminuição da velocidade e manobrabilidade, devido ao aumento do atrito, resultando num aumento do consumo de combustível que pode atingir 40% [24].

Com o avanço da tecnologia, técnicas mais sofisticadas e efetivas foram empregadas pelos investigadores que designaram o nome de biofilme, aos micro-organismos aderidos numa superfície sólida, compostos por células microbianas de fisiologia distinta, chamadas sésseis ou bentônicas. Essas estruturas formadas espontaneamente demonstraram serem menos susceptíveis a agressões ambientais do que os micro-organismos encontrados em sua forma planctônica. Com base nestas observações, foi concluído que muitos micro-organismos preferem um estilo de vida comunitário associado a superfícies, ao invés de uma existência nômade. O biofilme representa um modo de crescimento e de resistência que permite aos micro-organismos sobreviverem em ambientes hostis, dispersando e colonizando novos nichos [7; 22; 25]. Entretanto, os micro-organismos planctônicos precursores da formação de biofilmes foram, durante muitos anos, referência para a seleção de agentes antimicrobianos [26].

A partir de então, os biofilmes são definidos como sistemas biológicos altamente organizados, onde diversos tipos de micro-organismos (predominantemente as bactérias) estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas, aderentes a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica). Os biofilmes representam a parte maioritária de toda a vida microbiana (estima-se que mais de 90% dos micro-organismos vivam sob a forma de biofilmes), tanto em quantidade como em termos de atividade [27].

Os micro-organismos dentro de um biofilme vivem em microcolônias e representam somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme (menos de 10%). As microcolônias estão encapsuladas numa matriz composta de substâncias poliméricas extracelulares, frequentemente denominadas de EPS (do inglês *extracellular polymeric substances*). Estas substâncias formam uma estrutura porosa e altamente hidratada com canais de água entre as microcolônias. Estes pequenos canais de água abertos atuam como um sistema pseudocirculatório para o fornecimento de nutrientes e remoção de resíduos metabólicos [27 - 30].

Os biofilmes formam-se naturalmente em qualquer superfície sólida em contato com água não esterilizada, como tecidos vivos, dispositivos médicos e sistemas de água. Na maior parte das superfícies sólidas, os biofilmes se formam com espessuras da ordem dos milímetros ou mesmo micrômetros; entretanto, a espessura de alguns biofilmes pode atingir vários centímetros, como no caso dos tapetes de algas [29].

A densidade populacional é um fator importante que influencia no crescimento de um biofilme. O aumento da densidade populacional gera alterações na estrutura do biofilme, elevando a complexidade e a resistência microbiológica contra agressões externas. Os biofilmes são responsáveis por mais de 60% das infecções bacterianas humanas [7; 27]. Portanto, o crescimento do biofilme tem consequências importantes na indústria e na saúde humana, e deve ser tratado como uma nova forma de vida que merece enfoque diferenciado em relação à abordagem adotada pela microbiologia tradicional.

2.1.1. Micro-organismos formadores de biofilmes

Dentre todos os micro-organismos, são as espécies bacterianas que mais comumente produzem biofilmes em condições favoráveis, ainda que algumas apresentem, naturalmente, uma maior aptidão que outras. A maioria das bactérias apresentam elevadas taxas de reprodução, grande capacidade de adaptação e de produção de substâncias e estruturas extracelulares que as protegem do meio circundante. Essas características as tornam excelentes organismos capazes de colonizar qualquer superfície, até mesmo em condições extremas [31].

As espécies bacterianas são divididas em dois grupos distintos: as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esta classificação distingue as diversas estruturas das membranas celulares das bactérias, como mostra a Tabela 2. As bactérias Gram-

negativas como, por exemplo, a *Escherichia coli*, normalmente têm uma parede celular bem definida, composta por peptidoglicano e uma bicamada de fosfolipídios abaixo da membrana citoplasmática. Ao contrário, as bactérias Gram-positivas, como a *Staphylococcus aureus*, têm uma camada fina de 1-2 nm de espessura e uma camada alternada de peptidoglicano entre a parte interna e externa da membrana citoplasmática (Figura 2) [9; 32].

Tabela 2 – Diferenciação da composição química da membrana celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Adaptado de [32].

Componentes	Bactéria Gram-positiva	Bactéria Gram-negativa
Peptidoglicano	+	+
Ácidos Lipoteicóicos	+	-
Polissacarídeos	+	-
Proteínas	+ ou -	+
Lipopolissacarídeos	-	+
Lipídeos	- ou +	+

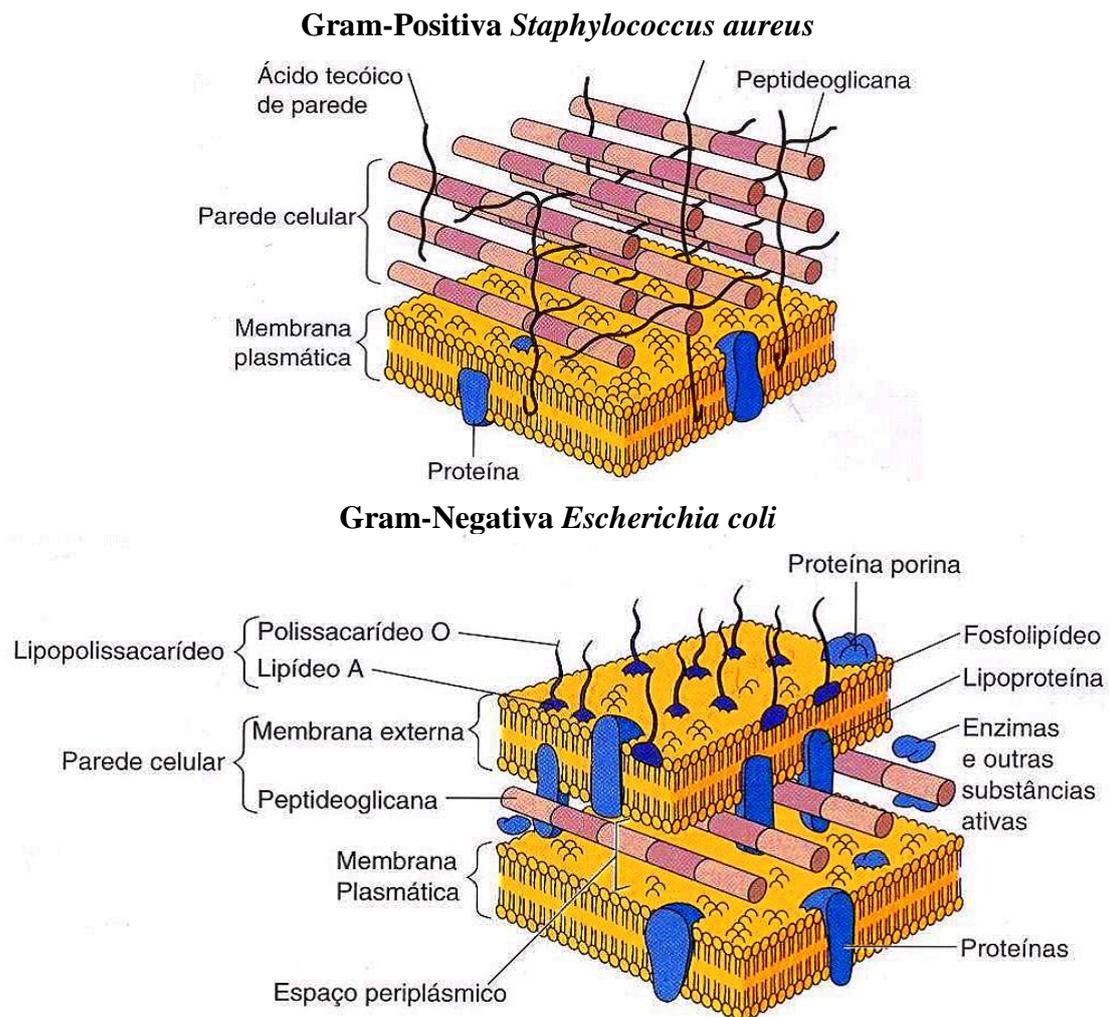


Figura 2 – Representação da parede celular das bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli*. Adaptado de [31].

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbica facultativa, ou seja, não necessita de oxigênio para formar um biofilme, embora desenvolvam mais rapidamente em ambientes ricos em oxigênio. Esta bactéria é proveniente da flora intestinal e apresenta-se na forma de um bacilo, sendo que cada bactéria mede aproximadamente 0,5 µm de largura por 2 µm de comprimento [31]. Geralmente, a bactéria em questão habita o trato gastrointestinal de humanos e outros animais endotérmicos, sem causar problemas de saúde. No entanto, ao se direcionar para a circulação sanguínea ou demais regiões do corpo, é capaz de provocar doenças e infecções no próprio hospedeiro. Também pode se manifestar pela ingestão de água ou alimentos contendo cepas da bactéria, liberadas juntamente com as fezes de indivíduos contaminados, assim como pelo contato com animais doentes e instrumentos médicos contaminados. A *E. coli* causa infecções no trato urinário que afetam aproximadamente 7 milhões de pessoas anualmente, sendo estas infecções uma das mais comuns adquiridas por humanos [33].

A *Staphylococcus aureus* é a mais virulenta espécie do seu gênero pela alta produção de exotoxinas, e é uma das espécies patogênicas mais comuns, juntamente com a *Escherichia coli*. Apresenta-se na forma esférica (cocos) com cerca de 1 µm de diâmetro que formam grupos com aspecto de cachos de uvas com cor amarelada, devido à produção de carotenoides. Essa bactéria merece uma atenção considerável, já que é a principal causa da osteomielite (infecções ósseas) associadas a corpos estranhos, como próteses e dispositivos osteosintéticos. Aproximadamente, 40 a 60% das infecções associadas a *S. aureus* adquiridas via nosocomial, são agora consideradas endêmicas em hospitais [34]. As infecções são frequentemente causadas por pequenos cortes na pele (aproximadamente 15% da população), sendo que 60% são portadores transitórios deste tipo de bactéria na pele ou flora nasal [31; 34].

2.1.2. Mecanismo de adesão e formação de biofilmes microbianos

A formação de um biofilme está integrada ao ciclo de vida das células procarióticas. Este fenômeno é responsável pela origem de um sistema biológico com alto nível de organização, em que os micro-organismos formam comunidades funcionais, estruturadas e coordenadas, com atributos para organismos multicelulares e ecossistemas de faces múltiplas [35].

A estrutura de biofilmes pode ser comparada a de cidades em miniatura, com canais e vazios que permeiam as microcolônias, como estradas e vias percorrendo entre

edifícios altos. A construção de uma cidade (biofilme) é um processo complexo e desempenha um papel muito importante na atividade dos micro-organismos. Em conjunto com as condições hidrodinâmicas e fornecimento de nutrientes, a forma do biofilme influencia a transferência de massa das espécies químicas envolvidas. Apesar disso, a alma de grandes comunidades são as redes sociais e a comunicação eficaz entre os trabalhadores, neste caso os micro-organismos, que evidenciam as interações mutuamente benéficas entre as células microbianas e o desenvolvimento do biofilme [36 - 38].

A atividade das células microbianas é uma série coordenada de eventos moleculares, em conjunto com fatores externos, como forças de atrito e outras forças mecânicas envolvidas que moldam a estrutura dos biofilmes. Estes eventos moleculares são parcialmente controlados por *quorum sensing* (QS), através de sinais químicos. Este mecanismo de comunicação intercelular é dependente da densidade populacional dentro de um biofilme [36; 39].

A formação de um biofilme é resultado de vários processos de natureza física e biológica, tais como crescimento e divisão celular e produção e excreção de EPS. A Figura 3 ilustra um modelo simples do desenvolvimento de um biofilme, o qual descreve o processo em cinco estágios. Após a fixação inicial de células microbianas (processo 1), o resultado dos processos ocorrentes (processos 2, 3, 4 e 5) define tanto a estrutura como a atividade do biofilme.

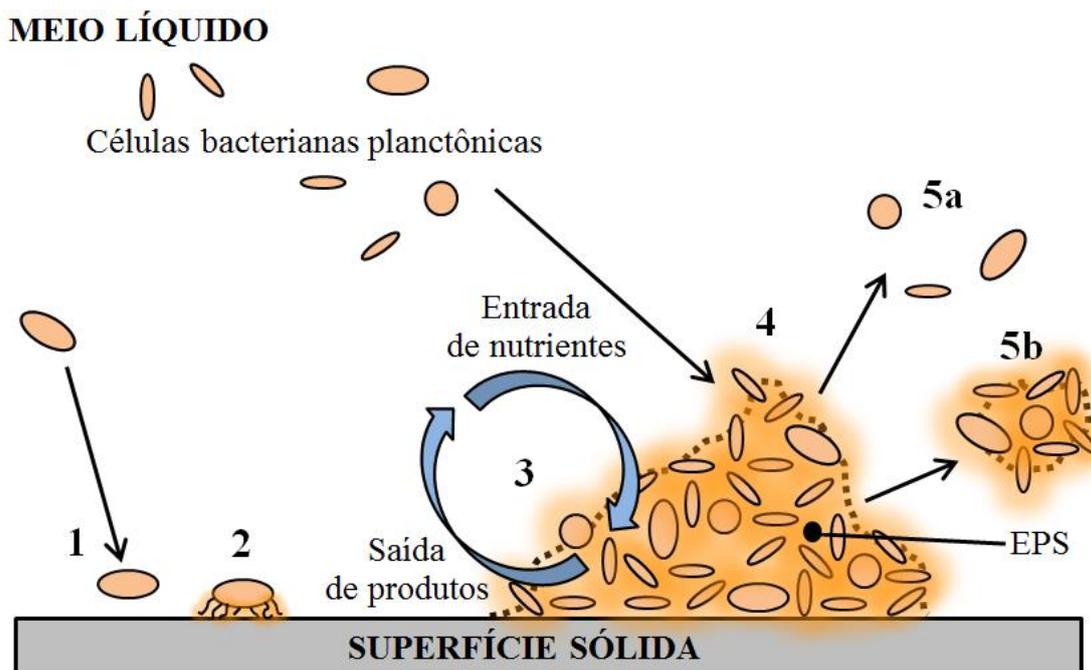


Figura 3 - Esquema dos estágios do desenvolvimento de biofilmes. Adaptado de [29].

1. Adesão reversível: Transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e sua subsequente fixação. Esta adesão é considerada reversível, pois é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico. As principais forças deste evento são as ligações de hidrogênio, Van der Waals e interações eletrostáticas. Os fatores que podem influenciar esse processo são: pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, presença de compostos orgânicos e inorgânicos, autoindutores do QS e temperatura [29; 36; 40; 41];

2. Adesão irreversível: Caracteriza o início da presença de microcolônias (aglomerado de células aderidas entre si e a uma superfície) e da produção de exopolissacarídeos (EPS). A adesão completa ou irreversível ocorre, aproximadamente, 2 h após a adesão inicial. A principal força de ligação célula-superfície é conferida pela matriz tridimensional e insolúvel de EPS através da comunicação célula-célula [40];

3. Início da maturação: Crescimento, divisão e agregação de células fixas, umas às outras, à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS, formando a estrutura do biofilme. Nesta etapa, muitas células alteram os seus processos fisiológicos em resposta às condições nos seus nichos [29; 36];

4. Maturação: Fixação de células microbianas e outras partículas flutuantes, contribuindo para a acumulação de microcolônias. As células dentro da matriz de EPS começam a se multiplicar, emitindo sinais químicos que lhes permite intercomunicar com todas as células microbianas. O biofilme maduro, com alta densidade populacional, é caracterizado por uma arquitetura complexa que inclui canais, poros e ainda uma redistribuição das bactérias por locais afastados do substrato. O aumento da espessura do biofilme fornece estabilidade às comunidades microbianas contra a flutuação do ambiente [29; 40; 41];

5. Dispersão de células: A última etapa do ciclo de um biofilme envolve a liberação de material celular, segundo dois mecanismos: (a) erosão (perda de células individuais) ou (b) descamação (perda de células agregadas). O desprendimento é um fator importante para o desenvolvimento do biofilme, pois parece ser um evento fisiológico regulado. Após a maturação do biofilme, os níveis da matriz de EPS aparentam diminuir, provavelmente devido ao metabolismo, com subsequente liberação de células individuais ou agregadas de um biofilme. A causa no desprendimento de células do biofilme deve estar relacionada ao aumento da concentração de moléculas, responsável pela liberação de enzimas que degradam a matriz polimérica. As células

desprendidas se apresentam móveis e assemelham-se às células planctônicas, podendo disseminar uma contaminação no alimento e uma infecção no hospedeiro, ou formar um novo biofilme na linha de produção [36; 40; 41].

Além dos fatores mencionados durante as etapas de desenvolvimento do biofilme, existe um fator biológico mais complexo, cuja relevância foi constatada pela adaptação dos micro-organismos às mudanças das condições naturais. As mudanças fisiológicas sofridas pelas células dependem da sua capacidade de perceber e responder ao ambiente externo, assim como a de modular a expressão do gene em conformidade [42].

Essa capacidade de adaptação dos biofilmes tem sido considerada uma resposta ao mecanismo de *QS* [39]. Entre 1 - 10% dos genes de bactérias são regulados por esse mecanismo. O mesmo é conseguido através da produção de uma molécula auto-indutora (AI) pelas células bacterianas, que atravessa as células por difusão e acumula-se no ambiente em quantidade proporcional ao crescimento celular, conseguindo ativar os genes e levando em vigor os fenótipos em questão [40]. Por meio deste mecanismo, a bactéria é capaz de detectar a concentração de auto-indutores e, desta maneira, perceber o tamanho da população [39].

Este fator biológico mais complexo não foi considerado neste estudo. Mesmo assim, descrever este mecanismo de comunicação intercelular torna-se indispensável. Tal fator foi considerado irrelevante, devido à ênfase dada ao trabalho de prevenir ou reduzir a adesão primária dos micro-organismos, de modo a impedir ou retardar o desenvolvimento dos biofilmes. Além disso, foram constatados que alguns micro-organismos não necessitam de mecanismos de sinalização intercelular para a formação dos biofilmes [43]. Portanto, a nosso ver, os fatores físicos e biológicos básicos mencionados anteriormente, como adesão e efeito do pH na ligação célula-superfície, são mais importantes e vão ser objeto de uma abordagem mais pormenorizada.

2.1.3. Aspectos físicos, químicos e biológicos na adesão microbiana

A adesão do micro-organismo é um processo complexo regulado por diversas características do meio de crescimento, substrato e superfície da célula. Esta etapa inicial na formação do biofilme pode ser definida como a energia necessária para uma união entre o substrato e a célula, ou seja, o trabalho necessário para removê-la e

retomá-la ao seu estado original [8; 36; 44]. O resultado dessa interação origina o acúmulo de biomassa e materiais extracelulares na superfície de um material [26; 45].

