



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA MECÂNICA

Modificação da superfície de poli(tetrafluoroetileno) para resistir a infeções nosocomiais de *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de
Materiais na Especialidade de Biomateriais

Autor

Daniel Lopes Rosas de Carvalho

Orientadoras

Ana Paula da Fonseca Piedade

Paula Maria Vasconcelos Morais

Júri

Presidente	Professora Doutora Maria Teresa Freire Vieira Professora Catedrática da Universidade de Coimbra Professor Doutor José Carlos Magalhães Duque da Fonseca Professor Auxiliar da Universidade do Porto
Vogais	Professora Doutora Ana Paula Fonseca Piedade Professora Auxiliar da Universidade de Coimbra

Coimbra, julho, 2014

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós
mesmos”

Friedrich Wilhelm Nietzsche

Agradecimentos

O trabalho que aqui se apresenta só foi possível graças à colaboração de algumas pessoas, a quem desde já deixo os meus agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Ana Paula Piedade. O seu apoio, paciência e interesse tornaram este trabalho um percurso de aprendizagem constante.

Dedico também uma enorme palavra de apreço e de agradecimento à Professora Doutora Maria Teresa Vieira por todo o apoio ao longo do Mestrado e pela disponibilidade para transmitir conhecimentos.

À Professora Doutora Paula Morais pela constante ajuda e colaboração com os testes microbianos.

Gostaria de agradecer à Catarina Pinho e ao Christophe Fernandes, pela disponibilidade e ajuda durante os procedimentos de deposição e caracterização, e à Tânia Sousa, pela ajuda e apoio durante a realização dos testes *in vitro*.

À minha família por serem o meu porto de abrigo, por sempre me incentivarem a seguir os meus objetivos e sempre acreditarem nas minhas capacidades com uma crença interminável.

Aos meus amigos, os de sempre e os de agora, que me apoiaram e acompanharam nesta fase da minha vida, levando-me a ultrapassar qualquer obstáculo.

À Inês Rodrigues, pela cumplicidade e paciência, e por todos os dias me fazer acreditar que sou capaz de mais e melhor.

A todos eles, o meu sincero OBRIGADO.

Resumo

As infecções relacionadas com a implantação, permanente ou temporária, de dispositivos médicos são uma preocupação pública e um fardo económico para entidades e pacientes. Um dos maiores problemas inerentes à utilização de implantes é o risco de infecções nosocomiais, especialmente as provocadas por *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*). Neste âmbito, e considerando que os materiais poliméricos, em especial o poli(tetrafluoroetileno) (PTFE), são muito utilizados como biomateriais, é importante avaliar a capacidade de resistência microbiana deste tipo de material e, na sua ausência, encontrar soluções para conferir a referida capacidade.

Neste trabalho é descrito a deposição e a caracterização de filmes finos de PTFE, e PTFE e poliamida (PTFE/PA), com e sem prata (Ag), por pulverização catódica r.f. magnetrão. A incorporação do elemento metálico justifica-se pelas suas conhecidas propriedades antibacterianas, mas os teores utilizados (~1% at.) tiveram em consideração que concentrações excessivas podem causar dano nas células eucariotas no local de implante. As deposições foram efetuadas em atmosfera inerte de argón (Ar) e reativa por inserção de ar atmosférico, tendo também variado a atmosfera de arrefecimento após deposição.

Todos os filmes finos sem prata não apresentam ordem estrutural; os filmes com incorporação daquele elemento metálico são nanocompósitos onde a prata de dimensões manométricas se encontra dispersa na matriz polimérica amorfa. Com exceção dos filmes finos depositados a partir de dois alvos poliméricos todas as superfícies são hidrófobas. Os valores de tensão de adesão da água indicam que todas as superfícies podem, teoricamente, suportar adesão proteica sem iniciar a cascata de coagulação.

Os testes com *P.aeruginosa* evidenciaram que a energia de superfície e o potencial zeta conferem capacidades distintas no que respeita ao desempenho antimicrobiano de cada superfície. Nenhuma das superfícies sem prata foi capaz de inibir a adesão e proliferação da bactéria em estudo e, das superfícies nanocompósitas, apenas a obtida pela deposição dos dois alvos poliméricos PTFE/PA teve resultados positivos nos três conjuntos de testes *in vitro* efetuados. O revestimento desenvolvido provou ser eficaz na modificação

de implantes de PTFE conferindo-lhes as desejadas propriedades antimicrobianas contra *P.aeruginosa*.

Palavras-chave: PTFE, Pulverização Catódica, Resistência Antimicrobiana, Infecções Nosocomiais, *P.aeruginosa*.

Abstract

Infections related to the use, permanent or temporary, of implanted medical devices are a public concern and an economic burden to patients and entities. One of the problems inherent is the risk of nosocomial infections, particularly those caused by *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). In this context, and considering that polymeric materials, in particular poly (tetrafluoroethylene) (PTFE), are widely used as biomaterials, it is important to assess their ability to resist to infection and, in its absence, find solutions to confer this capacity.

This work describes the deposition and characterization of thin films of PTFE and PTFE and polyamide (PTFE/PA), with and without silver (Ag), by rf magnetron sputtering. The incorporation of the metallic element is justified by its known antibacterial properties, but the levels used (~ 1 at.%) took into consideration that excessive concentrations can cause damage in eukaryotic cells at the implant site. The depositions were performed in an inert, argon, and reactive atmosphere, atmospheric