É através da ação da força gravitacional ou pelo movimento do fluido que conduz as partículas orgânicas e inorgânicas, como lipídeos, sais minerais e proteínas, que os biofilmes se estabelecem na superfície do material em meio aquoso. O desenvolvimento do biofilme pode ser retardado ou acelerado, conforme varia a concentração de partículas e sua afinidade com o substrato e as condições hidrodinâmicas do meio. Em fluidos em repouso, geralmente, o micro-organismo desloca por difusão por causa dos movimentos Brownianos (deslocamento médio das partículas de 40 $\mu\text{m}/\text{h}$) ou por causa da mobilidade resultante dos apêndices celulares. Em fluidos em movimento, a aproximação das células à superfície é resultante da convecção, uma vez que a velocidade do transporte convectivo é superior a de difusão [26; 45]. Além disso, as características superficiais do material, como por exemplo, a carga, a tensão e a energia potencial podem ser alteradas favoravelmente após a constituição do biofilme, o que pode facilitar ou dificultar a adesão microbiana [44].

O transporte celular, representado no diagrama da Figura 4, mostra que a adesão inicial entre célula e superfície (50 nm), ocorre como consequência de forças de curto e longo alcance, dando início a um processo reversível ou irreversível. No primeiro caso (processo reversível), o micro-organismo, após se fixar à superfície, continua a exibir movimentos Brownianos, sendo removido graças à ação de forças de tensão, ou então, pelo próprio movimento celular. Neste momento, há também a ação de forças de longo alcance, Van der Waals e eletrostáticas, que fixam a célula à superfície. Contudo, quando o micro-organismo deixa de exibir movimentos Brownianos, a adesão torna-se irreversível, sendo dificilmente removido da superfície [44 - 46]. Tal fato é possível pela adsorção de íons ou ionização de grupos funcionais, uma vez que na superfície celular existem compostos ácidos (ácidos carboxílicos e fosfatos) e básicos (aminas) que reagem com íons OH^- e H_3O^+ presentes na solução. Desta forma, se considera também que a carga superficial dos micro-organismos imersos em meios aquosos, seja um dos fatores mais determinantes durante a etapa de adesão [44].

Este fenômeno é dependente do pH do meio, sendo que em soluções alcalinas, as bactérias possuem uma carga global negativa em consequência de haver um maior número de grupos fosfato e carboxílicos. Contudo, quando o pH não é alcalino, as bactérias podem apresentar uma carga global positiva, por causa da predominância de grupos amina [46].

Neste caso, se a célula microbiana e a superfície apresentarem mesmo sinal e o meio apresentar baixa força iônica, haverá um máximo de energia potencial ou energia de barreira, e um mínimo de energia, designado mínimo primário, que se localiza a uma distância inferior a 15 nm da superfície. A redução da energia de barreira ocorre quando se aumenta a força iônica do meio, em consequência da diminuição da energia potencial da dupla camada elétrica. Quando o meio apresenta valores intermediários de força elétrica, o máximo de energia diminui e aparece um mínimo secundário que se situa entre 10 a 20 nm da superfície e pode ser tanto mais profundo quanto maiores forem às forças atrativas de Van der Waals, e conseqüentemente, quanto maior for o tamanho das partículas. Nestas condições, o máximo de energia é em geral baixo e o seu valor é tanto menor quanto menor for à partícula. Se o máximo de energia for ultrapassado e o mínimo primário for alcançado, a ligação entre a bactéria e o substrato torna-se irreversível. Contudo, se os valores da força iônica do meio forem elevados, a energia potencial de interação será sempre negativa e, conseqüentemente, todas as partículas poderão atingir o mínimo primário. Da mesma maneira, se ambos, micro-organismo quanto substrato, apresentarem cargas de sinal oposto, ou seja, forças eletrostáticas atrativas, o mínimo primário será facilmente atingido, o que resulta em uma adesão forte e irreversível [44 - 46].

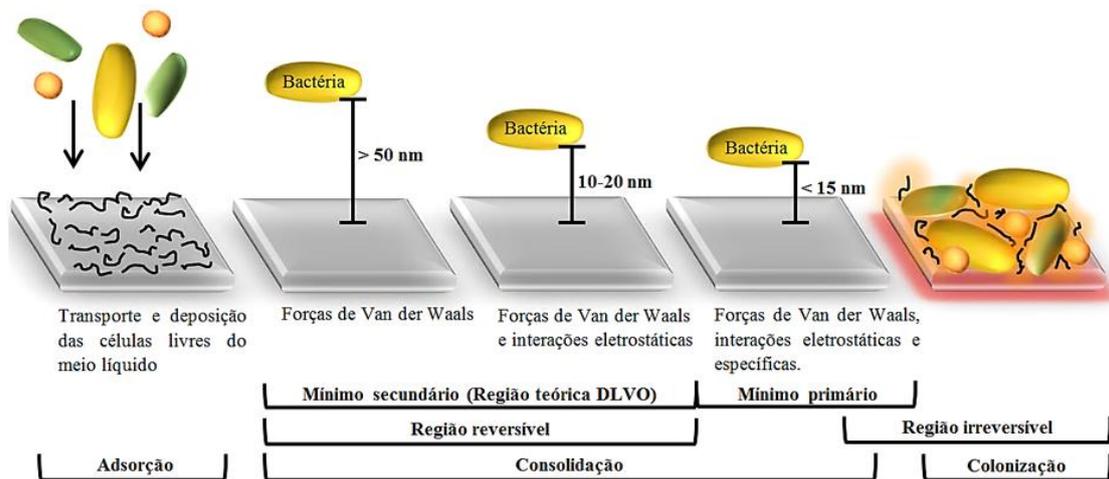


Figura 4 - Representação esquemática das etapas envolvidas na adesão de biofilmes [46].

2.1.4. Importância e impacto dos biofilmes nas atividades humanas

Os biofilmes têm importância em várias atividades humanas. As atividades podem ser classificadas em duas grandes categorias: as desejáveis, conduzindo a

transformações de valor positivo, e as prejudiciais, responsáveis por processos que devem ser evitados, devido as suas consequências negativas que justificam, do ponto de vista prático, o estudo do problema. Se utilizados de maneira controlada, os biofilmes podem ser benéficos, como por exemplo, nas estações de tratamento de efluentes e de água potável que removem organismos patogênicos e reduzem a quantidade de matéria orgânica na água através de interação com os biofilmes [47]. Outros exemplos que podem ser citados são: a indústria de alimentos que utiliza os biofilmes para a produção de fermentados (vinagre, shoyu e ácido acético), aplicações farmacêuticas através da produção de metabólitos secundários [29], processos biológicos para a extração de metais a partir de minério [48] e produção de biopolímeros para usos diversos [29].

O crescimento não desejado de biofilmes, em contrapartida, tem um impacto negativo em várias atividades. Os biofilmes, principalmente patogênicos, causam danos em equipamentos, tubulações e peças metálicas pela corrosão microbiológica [49], contaminação em indústrias de alimentos e em sistemas de água [50], doenças periodontais [51], infecções hospitalares relacionadas à biomateriais e instrumentos cirúrgicos [7; 8], perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência acrescida à transferência de calor e perdas de pressão são alguns dos efeitos adversos da acumulação de biofilmes microbianos [49]. Os diversos problemas relacionados aos biofilmes representam perdas significativas para as indústrias a nível global.

O agravamento econômico gerado pela frequente presença dos biofilmes nas indústrias resulta do acréscimo de despesas com limpeza, manutenção de equipamentos, perda de horas de trabalho, além de problemas no controle de qualidade dos produtos [26]. Não obstante, os biofilmes patogênicos causam infecções e intoxicações, que resultam em taxas expressivas de mortalidade e no aumento dos custos assistenciais, em decorrência de despesas hospitalares com a recuperação da doença. Aproximadamente 25% dessas doenças estão envolvidas a matéria-prima, aos equipamentos e utensílios contaminados, sujeitos, portanto, à formação de processos de adesão microbiana [52].

2.1.5. Estratégias desenvolvidas no controle de biofilmes

Pesquisadores de várias áreas têm estudado os biofilmes, como resultado do seu envolvimento numa larga escala de atividades humanas, tanto para impedir infecções associadas aos biofilmes ou a sua acumulação indesejada em equipamentos industriais,

como para influenciar o desenvolvimento e atividade de um biofilme para uma aplicação bioindustrial particular.

A investigação para a prevenção da formação, controle ou erradicação dos biofilmes, na utilização de materiais com propriedades antimicrobianas, é considerada de grande importância, uma vez que os biofilmes, quando formados, são de difícil remoção e frequentemente resultam em populações persistentes e endêmicas [52; 53]. Existem várias técnicas sendo desenvolvidas para o controle de biofilmes, em função do elevado número de áreas científicas envolvidas. Dentre estes métodos podem ser citados os de microbiologia molecular que utilizam enzimas com o objetivo de degradar a matriz de EPS envolvida na adesão e na integridade estrutural do biofilme [54]; o uso de bacteriófagos que proporciona a ação lítica e tem a capacidade de induzir a síntese de enzimas capazes de degradar polímeros [55]; a utilização de microsensores para o estudo de tapetes de algas [56]; a ação oligodinâmica obtida pela modificação das características da superfície de materiais através de agentes antimicrobianos (sais de amônio quaternário, antibióticos sintéticos, nanopartículas e íons metálicos) [18; 57].

Nesta última técnica, os agentes antimicrobianos implantados, mais especificamente, as nanopartículas ou íons de metais, apontam lograr a prevenção ou o retardamento da adesão microbiana pela liberação ativa desses agentes, o que por sua vez, causa a inibição ou adiamento na formação de biofilmes. Essa liberação continuada ocorre temporariamente durante um período de curto prazo, normalmente de várias horas, até que o agente seja completamente lixiviado pelo meio externo [18; 57]. Infelizmente, a heterogeneidade e complexidade dos componentes que fazem parte da matriz do biofilme, assim como as limitações dos equipamentos para o desenvolvimento desses materiais, são as principais barreiras para que estes métodos se imponham, até o momento, como uma real alternativa com custos aceitáveis.

2.2. Modificação superficial através de processos de feixe de íons

2.2.1. Engenharia de superfícies

A engenharia de superfícies é uma área do conhecimento que estuda os fenômenos que ocorrem na superfície de materiais e em regiões próximas a ela. Trata-se de uma tecnologia que evolui acentuadamente com a modificação de superfícies de componentes de engenharia para cumprir funções específicas dentro de uma aplicação,

em geral sem modificar significativamente as dimensões dos componentes para a aplicação projetada.

A engenharia de superfícies divide-se, basicamente, em duas áreas, uma com formação de interfaces (revestimentos ou filmes), e outra, sem formação de interfaces (modificação superficial), conforme pode ser observado na Figura 5 [58 - 61]. Dentro destas áreas, existem subdivisões para estes dois processos, as quais têm vantagens e desvantagens específicas, uma em relação à outra, para diversas aplicações.

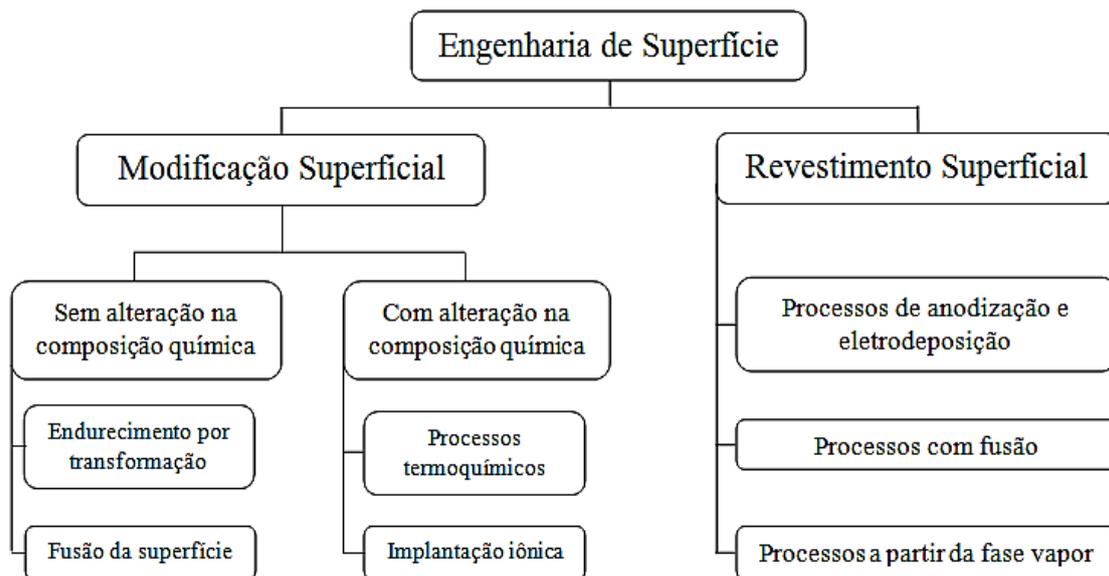


Figura 5 - Esquema da divisão da engenharia de superfícies [59].

2.2.2. Implantação iônica

A implantação iônica é um processo caracterizado pela transferência de massa, por meio do bombardeamento de um material com átomos ou moléculas ionizadas com energia suficiente para penetrar além das camadas superficiais no material alvo [13; 14; 61]. Resumidamente, é um processo em que os íons são gerados por meio da injeção de gás ou evaporação de material sólido dentro de uma fonte aquecida a altas temperaturas. A extração da fonte de alimentação ocorre pela aplicação de um potencial negativo (15 - 40 kV). Durante este percurso, um feixe energético de uma determinada espécie química é formado. Em seguida, os íons pré-acelerados pelo potencial de extração são injetados dentro de um eletroímã. Somente os íons com relação massa/carga desejada serão defletidos no ângulo correto e selecionados por uma fenda. Os íons purificados são então acelerados a uma determinada velocidade através de um potencial uniformemente distribuído dentro de um tubo linear (campo elétrico), direcionados por

lentes eletrostáticas e incididos em uma superfície alvo, como esquematizado na Figura 6 [13 - 16; 20; 62].

Todo o processo descrito acima ocorre em alto vácuo. O feixe de íons é conformado por lentes magnéticas e sua seção transversal possui alguns milímetros de diâmetro. Um sistema de deflexão por campos elétricos permite uma varredura horizontal e vertical do feixe de íons durante a implantação. O fluxo de íons e a sua homogeneidade são monitorados através de copos de Faraday localizados na câmara de implantação.

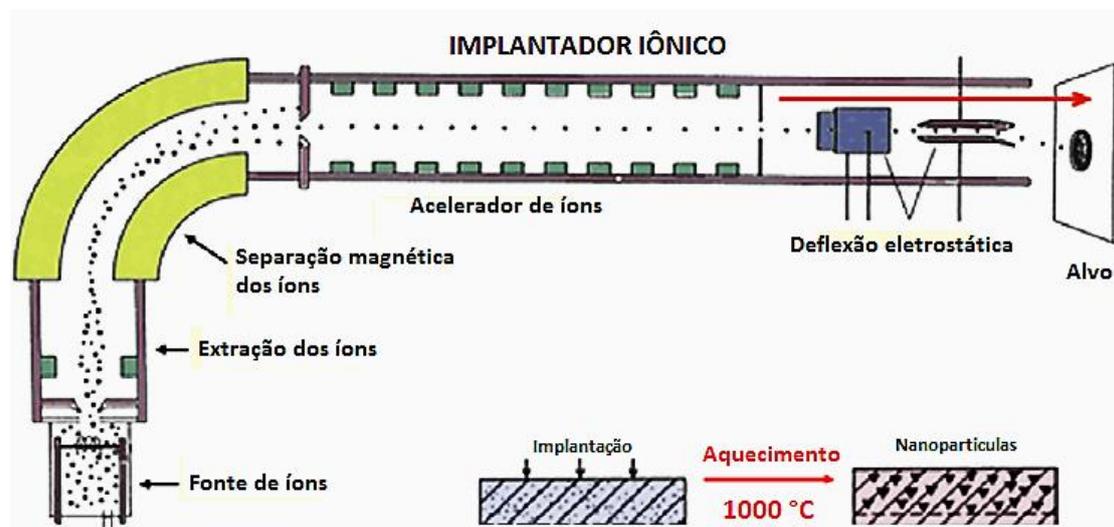


Figura 6 - Esquema de um implantador iônico. Adaptado de [16].

Na implantação iônica convencional, os íons são tipicamente acelerados a energias da ordem de 10 a 500 keV, com penetrações correspondentes que variam de 100 Å a 1 µm, dependendo da estrutura cristalina do material do alvo. Os íons que interagem com o substrato possuem energias cinéticas de 4 a 5 ordens de grandeza maiores do que a energia de ligação do material sólido [16]. Contudo, os íons energizados após penetrarem na superfície do substrato, perdem gradativamente sua energia. Esses íons tendem a se neutralizar e são considerados implantados ao transferirem toda sua energia cinética aos átomos do alvo, de forma a repousarem em sítios intersticiais ou substitucionais da rede cristalina do material [20]. A interação dos íons incidentes na superfície do material alvo pode ser observada na Figura 7.

Os íons, implantados na superfície de interesse, como por exemplo, metais, cerâmicas e polímeros, formam novas ligações químicas, o que resulta em uma nova região, com modificações físicas e químicas distintas. As novas ligações químicas

formadas são consequência das colisões múltiplas dos íons com os elétrons e núcleos dos átomos da estrutura do alvo.

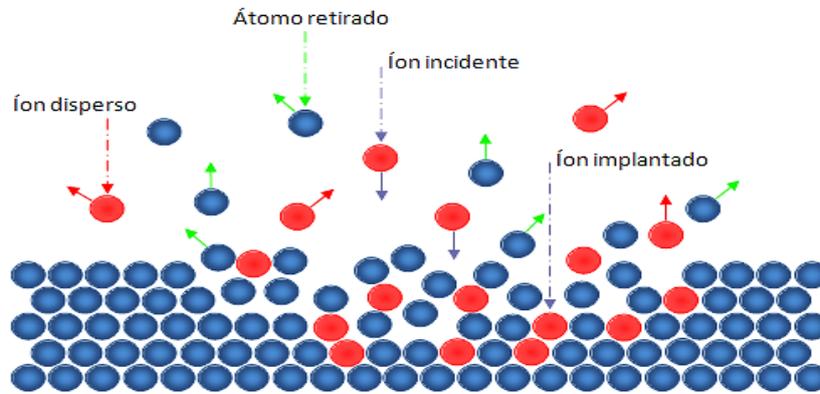


Figura 7 – Interações dos íons incidentes com a superfície do material alvo [62].

A implantação iônica é uma técnica promissora, pois apresenta características relevantes como confiabilidade e reprodutibilidade. A espécie, energia, dose e densidade da corrente do feixe de íons são os principais parâmetros do processo. Entretanto, é ainda considerado um processo de elevado custo, devido ao preço do equipamento, e o período de implantação é longo. As vantagens e desvantagens desse processo, em relação a outras técnicas de modificação de superfície, estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Vantagens e desvantagens da técnica de implantação iônica.

Vantagens	Desvantagens
<p>Não há restrições termodinâmicas, tais como a exigência de uma temperatura elevada para difusão ou iniciação de uma reação química;</p> <p>Independente de limites de temperatura e solubilidade;</p> <p>Não requer nenhum acabamento ou tratamento térmico da peça após a modificação superficial;</p> <p>O processo é rigorosamente controlado e monitorado.</p>	<p>Os implantadores iônicos convencionais requerem altas energias para acelerar os íons (energia mínima de 30 keV);</p> <p>A área superficial modificada e a complexidade da peça são bastante restritas;</p> <p>O tempo de processo é elevado (em torno de 20 h).</p>

A aplicação mais comum para a implantação iônica é direcionada ao processo químico de *doping* (adição de íons) de semicondutores, especialmente do silício. A dopagem controlada de dispositivos eletrônicos ou de semicondutores é feita pela

introdução de perfis precisos de impurezas como B⁺, P⁺ e As⁺ [13; 61]. Recentemente, esta técnica também é utilizada na modificação de superfícies de biomateriais [21]. Neste caso, são utilizadas impurezas que melhoram a biocompatibilidade e que possuam propriedades antimicrobianas como Ag⁺, Cu²⁺, Au⁺ e Zn²⁺. A Tabela 4 apresenta os estágios de desenvolvimento da técnica de implantação iônica ao longo do tempo.

Tabela 4 – Desenvolvimento da técnica de implantação iônica em modificar biomateriais [62].

Ano	Desenvolvimento
1906	Física e princípios de implantação de íons foram postulados.
1930	Desenvolvimento de fontes de íons de baixa energia.
1940	Originário da fonte de íons (os íons de luz foram acelerados).
1960	Grandes esforços para estudar os efeitos da implantação de dopantes em semicondutores.
1970	Estudo das propriedades superficiais de metais pela implantação de íons.
1980	Estabelecida na indústria microeletrônica e início das explorações na indústria biomédica.
1990 e 2000	Aplicação de implantes biomédicos em dispositivos odontológicos e ortopédicos.

2.2.3. Ion plating

O *Ion Plating*, também chamado de *Ion Assisted Deposition* (IAD) ou *Ion Vapor Deposition* (IVD), é um termo genérico aplicado a processos de Deposição Física de Vapor (do inglês *Physical Vapor Deposition* - PVD). Este método físico submete o substrato a um bombardeamento, contínuo ou periódico, de um fluxo de partículas energizadas que possuem tamanho suficiente para causar alterações nas propriedades do substrato, tais como a densidade e a tensão residual do filme depositado [63]. A energia, o fluxo e a massa das espécies bombardeadas juntamente com a taxa de bombardeamento das partículas são importantes variáveis no processo de deposição das partículas.

O material a ser depositado pode ser vaporizado tanto pelo processo de evaporação (*sputtering*) ou por decomposição de vapor químico. As partículas energizadas utilizadas para o bombardeamento são, em geral, íons de gás inerte. Como a técnica é feita em ambiente de plasma, estes íons para o bombardeamento são retirados do próprio plasma. Quando o *Ion Plating* é realizado em ambiente contendo apenas vácuo, os íons do bombardeamento são formados separadamente, em um canhão de

elétrons. As vantagens e desvantagens na utilização de um equipamento do tipo *Ion Plating* estão listadas na Tabela 5 [63 - 66].

Tabela 5 – Vantagens e desvantagens de um equipamento do tipo *Ion Plating*.

Vantagens	Desvantagens
Excelente capacidade de cobertura de superfície, em condições apropriadas; Técnica limpa - alta pureza; As primeiras monocamadas do material ficam muito quentes, o que acelera a reação de nucleação e difusão; Flexibilidade na adaptação das propriedades do filme durante o bombardeio.	Existem muitos parâmetros de processamento para serem controlados; O aquecimento no substrato pode ser excessivo; Dificuldade de disponibilidade das espécies reativas e de bombardeamento uniforme sobre uma superfície complexa.

2.2.4. Implantação iônica a baixa energia por *Ion Plating Diversified* (IPD)

A implantação iônica a baixa energia pela funcionalização do *Ion Plating* é vista como uma novidade na área de engenharia de superfícies. Esta técnica se baseia na junção dos processos de implantação iônica e *ion plating*, e foi desenvolvida para este trabalho com o intuito de obter as propriedades antimicrobianas em materiais metálicos pela modificação em regiões próximas da superfície.

Este método, em comparação com a implantação iônica convencional, tem vantagens como alto grau de ionização, baixas energias de polarização (< 4 keV) na etapa de aceleração dos íons, redução no tempo de processo (menos do que 1 h) e aumento da área superficial do material a ser modificado (cerca de 200 cm²), sendo esta variada de acordo com a disponibilidade do reator. A versatilidade deste equipamento permite que o processo seja realizado em escala industrial sem restrições [13; 66].

O equipamento utiliza um potencial de corrente contínua sobre o porta-amostra para acelerar os íons em direção à superfície do substrato. O potencial aplicado faz com que o bombardeamento seja relativamente uniforme ao longo de superfícies planas, onde as linhas de campo são equipotenciais conformada à superfície. Contudo, para estabelecer um potencial negativo de alta tensão (BIAS) é necessário se trabalhar em pressões muito baixas da ordem de 10⁻⁶ mbar, onde a densidade de gás do ambiente é reduzida e o percurso de livre caminho médio é mais longo. O alto vácuo atingido permite maior pureza para as implantações iônicas, estabilidade do plasma e reprodutibilidade.

Como o processo de implantação compreende certa complexidade, foi utilizado um esquema das principais etapas que levam a modificação superficial, a fim de auxiliar os leitores (Figura 8).

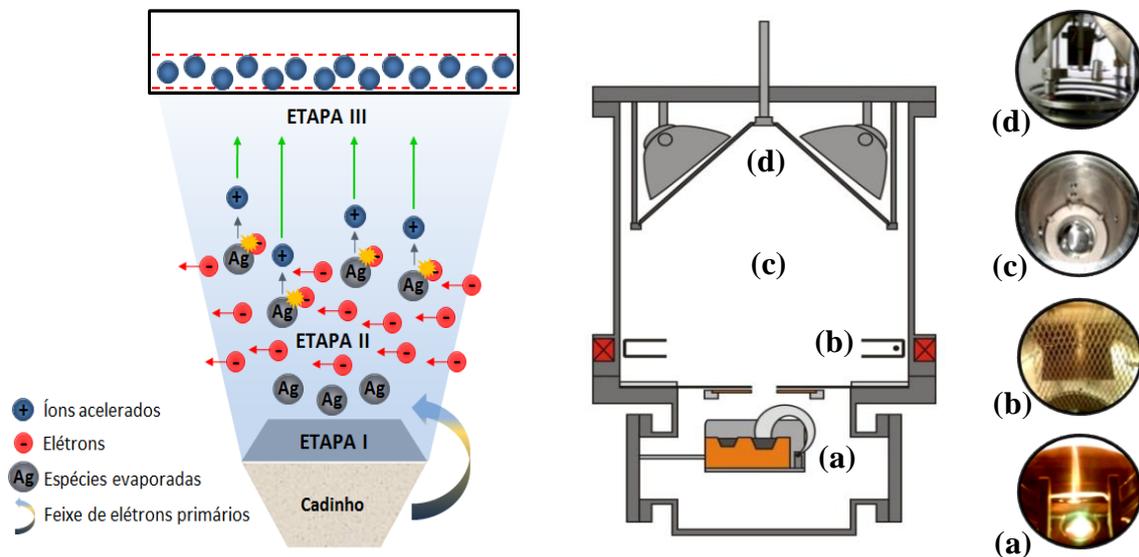


Figura 8 - Principais etapas e componentes do processo de implantação iônica a baixas energias por IPD (a) canhão de elétrons; (b) ionizador; (c) câmara de implantação e (d) porta-amostra polarizado com alta tensão (BIAS) de - 4 keV.

Etapa I - Efeito termiônico e deflexão dos elétrons: Aplicando alta corrente e tensão na fonte do canhão de elétrons, aquece-se o filamento de tungstênio-boro (cátodo), e como consequência, os elétrons livres recebem a energia requerida para conduzirem e difundirem para fora do metal. A emissão dos elétrons do filamento é denominada de efeito termiônico. Esse feixe de elétrons sai pela abertura do ânodo e, em seguida, sofre deflexão ao atravessar as linhas de campo magnético de bobinas que impulsionam os elétrons primários em direção ao centro do cadinho (recipiente que comporta o material a ser implantado). A energia gerada na colisão é suficiente para ocasionar a evaporação do material (Figura 9).

Etapa II - Efeito de ionização e excitação: Um feixe secundário de elétrons é gerado e direcionado para induzir a formação de íons metálicos (Figura 10). Os elétrons no seu percurso na câmara de vácuo sofrem colisões com os átomos de gás residual ou átomos do material vaporizados. No choque, os elétrons são eliminados das órbitas eletrônicas externas e os átomos são, portanto, convertidos em íons carregados positivamente.

Etapa III - Efeito de aceleração dos íons: A última etapa do processo é o efeito de aceleração dos íons produzidos em direção ao material alvo polarizado com BIAS de

- 4 kV. A atração dos íons ocorre devido à diferença de potencial (ddp) que é aplicada. No interior do substrato, o percurso dos íons é turbulento devido às sucessivas colisões com os átomos do alvo. A energia cinética dissipada por íons pesados, como a prata, na colisão com o substrato é tão elevada que o caminho percorrido é reduzido (Figura 11). Os íons são neutralizados, de maneira a repousarem em sítios intersticiais ou substitucionais da rede cristalina do material.

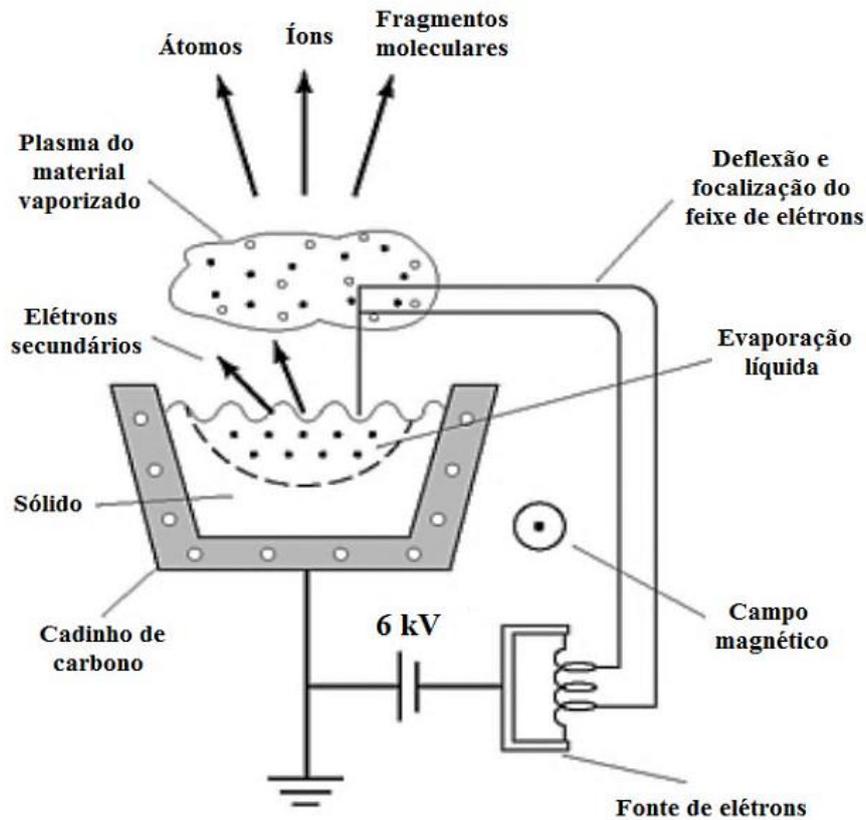


Figura 9 - Esquema da deflexão dos elétrons primários em direção ao centro do cadinho e a evaporação do material de interesse.

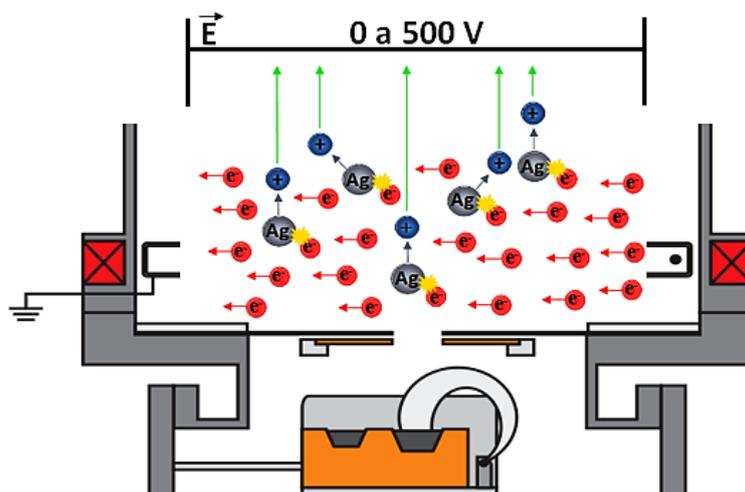


Figura 10 - Esquema do feixe de elétrons induzindo a formação dos íons.

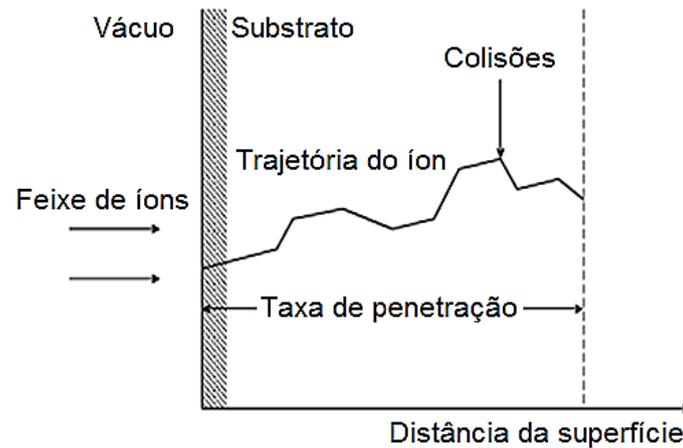


Figura 11 - Representação da trajetória de penetração de íons pesados (efeito cascata).

2.3. Prata ionizada como agente antimicrobiano

As propriedades antimicrobianas da prata e de seus compostos são historicamente reconhecidas pela eficácia contra um amplo espectro de microorganismos. Desde a antiguidade, povos de diferentes culturas tinham como costume armazenar água, vinho e vinagre em recipientes de prata para evitar a deterioração. Hipócrates que é considerado o pai da medicina ocidental, registrou num manuscrito que a prata tinha propriedades benéficas contra algumas doenças. Avicena, em 980, usava e prescrevia a prata como um purificador do sangue para palpitações do coração e para a respiração ofegante. Sais de prata, também eram usados terapêuticamente pela escola de medicina Mohammedian, no século VII. Em 1884, tornou-se comum administrar gotas de nitrato de prata aquoso nos olhos de recém-nascidos para evitar a transmissão de *Neisseria gonorrhoeae*. Durante a 1ª Guerra Mundial, os compostos de prata foram usados para prevenir infecções e no tratamento de queimaduras graves, antes do advento de antibióticos [67 - 69].

Uma vez que começaram a se usar antibióticos, o consumo da prata para aplicação medicinal reduziu drasticamente. No entanto, o aparecimento de estirpes resistentes aos antibióticos provocou, recentemente, um interesse renovado na utilização de vários íons metálicos e de seus compostos como agentes antimicrobianos [6; 21]. As características antimicrobianas de vários íons de metais pesados, principalmente Ag^+ , foram reconhecidas na área científica por indústrias têxteis, farmacêuticas e hospitalares, e nomeadas de efeito oligodinâmico [6; 21].

Nas últimas décadas, apesar da resistência da ação antimicrobiana dos íons de prata ser bem conhecida e sucedida, seu mecanismo de ação permanece ainda

parcialmente elucidado. De acordo com a literatura, a atividade antibactericida da prata depende da forma sob a qual ela é aplicada. A prata metálica ou na sua forma não ionizada é parcialmente inerte. O efeito de toxicidade da prata em micro-organismos ocorre quando a mesma encontra-se em seu estado ionizado, mesmo em concentrações relativamente baixas da ordem 10^{17} átomos/cm² [68].

A ação oligodinâmica é totalmente desenvolvida, muitas vezes, somente depois de um longo período de tempo (várias horas) [69]. A energia de ativação da prata é baixa, até mesmo o contato com a umidade ou com o fluido corpóreo conduz à liberação de Ag⁺ [6; 68]. O amplo espectro do efeito antibacteriano, incluindo espécies multirresistentes e fungos, como representado na Figura 12, assim como a baixa toxicidade as células humanas, justificam o grande interesse no emprego dos íons Ag⁺ em materiais e produtos para cuidados com a saúde [17].

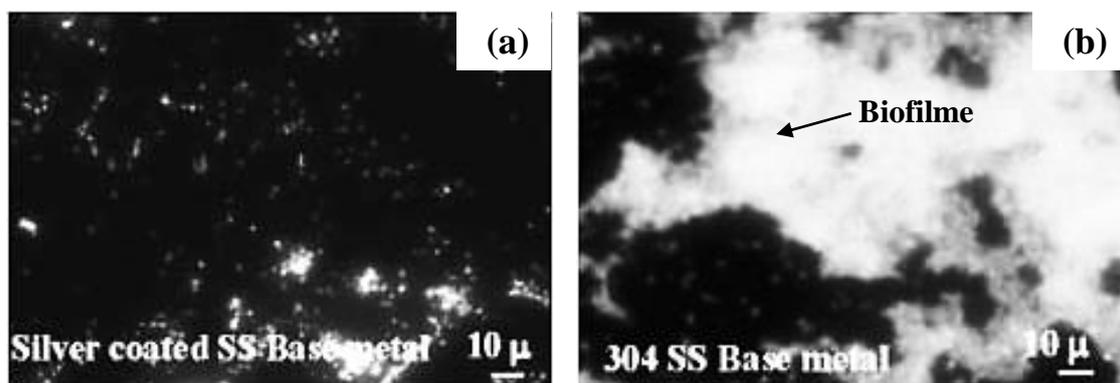


Figura 12 – Redução de biofilme de *Pseudomonas fluorescens* (24 h) na presença e ausência de prata [17].

2.3.1. Mecanismos de ação dos íons de prata

Embora as propriedades antimicrobianas da prata sejam conhecidas há séculos, só recentemente, com a observação direta das alterações morfológicas e estruturais causadas pela liberação de Ag⁺ é que os pesquisadores começaram a compreender os mecanismos de ação da prata sobre os micro-organismos formadores de biofilmes (Figura 13).

Atualmente, existe uma série de teorias que estão sendo consideradas, dentre as quais podem ser destacadas a oxidação catalítica de radicais na superfície celular inibindo a transferência de oxigênio, a reação com radicais presentes na superfície das bactérias interferindo no transporte eletrônico e a associação com o DNA. Porém, ainda nenhuma destas hipóteses explica as funções antivirais [3; 4].

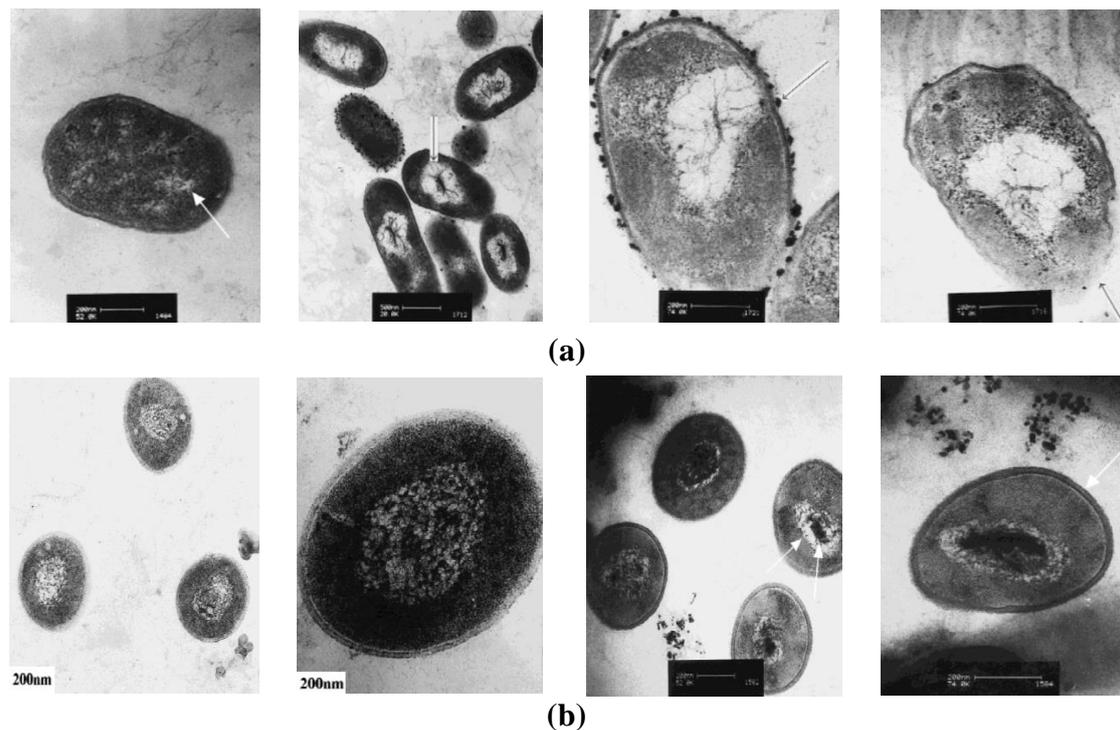


Figura 13 - Estudo da interação dos íons Ag^+ com as células de (a) *E. coli* e (b) *S. aureus*. As imagens foram obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão. O tratamento resultou na formação de grânulos de prata, danos na membrana da parede celular e condensação do DNA [4].

Uma delas está relacionada à desnaturação das enzimas, como representado na Figura 14. As bactérias possuem uma enorme quantidade de enzimas, que são principalmente proteínas vitais para as atividades celulares. As proteínas, responsáveis pelo transporte de nutrientes, contêm grupos tióis (-SH) na superfície da parede celular que se unem aos aminoácidos através de ligações dissulfeto (R-SS-R). Esses grupos tióis expostos, podem ser afetados pelos íons Ag^+ , causando mudanças estruturais na parede celular das proteínas. Nas reações de redução/oxidação catalítica, os íons Ag^+ substituem o cátion H^+ dos grupos tiol ou sulfidrílica, estabilizando a prata (S-Ag). Dessa catálise, água é liberada como produto. A formação de prata catalisada por ligações dissulfeto, possivelmente, conduz a danos na permeabilidade da membrana da proteína e a inativação de enzimas essenciais, tais como as necessárias para a respiração celular [3; 70; 71].

Outra hipótese sugerida é a interação dos íons Ag^+ com os ácidos nucleicos das células bacterianas. É possível que os íons Ag^+ acessem o interior das células através de proteínas transmembranas que normalmente funcionam como transportadoras de outras partículas semelhantes. Ao serem transportados, os íons atravessam a membrana hidrofóbica celular e penetram no citoplasma, levando à desintegração da célula [4; 70; 71].

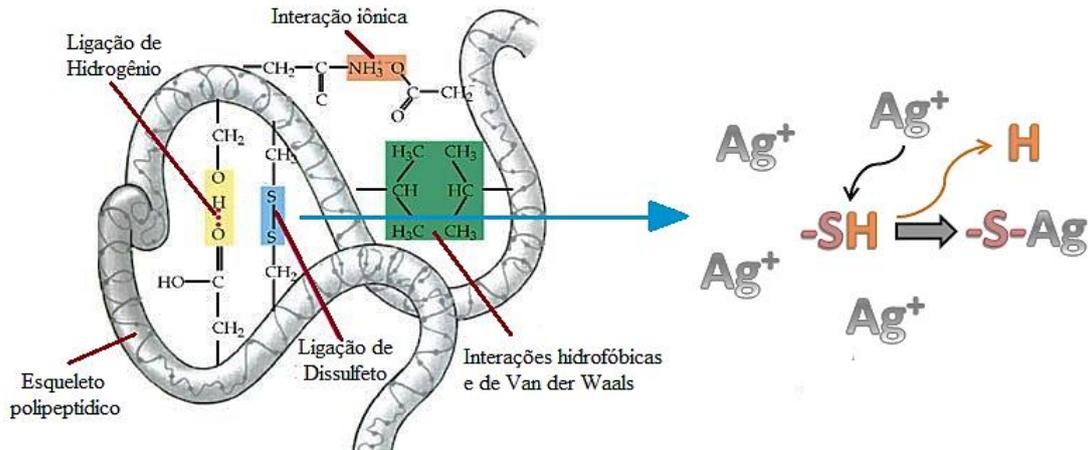


Figura 14 - Representação da ligação dissulfeto na molécula da proteína e o rompimento dessa ligação pelos íons Ag^+ . Adaptado de [71].

Além disso, outro possível mecanismo é o da associação com o DNA. Após os íons Ag^+ penetrarem na célula, os mesmos rompem as ligações de hidrogênio dos pares de bases do DNA entre a purina (adenina e guanina) e a pirimidina (timina e citosina), causando a desnaturação da molécula (Figura 15) [3; 70].

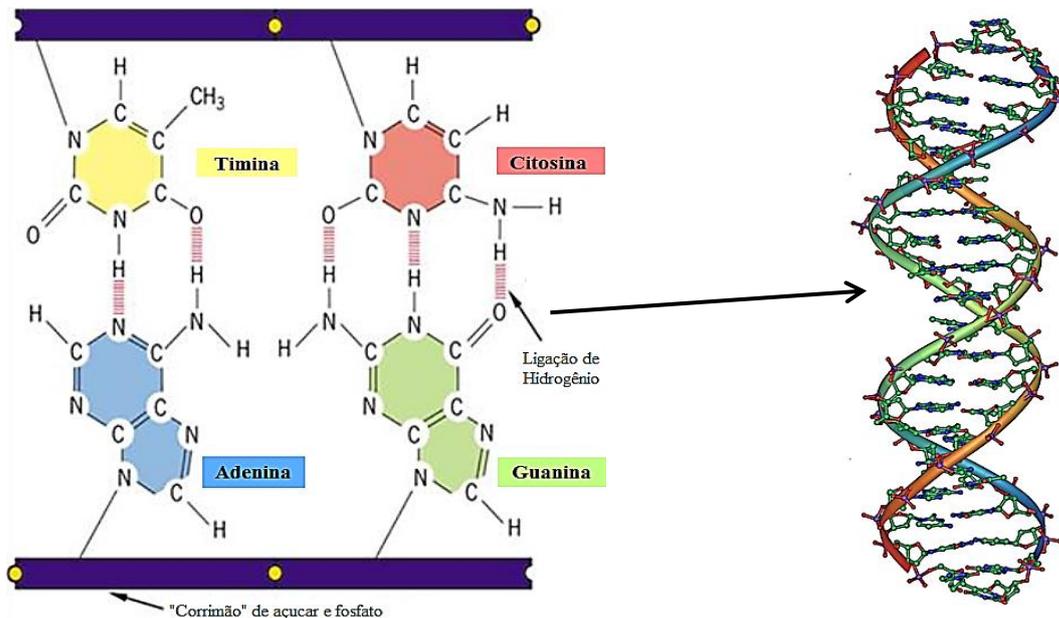


Figura 15 - Esquema representativo das ligações entre as bases purinas e pirimidinas da molécula de DNA. Adaptado de [71].

2.4. Técnicas de caracterização

2.4.1. Stopping and Range of Ions in Matter - SRIM

O SRIM 2013 é um software gratuito que simula a interação de um feixe de íons de um elemento com os átomos do elemento do alvo. Desde sua introdução em 1985, as

principais atualizações são feitas a cada cinco anos, embora todo ano sejam feitos ajustes de pouco impacto. Atualmente, mais de 700 citações científicas referem-se ao SRIM. A simulação é baseada nas aproximações da trajetória, das perdas de energia e do perfil de concentração/profundidade dos íons implantados através do método de Monte Carlo [61; 72].

Este programa de computador calcula a energia transferida nas colisões entre os íons do feixe com os átomos da amostra e utiliza aproximações físicas para obter um resultado preciso com eficiência computacional [72].

O processo de espalhamento dessas interações é o que controla o resultado final das informações obtidas. A probabilidade de ocorrência de espalhamentos elásticos e inelásticos provenientes das interações de seus elétrons é deliberada pelo ângulo de espalhamento e transferência de energia [73].

2.4.2. Espectrometria de retro-espalhamento Rutherford (RBS)

Esta técnica de análise por feixe de íons (*Ion Beam Analysis - IBA*), conhecida como RBS (*Rutherford Backscattering Spectrometry*), consiste na incidência sobre a amostra, de um feixe monoenergético de íons de alta energia, geralmente He^+ , com energia entre 1 e 3 MeV. Alguns destes íons sofrem colisão com o núcleo dos átomos da amostra e são retroespalhados, tornando possível a sua detecção e a determinação de sua energia (Figura 16) [74]. As medidas são baseadas no conhecimento da secção de choque de Rutherford e a partir do espectro de energia das partículas retroespalhadas detectadas obtém-se a composição elementar do material analisado, bem como a quantidade de átomos presentes [75], a partir do conhecimento de sua densidade nominal.

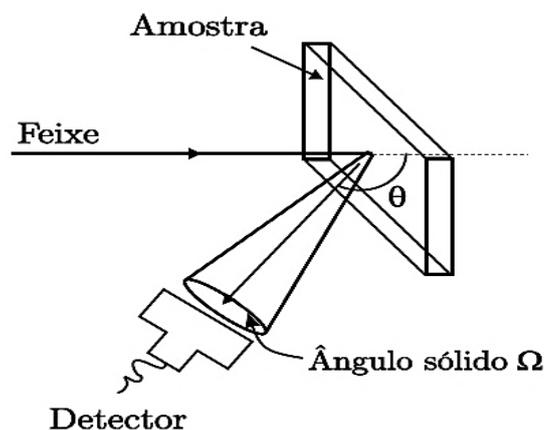


Figura 16 - Esquema experimental de uma análise por RBS [74].

O fator cinemático (K) é uma grandeza importante para a técnica de RBS, que é utilizado na análise elementar qualitativa e que depende da energia após o espalhamento (E) e da energia inicial (E_0). A energia de partículas retroespalhadas a um dado ângulo depende de dois processos: a perda de energia da partícula devido à transferência de momentum para o átomo alvo durante o evento de retroespalhamento (descrito por K) e a perda de energia pela partícula durante a passagem através da amostra sólida (ambos antes e depois do espalhamento). A Figura 17 mostra os eventos do retroespalhamento que ocorrem na superfície da amostra e em uma profundidade d na amostra. Para o espalhamento na superfície da amostra, a perda de energia só é dada pela transferência de momento para o átomo do alvo [75; 76].

A expressão do fator K em função dos parâmetros envolvidos na colisão é:

$$K = \frac{E}{E_0} = \left[\frac{M_1 \cos \theta + (M_2^2 - M_1^2 \sin^2 \theta)^{1/2}}{M_1 + M_2} \right]^2 \quad (1)$$

Onde:

M_1 – Massa atômica da partícula incidente;

M_2 – Massa atômica da partícula do alvo;

θ – Ângulo da trajetória da partícula antes e depois do espalhamento.

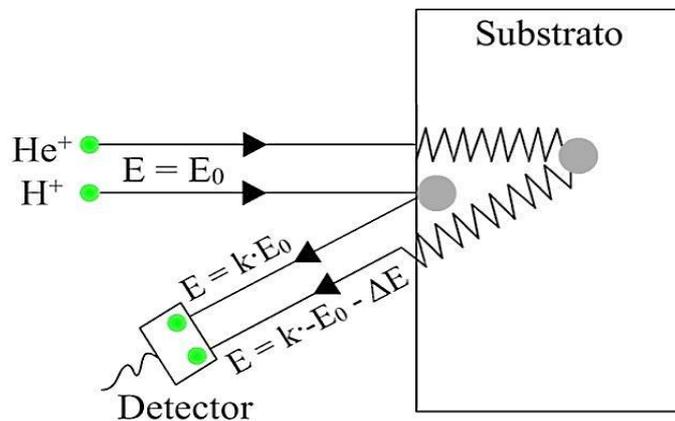


Figura 17 - Representação dos processos de perda de energia por retroespalhamento, a partir da superfície e em profundidade na amostra. Adaptado [76].

A quantificação do espectro de RBS, embora possa ser feito de forma absoluta, geralmente é realizada pela comparação das áreas dos picos de um padrão e da amostra que está sendo medida. Usualmente, utiliza-se um padrão de bismuto (Bi) implantado em silício, com uma quantidade conhecida de átomos de Bi . Com a quantidade de átomos por centímetro quadrado e com a densidade do material que está sendo

analisado, consegue-se estimar a espessura do filme fino depositado [76]. A quantidade de átomos do material que se deseja conhecer é dada, então pela equação:

$$Q_A = Q_{Bi} \cdot \frac{A_A}{N_A} \cdot \frac{N_{Bi}}{A_{Bi}} \cdot \frac{Z_{Bi}^2}{Z_A^2} \quad (2)$$

Onde:

Q – Quantidade de átomos/cm² do elemento;

A – Área abaixo do sinal correspondente no espectro medido;

N – Número total de íons incidentes;

Z – Número atômico.

2.4.3. Espectroscopia de emissão ótica por descarga luminescente (GD-OES)

A análise de espectroscopia de emissão ótica por descarga luminescente, frequentemente denominada por GD-OES (do inglês *Glow-Discharge Optical Emission Spectroscopy*) é uma técnica consagrada que permite a análise elementar qualitativa e quantitativa por profundidade de sólidos homogêneos [77]. Nesta técnica, a amostra a ser analisada (cátodo) é inserida por sucção a vácuo no extremo inferior de uma câmara oca (ânodo), como representado na Figura 18. Os dois eletrodos servem como fonte de descarga para o aparelho. Na maioria dos casos, é inserido no interior da cavidade gás de argônio (Ar) para garantir uma atmosfera limpa durante o processo de análise. Em seguida, uma descarga de potência-RF (radiofrequência), geralmente inferior a 30 W é fornecida diretamente sobre a amostra.

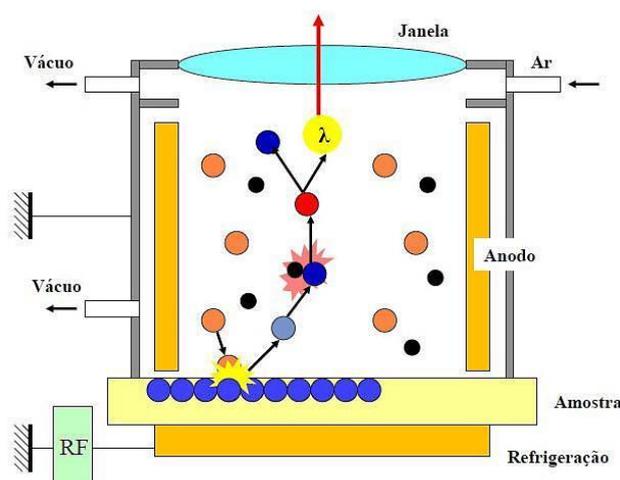


Figura 18 - Princípio de funcionamento do equipamento GD-OES [79].

A energia fornecida gera um plasma com íons positivos de argônio e elétrons livres. O plasma é alimentado através da amostra que atua como o cátodo. A diferença de potencial (ddp) entre o ânodo e o cátodo faz com que os íons de argônio sejam acelerados para a amostra. Os íons bombardeiam a superfície da amostra com uma energia cinética média de 100 eV, causando uma erosão na superfície da mesma. Este bombardeamento cria um processo de remoção, camada por camada, dos átomos superficiais da estrutura da amostra, conhecido como *sputtering*. Além dos átomos, alguns elétrons livres chamados elétrons secundários, são gerados durante este processo. Os elétrons secundários são responsáveis pela sustentação do plasma. Os átomos removidos da amostra são difundidos para o plasma, e podem ser excitados ou ionizados através de colisões com elétrons livres e íons de argônio.

Os átomos excitados posteriormente reestabelecem o estado energético de equilíbrio pela emissão de fótons característicos. Os fótons são analisados através de um espectrômetro óptico, onde é realizada a medida das intensidades das linhas emitidas [77 - 79]. De fato, estes átomos, depois de deixarem a estrutura da amostra desde a superfície, são diluídos na atmosfera de plasma de argônio, e posteriormente, excitados como átomos individuais. É esta separação catódica e excitação que permite que as análises de GD-OES realizem uma quantificação de perfis de profundidade multi-elementar de diferentes materiais e revestimentos.

O perfil das análises ocorre pela captação da assinatura ótica através da medição da intensidade das emissões durante a descarga de energia referente a colisões, gerando o fóton característico do elemento (Figura 19). A fonte de excitação do material analisado emite luz: cada material tem uma assinatura ótica específica [79]. Um comparativo para análise do perfil de profundidade por GD-OES, SIMS e XPS é mostrado resumidamente na Tabela 6.

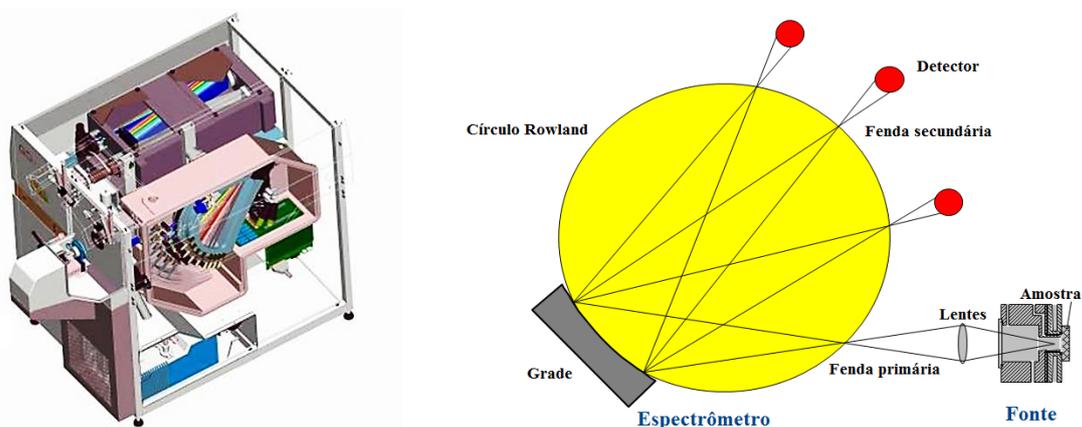


Figura 19 - Esquema de captação da assinatura ótica característica de cada elemento. Adaptado de [79].

A área analisada em GD-OES é relativamente grande, tipicamente 4 mm de diâmetro, mas pode ser aplicado a profundidade de perfil até cerca de 100 μm . A resolução em perfil de profundidade por estas técnicas analíticas é praticamente dominada pela rugosidade da superfície da amostra. Uma vantagem do GD-OES é o curto tempo de medição, que é a razão pela qual este método é adequado para a análise de materiais na indústria. Além disso, este método utiliza uma fonte de alimentação RF como fonte de descarga luminescente; portanto, o material a ser analisado pode não ser condutor [80].

Tabela 6 – Comparativo das análises de perfil de profundidade GD-OES, SIMS e XPS. Adaptado de [80].

Método	Profundidade analisada	Área analisada	Tempo aproximado de medição
GD-OES	1 nm – 1 μm	2 mm ² – 10 mm ²	10 s para 1 μm
SIMS ¹	1 nm – 10 μm	1 μm^2 – 100 μm^2	100 s para 1 μm
XPS ²	1 nm – 1 μm	10 μm^2 – 1 mm ²	1000 s para 1 μm

¹ Espectrometria de Massa de Íon Secundário (SIMS – *Secondary Ion Mass Spectrometry*).

² Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS – *X ray Photoelectron Spectroscopy*).

2.4.4. Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

O MEV ou SEM (do inglês *Scanning Electron Microscopy*) é um equipamento capaz de fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e microestrutura de uma amostra sólida. Seu princípio de funcionamento consiste em utilizar um feixe de elétrons de pequeno diâmetro, capaz de explorar a superfície da amostra, ponto a ponto, por linhas sucessivas, transmitindo o sinal do detector a uma tela catódica. A Figura 20 mostra uma imagem típica de microscopia eletrônica de varredura de bactérias.

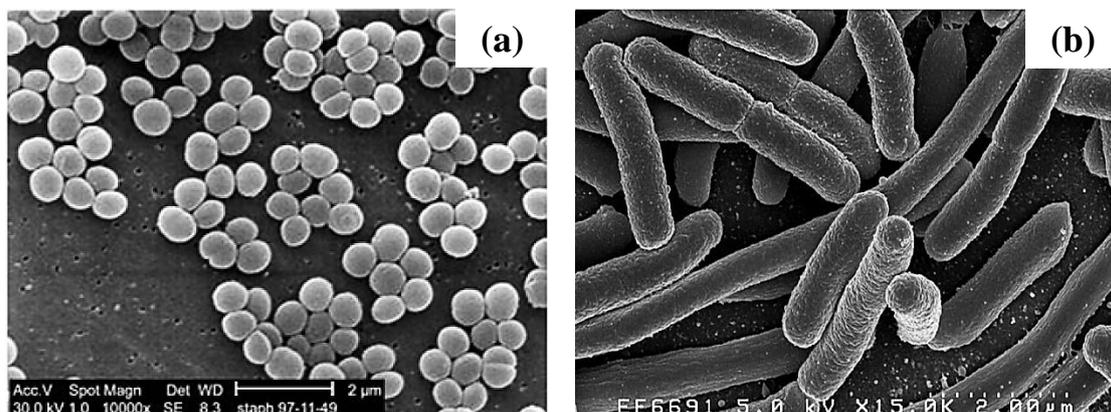


Figura 20 – Imagem de MEV das bactérias (a) *Staphylococcus aureus* e (b) *Escherichia coli* [81].

Nesta técnica, os elétrons são gerados através de um filamento que está aquecido em alto vácuo. Em seguida, estes elétrons são acelerados e incidem em um ponto da amostra, varrendo a superfície da mesma. O feixe interage com a amostra e gera sinais como: retroespalhamento dos elétrons, elétrons secundários ou emissão de fótons, e raios X característicos. Tanto os elétrons retro-espalhados, quanto os elétrons secundários, são usados para modular o brilho, gerando uma imagem da amostra, que é produzida através da variação de intensidade dos elétrons secundários ou retroespalhados emitidos pela amostra [81].

A imagem formada a partir do sinal capturado na varredura de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido, de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra. Dentre os diferentes sinais emitidos pela amostra, os mais utilizados para a obtenção de imagens são originários dos elétrons secundários e/ou dos elétrons retroespalhados. O MEV fornece imagens de até 300.000 vezes, possibilitando uma análise mais detalhada que a microscopia ótica dos compostos e das fases formadas no material [81].

2.4.5. Espectrofotometria de ultravioleta-visível

A espectrofotometria é uma técnica analítica, regida pela Lei de Lambert-Beer, que mede a absorção de energia radiante (luz) de uma solução, em função do comprimento de onda, na região do ultravioleta (UV) e visível (Vis). A região do ultravioleta é geralmente considerada na faixa de 200 a 400 nm, e a região do visível entre 400 a 750 nm. Nesta técnica, a radiação caracterizada pelos diversos comprimentos de onda é entendida como uma forma de energia que exibe a propriedade de interagir com a matéria. Parte desta energia é absorvida por elétrons cromóforos de uma solução. Esta absorção, em cada comprimento de onda, depende da natureza da substância, de sua concentração e da espessura que é atravessada pela radiação [82].

A espectrofotometria UV/Vis é utilizada em aplicações, como ensaio de pureza, a quantificação de DNA e RNA, e em medições na faixa do visível como ensaios colorimétricos diretos, testes cinéticos de enzimas e análises espectrais.

3. Materiais e métodos

Este capítulo apresenta uma descrição dos materiais e métodos utilizados durante a execução do presente trabalho. O capítulo inclui a preparação das amostras, o processo de modificação superficial, os ensaios biológicos e as técnicas de caracterização realizadas para a avaliação superficial e biológica.

3.1. Preparação das amostras

O material utilizado neste trabalho foi o aço inoxidável austenítico AISI 304 recozido e laminado a frio da empresa Minas Inox (Belo Horizonte - MG), com dimensões iniciais de 50 m x 100 mm x 0,05 mm. A composição química do aço inoxidável está de acordo com as especificações estabelecidas pela norma ASTM A240 [83] (Tabela 7). O acabamento superficial realizado pelo fabricante exibiu uma superfície polida, lisa e brilhante.

Tabela 7 – Mostra os valores estabelecidos pela norma ASTM A-204 e a composição do AISI 304, para fins de comparação.

Elemento (% p)	ASTM A-204 (USN 30400)	Aço inoxidável AISI 304
C	0,07	0,07
Mn	2,00	2,00
Si	0,75	1,00
P	0,045 máx.	0,045
S	0,030 máx.	0,030
Cr	17,50/19,50	19,00
Ni	8,00/10,5	9,5
N	0,10	0,10

Na preparação das amostras, as placas finas de aço inoxidável foram inicialmente cortadas na forma de quadrados de 20 x 20 mm. A limpeza foi feita por imersão em acetona P.A. em banho de ultrassom durante 30 min. Após esta etapa, as amostras foram secadas e submetidas ao tratamento de modificação superficial. Encerrado o processo, as amostras foram cortadas em quatro pedaços de 10 x 10 mm, como mostra a Figura 21. Estes cortes foram realizados com muito cuidado, de maneira a evitar rebarbas ou deformações e para não danificar a superfície das placas tratadas. Finalmente, as amostras foram separadas e acondicionadas em ar atmosférico e vácuo para serem analisadas.

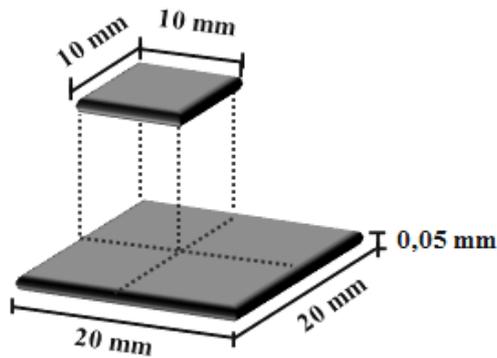


Figura 21 - Dimensões das placas de AISI 304 após a implantação de íons Ag^+ .

3.2. Implantação de íons Ag^+ a baixa energia por *Ion Plating Diversified* (IPD)

Como mencionado no subcapítulo 1.2.4, o processo de implantação iônica desenvolvido neste trabalho foi realizado em um equipamento do tipo *Ion Plating*. Este equipamento foi projetado e construído pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia de Superfícies e Tratamentos Térmicos (LESTT) da Universidade de Caxias do Sul (UCS). A Figura 22 mostra o painel de controle e o reator de implantação construído em aço inoxidável AISI 304 com diâmetro de 600 mm e altura de 900 mm.



Figura 22 - Equipamento de implantação iônica a baixa energia baseado no *Ion Plating*.

A funcionalização do equipamento foi atribuída às alterações realizadas, principalmente no reator. Na parte superior do reator, junto com o sistema giratório do porta-amostra, foi acrescentado uma fonte de alta tensão de polarização (BIAS) com o intuito de acelerar os íons gerados em direção ao alvo. A atração dos íons, considerada como a última etapa do processo de implantação, foi distinguida entre os dois métodos pela velocidade de aceleração dos íons adquirida pela diferença de potencial originada pela aplicação de alta tensão no porta-amostra. As alterações que foram realizadas

otimizaram o *Ion Plating*, tornando-o mais versátil e capacitando-o para ser usado em casos, onde se espera que as modificações químicas e físicas, promovidas pelas espécies implantadas ocorram próximas à superfície.

As amostras fixadas no porta-amostra foram acondicionadas no reator numa pressão de base de 1×10^{-7} mbar. Durante o processo de implantação, a pressão foi mantida em 1×10^{-6} mbar. O metal de implantação (Ag) utilizado estava em forma de *pellets* com pureza de 99,9% fornecido pela empresa *Kurt J. Lesker Company*, dos Estados Unidos. O controle da quantidade de material evaporado foi feito através de um sensor piezoelétrico, localizado acima do ionizador na região central do reator, como mostra a Figura 8 do subcapítulo 1.2.4. A corrente elétrica resultante pela incidência dos íons sobre o material alvo foi medida através de um copo de Faraday. Este instrumento de medição foi usado para estimar aproximadamente o número de íons que atingiam as amostras. A ventilação da câmara, assim como o resfriamento das amostras, foi feito com gás nitrogênio comercial.

As condições de operação da implantação iônica a baixa energia estão descritas na Tabela 8. A numeração de cada série de amostras define uma condição específica de implantação utilizada. Para cada série, uma dúzia de amostras foi realizada com exceção da série III que foi feita em triplicata, totalizando 84 amostras implantadas com íons Ag^+ . Apenas as amostras da série III foram submetidas aos ensaios microbiológicos, pois a relação tempo e corrente de emissão favorecem a implantação dos íons. Nestas condições de processo foram obtidas doses regulares. A variável controlada durante o processo foi a corrente de emissão da fonte de elétrons. O sistema utilizado permitia bombardear somente uma amostra de cada vez e o tempo de processo foi estipulado através do monitoramento de um sensor piezoelétrico.

Tabela 8 - Condições das implantações iônicas a baixa energia (4 keV).

Série das amostras	Tensão na fonte de elétrons (kV)	Corrente de emissão (mA)	Corrente do feixe de ionização (nA/cm^2)	Tempo (min)
I	6,35	14	21	45
II	6,4	20	22,5	30
III*	6,4	25	24,5	15
IV	6,5	30	26	10

* Série de amostras utilizadas para os ensaios microbiológicos.

A implantação iônica a energia intermediária (100 keV) foi um complemento de comparação essencial ao trabalho aqui proposto, devido à possibilidade de análise da

quantidade de prata incorporada e dos parâmetros de processo. Este método foi realizado no implantador HVEE de 500 kV, do Laboratório de Implantação Iônica (LII), do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

3.3. Caracterização da modificação superficial

3.3.1. Simulação de Monte Carlo pelo software SRIM

As simulações das trajetórias e perdas de energia dos íons foram realizadas através do programa *Stopping and Range of Ion in Matter* - (SRIM 2013), pelo método de Monte Carlo [72]. Como resultado obteve-se estimativas razoavelmente acuradas dos perfis de concentração/profundidade dos íons implantados. A energia do feixe estabelecida foi determinante na distribuição decorrente das características da interação dos íons com a matéria.

As simulações foram ajustadas com os padrões de baixa energia de aceleração do feixe de íons de prata de 0,5, 1, 2, 3 e 4 keV para um alvo de aço inoxidável austenítico. Com o mesmo alvo foram realizadas as simulações de comparação para a implantação iônica com a energia encontrada na literatura de 100 keV.

As informações resultantes da simulação de Monte Carlo guiaram a execução prática de implantação de íons Ag^+ em aço inoxidável, onde o objetivo foi assegurar que os resultados recebidos pela simulação pudessem ser confiáveis à amostra caracterizada.

3.3.2. Análise por feixe de íons

A análise química elementar quantitativa utilizada para caracterizar as doses de implantações foi realizada no Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), usando o método de retro-espalhamento elástico ou espectrometria de retro-espalhamento Rutherford (RBS). Nesta técnica foi utilizado um feixe de íons mono-energéticos de alta energia de hélio (He^+) de 2 MeV e um ângulo de detecção de retro-espalhamento de 165° . A energia das partículas retro-espalhadas foi detectada e originou o espectro da composição elementar do material analisado, bem como a quantidade de átomos presentes. Para quantificar tal análise foi utilizado a comparação das áreas dos picos das amostras de interesse e do padrão Harwell de bismuto (Bi) implantado em silício (Si), com $1,4 \times 10^{16}$ átomos/cm², e um padrão de platina (Pt) implantado em Si, com $3,4 \times 10^{16}$ átomos/cm².

3.3.3. Determinação do perfil de profundidade

Os perfis dos elementos químicos constitutivos em profundidade nas amostras foram obtidos pela técnica de GD-OES da Horiba Scientific, modelo GD-Profiler 2, do Laboratório de Propriedades Nanomecânicas (LPN) da UCS. As medidas foram realizadas a uma pressão de 650 Pa por bombardeamento de íons argônio (Ar^+) em função do tempo de pulverização com uma potência-RF de 15 W.

3.3.4. Avaliação morfológica e estrutural das bactérias aderidas

A morfologia e microestrutura das bactérias aderidas nas amostras foram avaliadas por meio de imagens obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu SM4-550. As amostras foram analisadas após a realização dos ensaios biológicos para revelar a adesão irreversível das células à superfície e o início do desenvolvimento dos biofilmes. Como a análise foi realizada sobre um material biológico, inicialmente a água contida nos espécimens foi removida, impedindo a volatilização da água e evitando ocasionar sérios danos à coluna do microscópio que opera em alto vácuo. A etapa de desidratação foi realizada com etanol absoluto utilizando a seguinte série gradual: 20, 40, 60, 80, 90 e 100%, mantendo o material em cada uma dessas soluções durante 10 min à temperatura ambiente. Após a desidratação, as amostras foram transferidas para um forno elétrico a 50°C por 24 h. Após a secagem do material biológico foi depositado nas amostras uma camada de ouro para a superfície se tornar condutora.

Como análise complementar foi feita a medição da rugosidade superficial do aço inoxidável, antes e após a implantação de íons Ag^+ . As medidas foram realizadas no rugosímetro *Form Talysurf Intra* da Taylor Hobson com uma velocidade de 0,5 mm/s com deslocamento de 5 mm para um campo de medição de 0,5 mm. A força aplicada foi de 40 gf.

3.4. Ensaios biológicos

A investigação do efeito da adesão e formação de biofilmes de micro-organismos patogênicos sobre a superfície do aço inoxidável foi realizada nos laboratórios do Instituto de Biotecnologia (IB) da UCS.

3.4.1. Seleção das espécies bacterianas formadoras de biofilmes

Os micro-organismos formadores de biofilmes selecionados para este estudo foram as bactérias *Escherichia coli* (IBEc 101) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). A razão pela qual se optou estudar estes dois tipos de bactérias recai sobre ambas as espécies apresentarem alta virulência, tendo, portanto, um elevado significado clínico. Além disso, as estirpes são de referência em várias aplicações e aconselhada, pelo Ministério da Saúde na Norma Regulamentadora Brasileira NR 2616:1998 [84], como micro-organismos a serem testados para avaliar a eficiência de agentes antimicrobianos.

3.4.2. Meio de cultura

As estirpes bacterianas foram inoculadas em meio LB (*Luria Bertani*). Este meio de cultura composto de triptona, extrato de levedura e cloreto de sódio (NaCl) possui os nutrientes indispensáveis ao crescimento dos micro-organismos em questão. Esses reagentes foram dissolvidos em água destilada e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 5 mols. O meio LB foi inserido em autoclave a 120°C por 20 min.

3.4.3. Preparação da suspensão bacteriana

Os micro-organismos foram inoculados em meio LB por 18 h a 35°C com agitação de 150 rpm em um agitador orbital. O volume obtido na suspensão de cada estirpe bacteriana foi de 100 mL. Com este volume foi quantificado uma concentração de $1,0 \times 10^9$ células/mL. As células foram ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS, 0,1 mol/L, pH = 7,0).

3.4.4. Ensaio de antibiofilme bacteriano

Os ensaios de aderência e de formação dos biofilmes foram avaliados, de forma indireta, por coloração celular com cristal violeta genciana 0,4 m/v. Os testes foram realizados em duplicata e duas repetições. A Figura 23 representa na forma de um esquema as etapas realizadas nos ensaios biológicos. O corante ligado às células aderidas à superfície da placa de aço inoxidável foi solubilizado com etanol (90 %) até que esta estivesse livre da mancha. A avaliação da propriedade antimicrobiana foi realizada nas amostras de controle e tratadas. Para a leitura do corante despreendido foi

utilizado o espectrofotômetro UV/Vis *Asys Expert Plus* da Elisa em um comprimento de onda de 595 nm. Pela medida de absorvância foi calculada a porcentagem de aderência e de formação de biofilme.

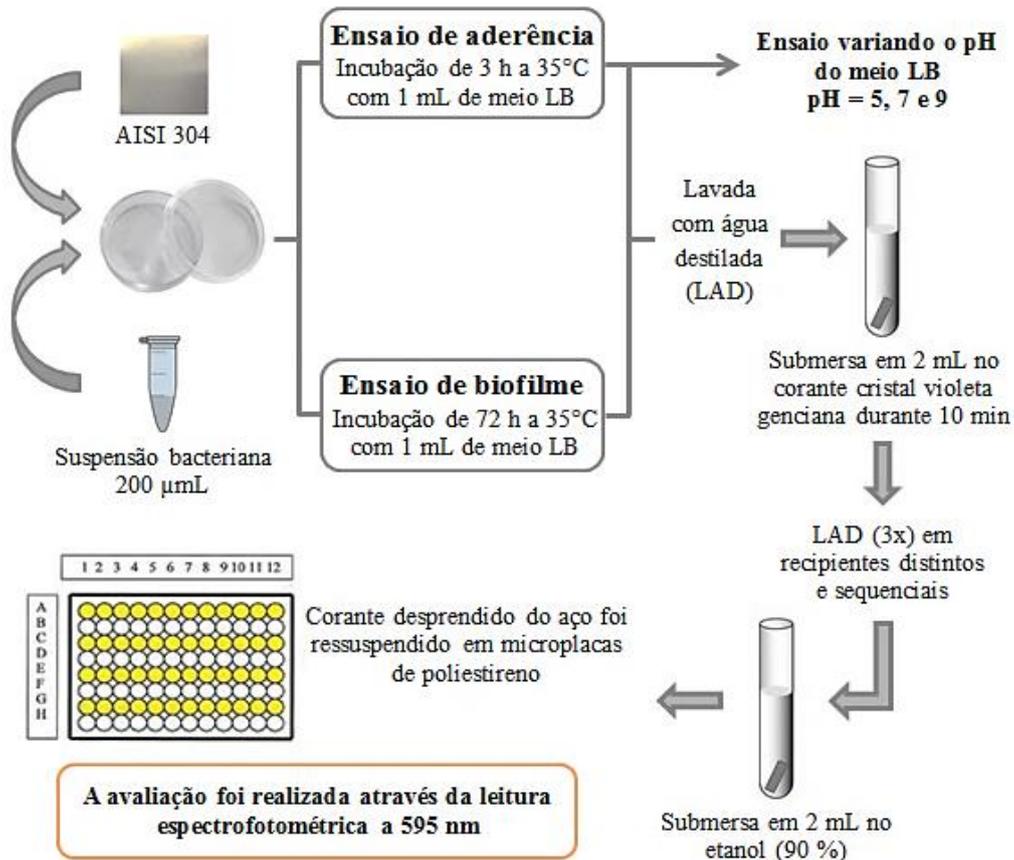


Figura 23 – Etapas do procedimento realizado durante os ensaios biológicos.

3.4.5. Tratamento de desoxidação (TD)

O tratamento de desoxidação foi realizado após ter sido constatada uma elevada quantidade de oxigênio na superfície das amostras. Como uma tentativa de minimizar esse efeito, algumas amostras foram submetidas a este tratamento. As placas de aço inoxidável, sem e com a incorporação de íons Ag^+ foram adicionadas a tubos Falcon contendo uma solução à base de hidróxido de sódio (15% de acetona e 85% de solução de NaOH 0,1 M). As amostras submersas na solução foram aquecidas em banho maria durante 15 min com os tubos destampados.

4. Resultados e discussão

4.1. Análises da superfície modificada

4.1.1. Estudo da energia de implantação dos íons pela simulação de Monte Carlo

As simulações de Monte Carlo foram cruciais na definição dos parâmetros empregados no processo de modificação superficial. A trajetória e as perdas de energias dos íons durante a implantação ocorrem de forma gradual dentro do material alvo, via colisões com átomos do alvo (o que causou uma transferência abrupta de energia) ou via as interações entre o íon acelerado e os orbitais elétricos dos átomos do material alvo. Este segundo efeito é considerado um processo contínuo de perda de energia.

Na Figura 24 é possível visualizar que as aproximações dos perfis de concentração/profundidade dos íons implantados são altamente dependentes da energia de implantação, da espécie inserida e da composição do substrato. Quanto maior a tensão de polarização aplicada, maior é a energia com que os íons colidem com os átomos do material alvo, e conseqüentemente, o alcance de penetração das espécies implantadas estende-se alguns nanômetros da superfície.

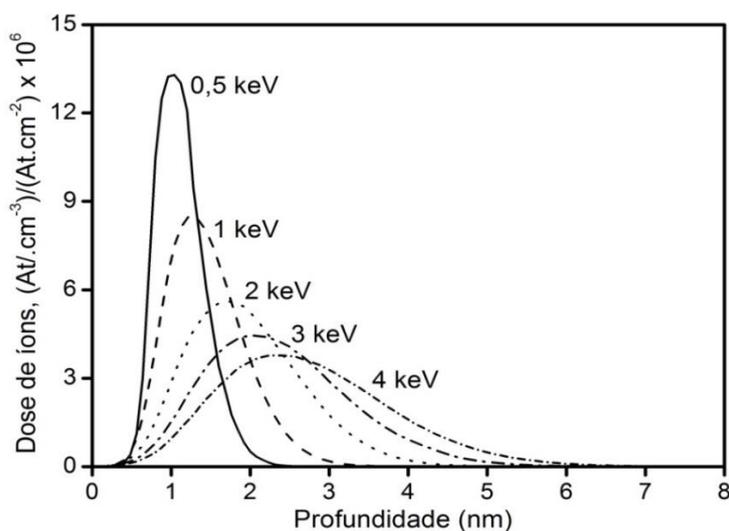


Figura 24 - Simulação do perfil de concentração/profundidade implantação de íons Ag^+ a baixas energias.

A Figura 25 compara as simulações dos perfis de concentração/profundidade a baixas e médias energias de polarização no processo de implantação iônica. A profundidade de implantação da energia de 100 keV é uma ordem de grandeza maior do que quando se utiliza uma energia de 4 keV. Esta variação já era esperada e não é tão relevante no nosso caso, o importante é que a baixa energia foi obtida uma concentração relativamente alta numa faixa de profundidade muito próxima da superfície (< 10 nm).

Supõe-se que a prata implantada por estar adjunta a superfície, poderia ser ionizada para fora do material de maneira mais espontânea, facilitando a inibição ou erradicação de biofilmes.

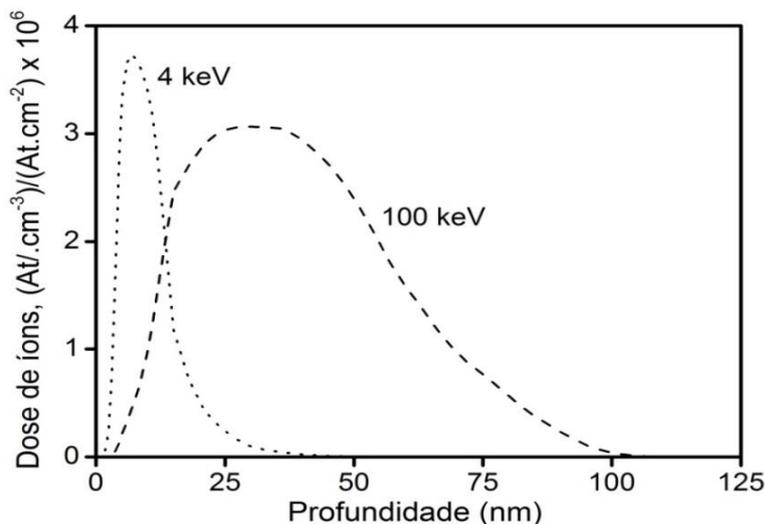


Figura 25 - Simulação do perfil de concentração/profundidade a baixa energia (4 keV) e a média energia (100 keV) de polarização no processo de implantação iônica.

4.1.2. Avaliação das doses implantadas

A dose e distribuição de implantação de íons Ag^+ na superfície do aço inoxidável foram caracterizadas por RBS. O espectro de RBS, na Figura 26, mostra os sinais característicos de ferro (espécie química com maior percentual em peso encontrado no substrato) e de prata incorporada nas amostras. As doses implantadas foram obtidas utilizando a Equação (2) do subcapítulo 1.4.2.

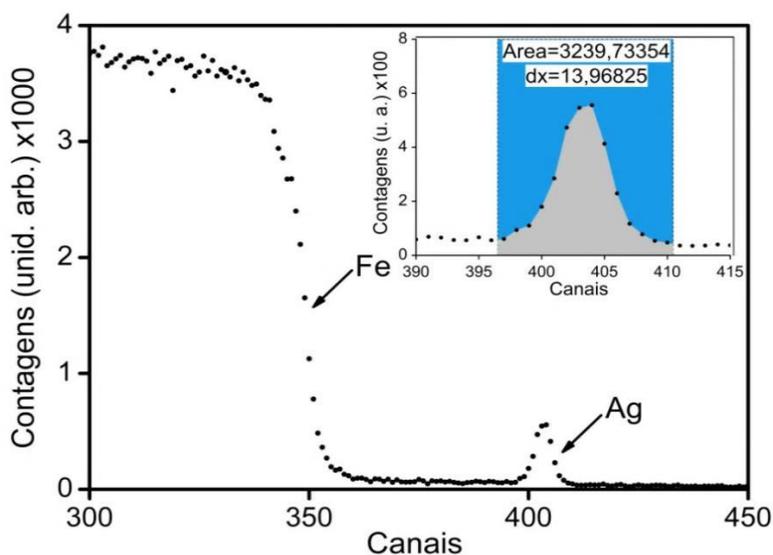


Figura 26 – Espectro de RBS que mostra a coleta do valor da área de prata de uma amostra da série I.

A incógnita A da referida equação, representada pela área abaixo da curva foi determinada com o auxílio do software OriginPro 8.6, conforme mostra a aproximação realizada para o pico de prata. O número de canais (N) foi mantido constante para a análise de todas as amostras. É importante salientar que nesta análise, o perfil de implantação da prata foi representado com uma curva do tipo Gaussiana e Lorentziana. O perfil Gaussiano é equivalente a uma distribuição normal e o perfil Lorentziano é equivalente a uma distribuição relativa de Cauchy-Lorentz para a concentração de prata com o substrato. Esta mesma tendência havia sido observada nos perfis das simulações de Monte Carlo.

A Figura 27 exhibe a compilação dos resultados obtidos nos cálculos realizados para a determinação das doses de prata implantada nas quatro séries de amostras. Analisando os resultados extremos de índice de emissão de 14 e 30 mA, note que uma maior corrente de emissão e um menor tempo de implantação acarretam em uma maior densidade areal de átomos de prata. Inicialmente essa relação entre o tempo e índice de emissão transcorre exponencialmente. Contudo, a corrente de emissão é limitada pelo campo de atração que promove a implantação dos íons. Essa restrição pode ser observada quando se eleva a corrente de emissão para valores próximos de 60 mA, onde ao invés de implantar seria formada uma película de prata sobre o alvo. Neste caso, as propriedades do substrato que deveriam ser mantidas serão mascaradas pelo revestimento.

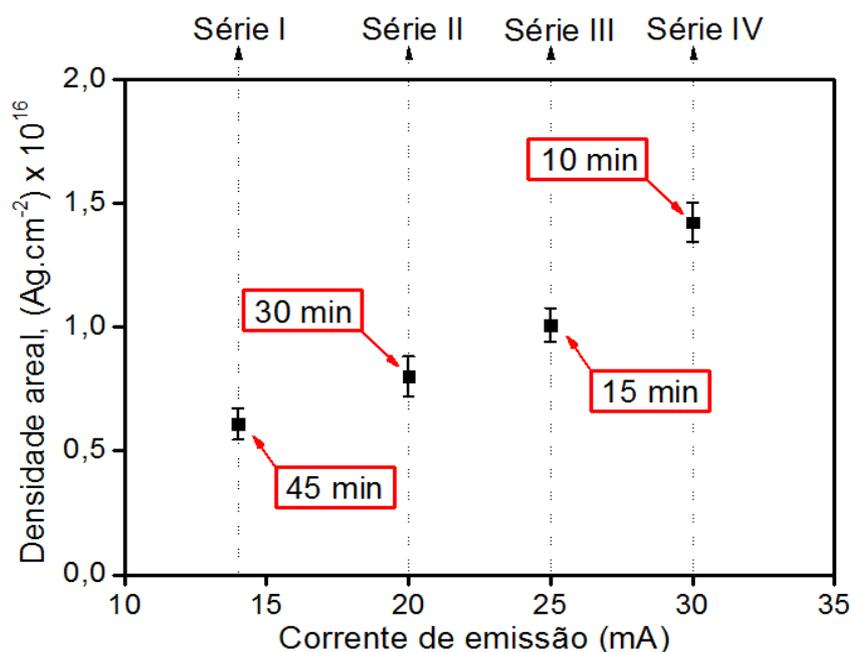


Figura 27 – Densidade areal de átomos de prata por centímetro quadrado em função da corrente de emissão utilizada nas implantações.

De posse do conhecimento das concentrações implantadas no processo IPD, é proeminente sobrepôr um comparativo do resultado obtido nas amostras realizadas a 100 keV, onde a dose implantada determinada foi de 1×10^{17} Ag/cm² durante 24 h de processo. Considerando as condições de cada processo e a dose de íons implantados, evidencia-se que o rendimento seja mais econômico no equipamento aqui proposto. Ainda, estima-se que as propriedades antimicrobianas sejam similares as de um implantador iônico.

4.1.3. Análise de profundidade

Nos resultados das análises de GD-OES (Figura 28) evidenciam-se os elementos característicos do aço inoxidável, ferro e cromo. Estes resultados corroboram com os resultados das simulações de Monte Carlo e de RBS, pois as curvas dos elementos não apresentam um crescimento abrupto, o que indica que não há formação de uma película de prata na superfície do aço, mas sim, que a prata está de fato implantada. Na Figura 28 também foi constatada a presença de oxigênio na superfície do aço inoxidável.

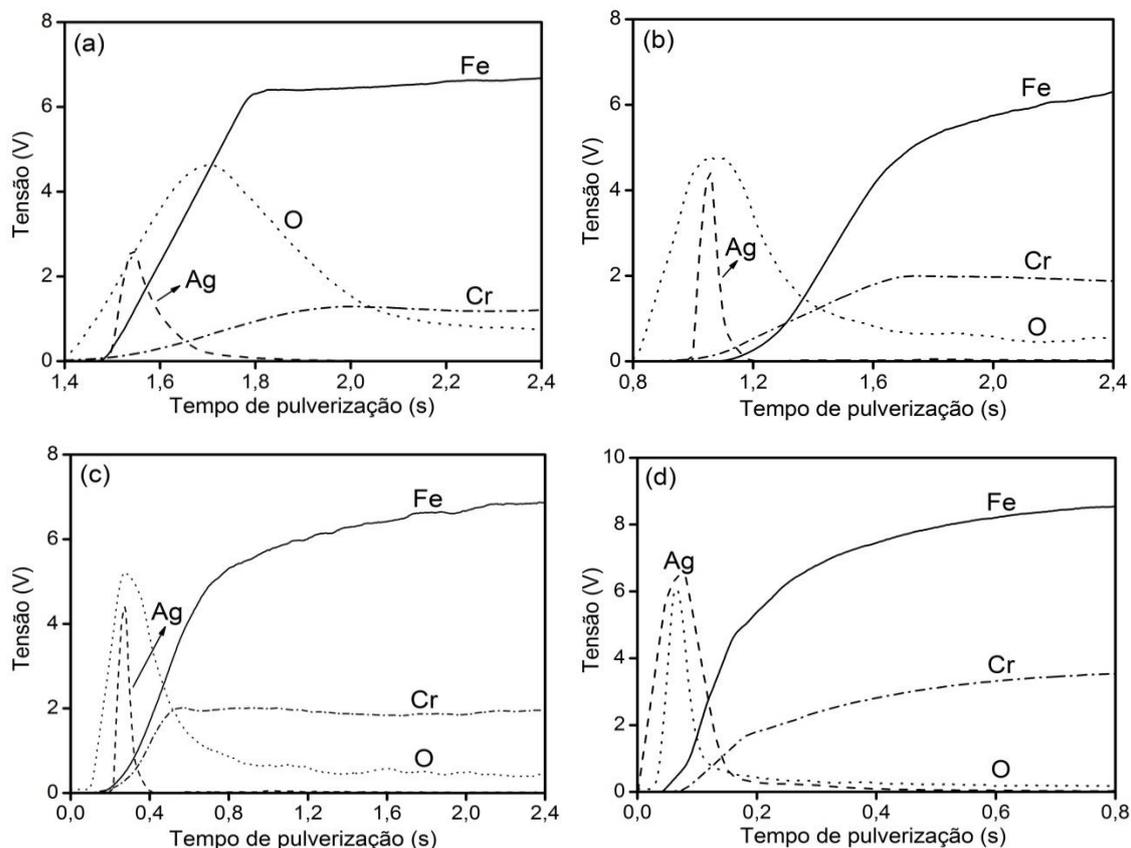


Figura 28 - Perfil de profundidade dos elementos químicos constitutivos das amostras da série: (a) I; (b) II; (c) III e (d) IV.

Como uma alternativa de minimizar o oxigênio da superfície, algumas amostras da série III foram acondicionadas em um dessecador a vácuo (Figura 29). As amostras que foram mantidas a baixo vácuo tiveram uma redução na curva de oxigênio. Isto, de alguma forma parece interferir no pico de prata. Possivelmente, as amostras expostas ao ambiente de ar atmosférico iniciam, antecipadamente, o processo de liberação de íons Ag^+ . O deslocamento dos íons Ag^+ para a superfície do material pode estar originando o óxido de prata (AgO), mas sem uma análise específica esta hipótese não é conclusiva.

O eixo da abscissa dos gráficos não foi convertido de tempo de pulverização para profundidade porque se faz necessário utilizar um perfilômetro, sem o qual não há como comprovar com exatidão a profundidade de penetração dos íons Ag^+ . Para converter o eixo da ordenada de tensão para concentração, seria necessário utilizar padrões com composição conhecida e constante. Ainda, sem a posse dos mesmos até o presente momento, a concentração de íons de prata foi obtida mediante a análise anteriormente mencionada, RBS.

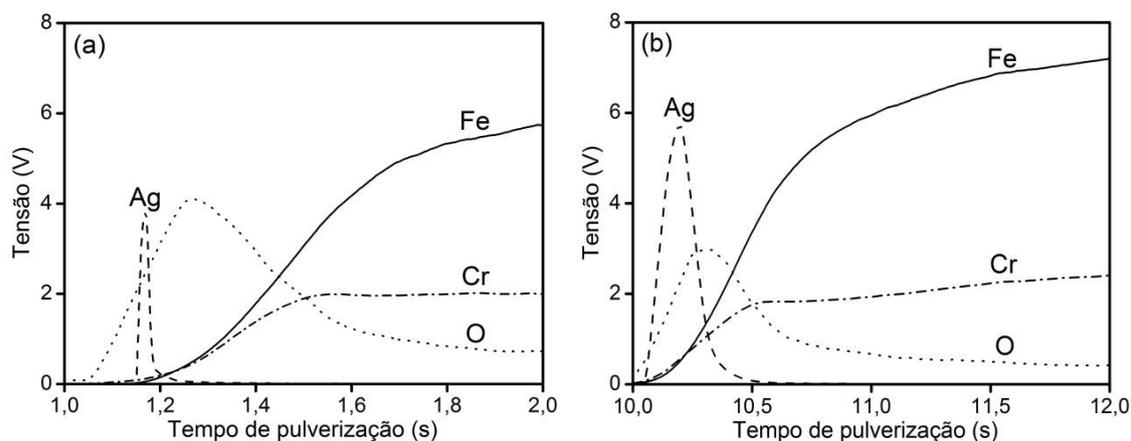


Figura 29 – Perfil de GD-OES das amostras da série III acondicionadas: (a) ar atmosférico e (b) vácuo.

4.1.4. Imagens da adesão bacteriana na superfície do aço inoxidável

Na Figura 30 podem ser visualizadas as imagens obtidas por MEV. A adesão da bactéria *Escherichia coli* sobre a superfície do AISI 304 foi analisada tanto nas amostras não tratadas como nas tratadas. Em ambas as amostras podem ser observadas uma quantidade elevada de células bacterianas aderidas na superfície do aço, sendo detectada em alguns pontos a formação de microcolônias. Nas amostras tratadas nenhum sinal de dano na parede celular das bactérias é visualizado pela ação dos íons de Ag^+ .

Estudos indicam que a adesão de micro-organismos ocorre preferencialmente nas irregularidades de uma superfície [1]. As causas deste fenômeno podem estar

relacionadas à maior área da superfície rugosa que proporciona mais sítios favoráveis para a colonização, e posterior, formação dos biofilmes. Contudo, recorde que a rugosidade superficial do aço inoxidável, antes e após a implantação de íons Ag^+ foi analisada, sendo obtido um valor médio de aproximadamente $0,17 \mu\text{m}$ ($\pm 0,05$). O resultado é aceitável, pois se sabe pelas imagens de MEV que cada bactéria de *Escherichia coli* mede aproximadamente $0,5 \mu\text{m}$ de largura por $1-2 \mu\text{m}$ de comprimento o que dificulta a sua adesão à superfície.

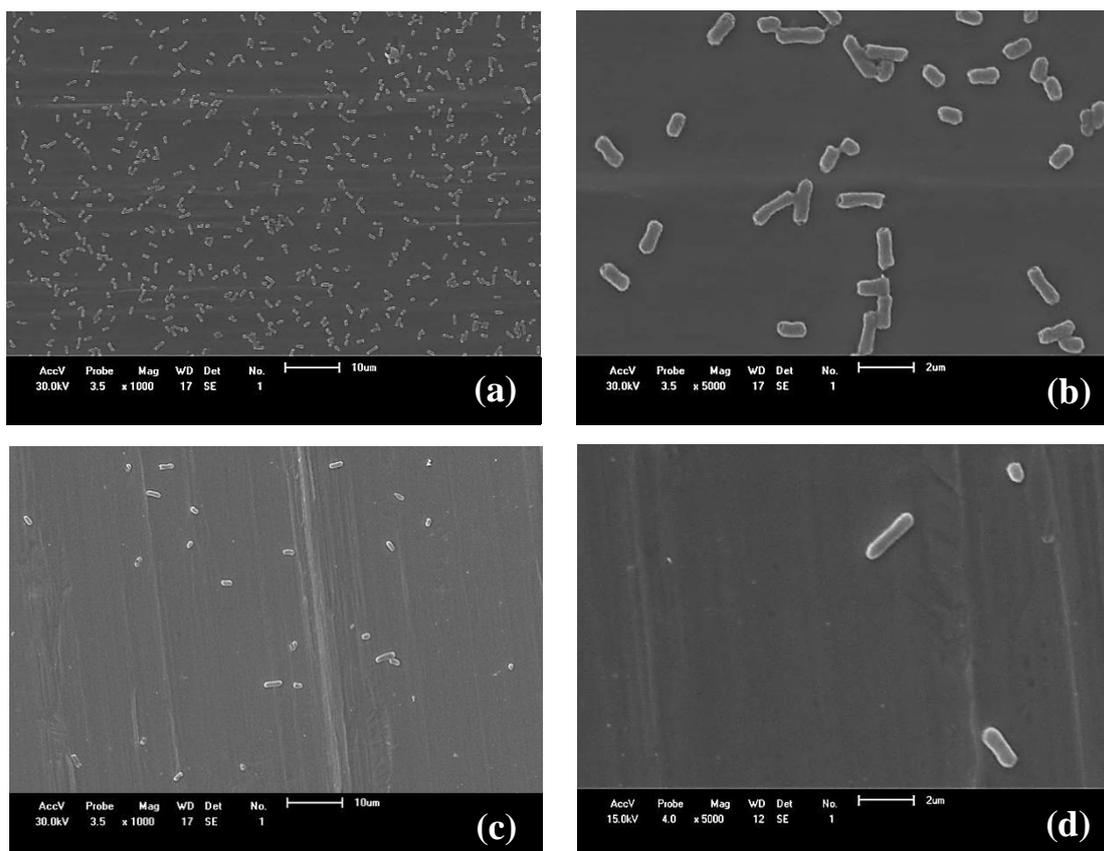


Figura 30 - Imagens de MEV mostrando a adesão de *E. coli* das amostras da série III (a) e (b) não tratadas; (c) e (d) tratadas com íons Ag^+ .

4.2. Resultados biológicos

4.2.1. Análise da aderência de *E. coli* e *S. aureus* na superfície do aço inoxidável

As células aderidas de *Escherichia coli* (IBEc 101) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) na superfície do aço inoxidável foram investigadas, sem e com a implantação de íons Ag^+ e, sem e com a técnica de desoxidação da prata (Figura 31). Na aderência de *E. coli* verifica-se que o aço inoxidável não tratado e o tratado apenas com a solução usada na remoção da camada de óxido, são susceptíveis à adesão de micro-organismos. Em contrapartida, os resultados mostram que com a adição de prata houve

uma significativa redução (> 60%) na aderência bacteriana em relação ao mesmo aço sem prata. Ainda, para constatar se a capacidade de inibição da aderência era decorrente da oxidação, as placas foram submetidas ao tratamento de desoxidação como mencionado no subcapítulo 2.5.5. As amostras com a adição de prata mais o tratamento de desoxidação apresentaram uma alta redução de aderência bacteriana (> 95%) em relação ao controle.

Na análise da Figura 31 verificou-se que as células aderidas de *S. aureus* na superfície do aço inoxidável têm um efeito análogo em relação à análise de *E. coli*, sendo constatada apenas uma diferença, os aços inoxidáveis tratados, tiveram um acréscimo (> 3%) na aderência bacteriana.

As superfícies observadas apresentaram uma influência importante no processo de adesão microbiana. Esse efeito antiadesão ou inibitório dos íons Ag^+ podem estar relacionados com a redução das interações atrativas entre as bactérias e o substrato, principalmente para as superfícies, cuja a prata foi submetida ao tratamento de desoxidação.

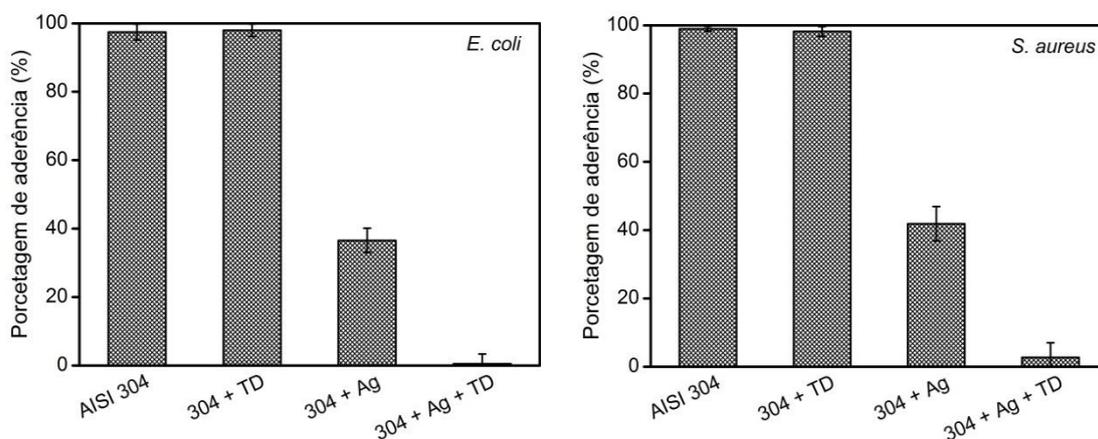


Figura 31- Adesão da *E. coli* e *S. aureus* à superfície do AISI 304, sem e com implantação de íons Ag^+ (Série III) e, sem e com o tratamento de desoxidação (TD).

4.2.2. Biofilme bacteriano

A Figura 32 mostra a formação de biofilme de *E. coli* na superfície do aço inoxidável, sem e com a implantação íons Ag^+ e, sem e com o tratamento de desoxidação. Foi observado que o biofilme se desenvolveu tanto nas amostras não tratadas como nas tratadas. Houve, entretanto, uma redução na formação de biofilme, na amostra com prata implantada (~ 30%) e na amostra contendo a prata mais o tratamento de desoxidação (> 90%), em relação aos controles. O efeito retardatório na formação

dos biofilmes pode ser associado à propriedade antimicrobiana dos íons Ag^+ , dependente tanto da densidade areal de prata implantada como da taxa de íons Ag^+ liberada da superfície do material.

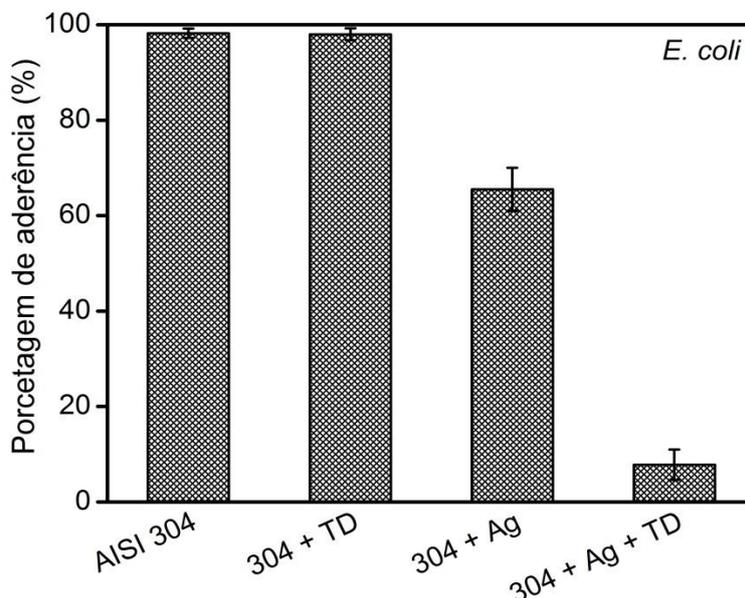


Figura 32 - Formação de biofilme de *E. coli* à superfície do AISI 304, sem e com implantação de íons Ag^+ (Série III) e, sem e com tratamento de desoxidação (TD).

Acredita-se que o TD facilite a lixiviação da prata para o meio LB líquido contendo a suspensão bacteriana. A prata ao ser liberada da superfície adquire a forma ionizada, e ao se ligar as proteínas das células bacterianas, possivelmente deve danificar a estrutura da parede celular, ocasionando a morte das células.

Contudo, estas considerações são questionadas pela ocorrência e predominância das células aderidas irreversivelmente à superfície, observadas nas imagens de MEV. É provável que estas células se tornem uma barreira contra a ação dos íons Ag^+ . Nessas circunstâncias, o biofilme poderia se desenvolver sobre as células aderidas, estando elas mortas ou vivas, sem sofrer as distorções causadas pelos íons Ag^+ .

4.2.3. Influência do pH na adesão de *E. coli* à superfície do aço inoxidável

A maioria dos biofilmes naturais forma-se a valores de pH próximos da neutralidade. O pH tem um efeito preponderante no metabolismo microbiano que afeta o desenvolvimento e a atividade do biofilme. Na Figura 33 observe que os desvios de pH para valores superiores ou inferiores a 7 interferem no processo de adesão das células de *E. coli* à superfície de aço inoxidável.

Para valores de pH não alcalinos (pH = 5) houve uma redução (~ 54%) de aderência em relação à amostra não tratada e à amostra desoxidada sem a implantação íons Ag^+ . Para valores de pH neutro foi observada uma redução mais acentuada na adesão (~ 74%), enquanto, que os valores de pH alcalinos (pH = 9) apresentaram uma redução (~ 47%) na aderência bacteriana.

A influência do pH pode estar associada às interações das propriedades elétricas superficiais dos micro-organismos e das superfícies sólidas. A repulsão eletrostática entre as duas entidades aumenta para valores de pH próximos da neutralidade e diminui para valores de pH não alcalinos e, deste modo, interfere na aderência bacteriana. Na ausência de prata, a adesão das células à superfície do aço é favorecida, pois nesta situação os corpos com cargas de sinal oposto implicam em forças eletrostáticas atrativas. Nestas situações, as células bacterianas se aproximam facilmente do mínimo primário de energia, e uma adesão forte e irreversível deve ser obtida [46]. Na presença de prata e para valores de pH próximos da neutralidade, as células com carga elétrica positiva devem interagir repulsivamente com os íons Ag^+ , dificultando a adesão. Claro que este fato não invalida que alguma atração ocorra entre elas, tal como no caso de ausência de prata, o que esclareceria as células aderidas de forma mais dispersas observadas nas imagens de MEV.

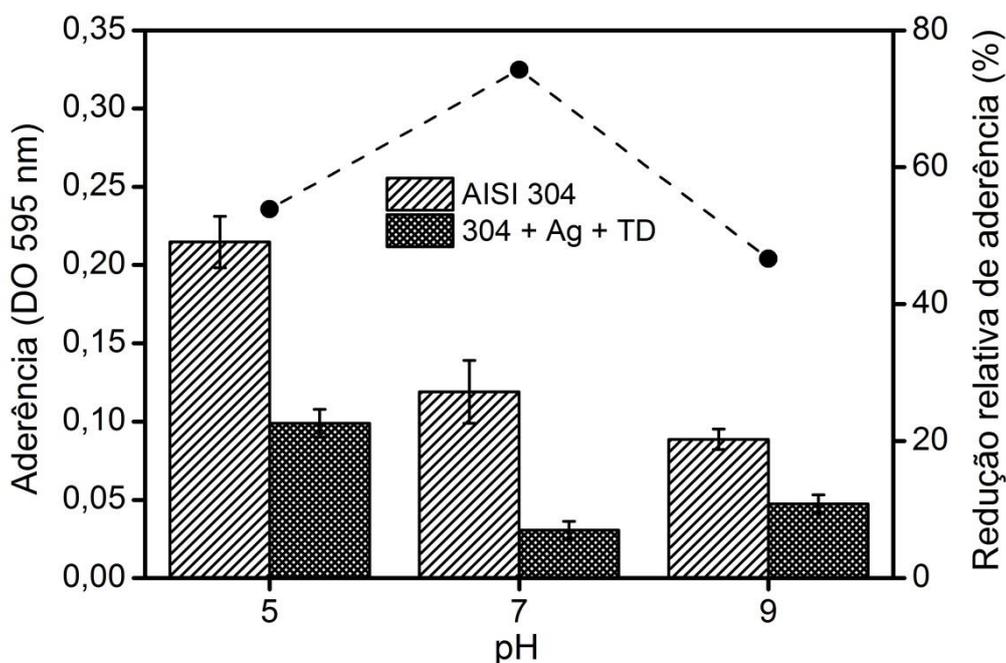


Figura 33 – Influência do pH no processo de adesão das células de *E. coli* à superfície de aço inoxidável.

5. Conclusão

Pela análise dos resultados da superfície modificada, conclui-se que é possível implantar íons prata a baixas energias, assim como é confiável afirmar a reprodutibilidade do processo IPD. Os resultados teóricos e experimentais propostos apresentaram uma correlação visualmente existente entre as caracterizações físico-químicas. As simulações de Monte Carlo previram os perfis de profundidade e dose de prata que iriam ser encontrados em ambos os processos conseguintes – RBS e GD-OES, sendo de valia para o ajuste da tensão de polarização de 4 kV utilizada no processo IPD.

Os espectros de RBS e os perfis de GD-OES comprovam, respectivamente, as doses implantadas e o alcance de profundidade dos íons incidentes no interior do material. De posse dos dados mencionados, foi constatado que as amostras tratadas a baixas energias de 4 keV pelo processo IPD exibem doses relativamente altas em regiões muito próximas da superfície, enquanto valores similares de doses de íons projetados com alcance de implantação uma ordem de grandeza maior foram verificados na implantação iônica a energia intermediária a 100 keV.

Outro fator vantajoso relacionado ao IPD é a sua versatilidade que permite abranger o processo de implantação iônica em escala industrial, onde as condições de processo (energia, tempo, manutenção) o tornam um processo mais econômico. Inicialmente, existe uma perspectiva de um ganho total em rendimento quando comparada com a implantação iônica.

Os resultados biológicos confirmam a obtenção, da tão desejada propriedade antimicrobiana pelo IPD. Contudo, a elevada quantidade de oxigênio na superfície das amostras provoca um significativo acréscimo na capacidade de aderência das células bacterianas de aproximadamente 35%. Logo, a superfície em que os íons Ag^+ foram implantados, e posteriormente, submetidos ao tratamento de desoxidação resultou nas seguintes características: (i) maior ação antimicrobiana da prata e; (ii) capacidade de inibição da aderência, provavelmente, devido as forças de repulsão entre as células bacterianas e a superfície de contato.

Na indústria de alimentos o uso dos íons Ag^+ foi considerado inviável, pois os equipamentos permanecem expostos diariamente ao ambiente rico em oxigênio. Esta impureza foi tida como prejudicial às propriedades antimicrobianas. Ainda, sem uma solução aparente para este problema, conclui-se que seria mais viável aplicar o método de implantação iônica a baixa energia pela tecnologia de IPD na indústria na área da

saúde em instrumentos cirúrgicos, próteses ortopédicas e dentárias, cateteres, entre outras. Nestes casos, seria necessário aplicar algum tipo de revestimento ultrafino de fácil remoção para quando o material tratado fosse aplicado ou uma embalagem que o armazenasse em um meio livre de contaminações, sendo possível até mesmo realizar o tratamento de desoxidação da prata mencionado neste trabalho.

6. Perspectivas

- Verificar a zona de inibição da aderência irreversível e/ou a formação de biofilme de *E. coli* e *S. aureus* e, se a mesma depende da dosagem de íons de prata;
- Determinar por quanto tempo a quantidade de prata implantada continua a fazer efeito, de acordo, com a aplicação médica requisitada;
- Determinar o efeito da implantação de prata sobre a viabilidade celular nos processos de aderência utilizando o método fluorimétrico com corante Dead/Life;
- Avaliar a influência do tempo de contato e a interação do pH sobre viabilidade celular;
- Realizar a implantação de íons Ag^+ em materiais metálicos, poliméricos e cerâmicos;
- Avaliar a propriedade antimicrobiana dos íons de prata sobre diferentes micro-organismos: *A. hydrophila*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*.

7. Referências

1. AN, Y. H. & SKOWRONSKI, P. *General Considerations for Studying Bacterial Adhesion to Biomaterials*. In: An, Y. H. & FRIEDMAN, R. J. eds. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Ttowa, NJ, Humana Press Inc., 8, 121-131, 2000.
2. KOKARE, C. R. *Biofilm: Importance and applications*. Indian Journal of Biotechnology, 8, 159-168, 2009.
3. KNETSCH, M. L. W. & KOOLE, L. H. *New Strategies in the Development of Antimicrobial Coatings: The Example of Increasing Usage of Silver and Silver Nanoparticles*, **Polymers** 3, 340-366, 2011.
4. FENG, H, *et al.*; *A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Journal of Biomedical Materials Research, 52, 4, 662-668, 2000.
5. WAN, Y. Z. *et al.*; *Surface modification of medical metals by ion implantation of silver and copper*. **Vacuum**. 81, 1114 - 1118, 2007.
6. JUNG, W. K., *et al.*; *Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, 74, 2171-2178, 2008.
7. COSTERTON, J. W., *et al.*; *Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections*. *Science*, 284, 1318-1322, 1999.
8. COSTERTON, J. W., *et al.*; *The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections*. Journal of Clinical Investigation, 112, 10, 1466-1477, 2003.
9. MONTEIRO, D. R., *et al.*; *The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver*. International Journal of Antimicrobial Agents, 34, 103–110, 2009.
10. FERNEBRO, J. *Fighting bacterial infections – Future treatment options*. Drug Resistance Updates, 14, 125-139, 2011.
11. ARCIOLA, C. R., *et al.*; *Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials*. Biomaterials, 33, 5967-5982, 2012.

12. BROOKS, J. D. & FLINT, S. H. *Biofilms in the food industry: problems and potential solutions*. International Journal of Food Science and Technology, 43, 2163-2176, 2008.
13. HIRVONEN, J. K. *Ion beam processing for industrial applications*. **Materials Science and Engineering**, A116, 167-175, 1989.
14. SIOSHANSI, P. & TOBIN, E. J. *Surface treatment of biomaterials by ion beam processes*. **Surface and Coatings Technology**, 83, 175-182, 1996.
15. CUI, F. Z. & LUO, Z. S. *Biomaterials modification by ion-beam processing*. Surface and Coating Technology, 112, 278-285, 1999.
16. JAIN, I. P. & AGARWAL, G. *Ion beam induced surface and interface engineering*. Surface Science Reports, 66, 77-172, 2011.
17. LIAO, K. H., *et al.*; *Effect of Silver on Antibacterial Properties of Stainless Steel*. Applied Surface Science, 256, 3642-3646, 2010.
18. LEMIRE, J. A. HARRISON, J. J. & TURNER, R. J. *Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications*. Nature Reviews Microbiology, 11, 371-384, 2013.
19. POLITANO, A. D., *et al.*; *Use of Silver in the Prevention and Treatment of Infections: Silver Review*. Surgical Infections, 14, 8-20, 2013.
20. CHEN, R, *et al.*; *A preliminary study on antibacterial mechanisms of silver ions implanted stainless steel*. Vacuum, 89, 249-253, 2013.
21. FENG, H; YU, Z. & CHU, P. K. *Ion implantation of organisms*. Materials Science and Engineering R., 54, 49-120, 2006.
22. WIDGEROW, S. *Persistence of the chronic wound – implicating biofilm*. In: Wound Healing Southern Africa, 1 (2), 05-07, 2008.
23. ZOBELL, C. E. *The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity*. J. Bacteriol, 46, 39-56, 1943.
24. YEBRA, D.M., KIIL, S. & DAM-JOHANSEN, K. *Antifouling technology- past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings*. **Progress in Organic Coatings**, 50, 75-104, 2004.
25. HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J. W. & STOODLEY, P. *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nature Reviews Microbiology, 2, 95-108, 2004.

26. CHARACKLIS, W. G. & MARSHALL, K. C. *Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach*. In: CHARACKLIS, W. G. & MARSHALL, K. C. (Eds). *Biofilms*, New York: John Wiley & Sons, 1990.
27. PHILLIPS, P. L., *et al.*; *Biofilms Made Easy*. In: *Wounds International*, 1, 2010.
28. DOLAN, R. M. *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 9, 881-890, 2002.
29. XAVIER, J. B., *et al.*; *Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes*. *Biomatemática - Boletim de Biotecnologia*. Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2002.
30. SUTHERLAND, I. W. *The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment*. *Trends in Microbiology*, 5, 9, 222-227, 2001.
31. TORTORA, G. J.; FUNKE B. R. & CASE C. L. *Microbiologia*. Artmed, 2005.
32. PARENTE, A. M. & SOUSA, J. C. *Características morfológicas e ultraestruturais dos micro-organismos procaríotas*. In: *Microbiologia*, volume I. Lisboa, Lidel-Eds. Técnicas, 20-23, 1998.
33. BOLAND, T., LATOUR, R. A. & STUTZENBERGER, F. J. *Molecular Basis of Bacterial Adhesion*. In: AN, Y. H. e FRIEDMAN, R. J. eds. *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc., 2, 29-41, 2000.
34. BRADY, R. A., *et al.*; *Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection*. *FEMS Immunology Medical Microbiol.*, 52, 13-22, 2008.
35. DUNNE, W. M. *Bacterial Adhesion: seen any good biofilms lately?* *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 2, 155-166, 2002.
36. STOODLEY, P., *et al.*; *Biofilms as Complex Differentiated Communities*. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209, 2002.
37. WATNICK, P. & KOLTER, R. *Biofilm, city of microbes*. *J. Bacteriol*, 182, 2675-2679, 2000.
38. JAKUBOVICS, N. S. *Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms*. John Wiley & Sons, *Molecular Oral Microbiology*, 25, 4–14, 2010.
39. RUMJANEK, N. G., FONSECA, M. C. C. & XAVIER, G. R. *Quorum Sensing em Sistemas Agrícolas*. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 33, 35-50, 2004.
40. BEHLAU, I. & GILMORE, M. S. *Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infections Disease*. *Archives of Ophthalmology*, 126 (11), 1572-1581, 2010.

41. FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança alimentar*. Trad. Por GUIMARÃES, M. C. M. & LEONHARDT, C. Consultoria, supervisão e revisão técnica: TONDO, E. C.; Porto Alegre: Artmed, 151-154, 2002.
42. SIMÕES, M., SIMÕES, L. C. & VIEIRA, M. J. *A review of current and emergent biofilm control strategies*. LWT – Food Science and Technology, 43, 573-583, 2010.
43. PUREVDORJ, B., COSTERTON, J. W. & STOODLEY, P. *Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Applied and Environmental Microbiology 68(9): 4457-4464, 2002.
44. GARRETT, T. R., BHAKOO, M. & ZHANG, Z. *Bacterial adhesion and biofilms on surfaces*. Progress in Natural Science, 18, 1049-1056, 2008.
45. MARSHALL, K. C. *Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces*. American Society Microbiology News, 58, 202-207, 1992.
46. ZOTTOLA, E. A. & SASAHARA, K. *Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern?* International Journal of Food Microbiology, 23, 125-148, 1994.
47. ARCURI, E. F. *Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos*. Revista Leite e Derivados. 53, 9, 40-45, 2000.
48. RAWLINGS, D. E. *Heavy metal mining using microbes*. Annual Review of Microbiology 56: 65-91, 2002.
49. JASS, J. & WALKER, J. T. *Industrial biofouling - detection, prevention and control*. In: *Biofilms and biofouling*. WALKER, J. T., SURMAN, S. & JASS, J. New York, John Wiley & Sons: 1-12, 2000.
50. FLINT, S. H., BREMER, P. J. & BROOKS, J. D. *Biofilms in dairy manufacturing plant – description, current concerns and methods of control*. Biofouling, 11, 1, 81-87, 1997.
51. HOBSON, D.W. & BOLSEN, K. *Methods of the testing oral and topical antiseptics and antimicrobials*. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Block, Seymour S., Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 5ª ed., cap. 69, 1329-1359, 2001.
52. LEREBOUR, G., *et al.*; *Adhesion of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis to the Episkin reconstructed epidermis model and to na inert 304 stainless steel substrate*. Journal of Applied Microbiology, 97, 7-16, 2004.
53. LINDSAY, D. & VON HOLY, A. *What food professionals should know about bacteria biofilms*. British Food Journal, 108, 1, 27-37, 2006.

54. JOHNSRUD, S. C. *Biotechnology for solving slime problems in the pulp and paper industry*. In: SCHEPER, T. ed. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry - Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 311-328, 1997.
55. SILLANKORVA, S. M. *Use of bacteriophages to control biofilms*. Tese de Doutorado em Engenharia Química e Biológica (199f) - Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2008.
56. LARKUM, A. W. D., KOCH, E. M. W. & KUHL, M. *Diffusive boundary layers and photosynthesis of the epilithic algal community of coral reefs*. *Marine Biology* 142(6): 1073-1082, 2003.
57. HAJIPOUR, M. J., *et al.*; *Antibacterial properties of nanoparticles*. *Trends in Biotechnology*, 30, 10, 499-511, 2012.
58. BELL, T. *Surface engineering: past, present and future*. *Surface Engineering*, 6(1): p. 31-40, 1990.
59. PIANA, L. A., *Caracterização e Avaliação da Adesão de Filmes de Nitreto de Titânio Depositados Via PAPVD*. Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Engenharia, PPGEM, UFRGS, 2001.
60. MARTIN, P. M. *Handbook of Deposition Technologies for Films and Coatings*. Elsevier, 3º ed. Oxford, 2009.
61. ZIEGLER, J. F. *Handbook of ion implantation technology*. Amsterdam: Elsevier, 1992.
62. RAUTRAY, T. R., *et al.*; *Ion implantation of titanium based biomaterials*. *Progress in Materials Science*, 56, 1137-1177, 2011.
63. MATTOX, D. M. *Ion Plating – Past, Present and Future*. *Surface & Coatings Technol.*, p. 133-134, Albuquerque, 2000.
64. MATTOX, D. M. *Handbook of Physycal Vapor Deposition (PVD) Processing*. Film formation, adhesion, surface preparation and contamination control. Noyes Publications, New York, 1998.
65. PULKER, H. K. *Ion Plating as an Industrial Manufacturing Method*. *J. Vac. Sci. Technol. A*, v. 10 (4), p. 1669, 1992.
66. PEZZAGNA, S. & MEIJER, J. *High-resolution Ion Implantation from KeV to Mev*. Rubion, Ruhr-Universität Bochum, 2012.
67. SECINTI, K. D., *et al.* *Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants*. *Journal of Clinical Neuroscience*, 18, 391-395, 2011.

68. FONTENOY, C. & KAMEL, S. O. Silver in the medical devices/equipaments: Marketing or real clinical interest? *Le Pharmacien hospitalier*, 46:e1-e11, 2011.
69. RAI, M., YADAV, A. & GADE, A. *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. *Biotechnology Advances*, 27, 76-83, 2008.
70. KLUEH, U., *et al.*; *Efficacy of Silver-Coated Fabric to Prevent Bacterial Colonization and Subsequent Device-Based Biofilm Formation*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 53, 621-631, 2000.
71. RODRIGUES, E. C. S. *Síntese de magnetita e ação antibacteriana do Ag₂O em matriz de alginato magnético*. Dissertação de Mestrado em Física da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) – Mossoró/RN, 2011.
72. ZIEGLER, J. P.; ZIEGLER, M. D. & BIRSACK, J. P. *SRIM 2013*. Disponível em: <<http://www.srim.org>>. Acesso em: 03 de setembro de 2013.
73. BIRSACK, J.P. *Calculation of projected ranges - analytical solutions and a simple general algorithm*. *Nuclear Instruments and Methods*, 182/183, 199-206, 1981.
74. CHU W. K.; MAYER, J. W.; NICOLET, M. A. *Backscattering spectrometry*. New York: Academic Press, 1978.
75. BRUNDLE, C. R.; EVANS Jr., C. A.; WIHON, S.; *Encyclopedia of materials characterization: Surfaces, Interfaces, Thin Films*. Stoneham: Butterworth-Heinemann, 1992.
76. AGUZZOLI, C. *Avaliação das propriedades físico-químicas, mecânicas e tribológicas de filmes finos de VC, Si₃N₄ e TiN/Ti*. Dissertação de Doutorado em Ciências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 2011.
77. MOLCHAN, I. S. *et al.* *The concept of plasma cleaning in glow discharge spectrometry*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 24, 734-741, 2009.
78. AGUZZOLI, Cesar. *Glow-discharge optical emission spectroscopy (GD-OES)*. Universidade de Caxias do Sul, 2012.
79. GAMEZ, G. *et al.* *Surface elemental mapping via glow discharge optical emission spectroscopy*. *Spectrochimica Acta Part B*, 70, 1-9, 2012.
80. SUZUKI, S. & KAKITA, K. *A comparative study of GD-OES, SIM and XPS depth profiling of thin layers on metallic materials*. *Journal of Surface Analysis*, 12, 2005.
81. FEITOR, M. C. *Efeito antibacteriano de tecidos têxteis revestidos por prata através da técnica de deposição por plasma*. Dissertação de Doutorado da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Natal, 2010.

82. FILHO, W. P. C. *Children's dentifrices components effect in Streptococcus mutans grown in biofilms*. Rev. bras. Odontol., Rio de Janeiro, 65, 1, 80-84, 2008.
83. ASTM A 240. *Standard Specification for Chromium and Chromium-Nickel Stainless Steel Plate, Sheet, and Strip for Pressure Vessels and for General Applications*. 2012.
84. BRASIL. Ministério da Saúde. Normas Regulamentadoras – NR. Portaria MS nº 2616:1998, art. 87, II Constituição. *Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar - Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde*. 2ª ed., p. 50, Brasília, 1998.

ANEXO A - Contagem de bactérias totais na suspensão

O valor do número total de bactérias em suspensão foi determinado recorrendo à seguinte expressão:

$$\frac{\textit{n}^\circ \textit{ de células}}{\textit{volume da suspensão}} = \left(\frac{\textit{n}^\circ \textit{ de células contadas}}{\textit{área contada}} \right) \cdot \left(\frac{\textit{área da membrana}}{\textit{volume filtrado}} \right) \cdot (\textit{diluição})$$

ANEXO B - Meio de cultura e reagentes

Meio LB (*Luria Bertani*) líquido - 500 ml

Triptona	5 g
Extrato de levedura	2,5 g
Cloreto de sódio (NaCl)	5 g

Preparo:

- 1 – Adicionar 400 ml de água destilada e agitar até dissolver;
- 2 – Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5N;
- 3 – Ajustar o volume da solução para 500 ml;
- 4 – Autoclavar.

Tampão fosfato salino (PBS, 01 mol/L, pH = 7,0) - 500 ml

Cloreto de sódio (NaCl)	40,1 g
Fosfato de sódio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	8,9 g
Cloreto de potássio (KCl)	1 g
Fosfato de potássio monobásico (KH ₂ PO ₄)	1,35 g

Preparo:

- 1 – Adicionar 400 ml de água destilada no recipiente contendo NaCl e KCl;
- 2 – Agitar no agitador magnético até dissolver o conteúdo;
- 3 – Ajustar o pH para 7,0 com Na₂HPO₄ e KH₂PO₄;
- 4 – Ajustar o volume da solução para 500 ml;
- 5 – Autoclavar.

Solução à base de NaOH - 100 ml

Solução de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M)	85 ml
Acetona P.A.	15 ml

Preparo:

- 1 – Adicionar e misturar os dois componentes;
 - 2 – Armazenar em um recipiente de vidro âmbar tampado;
-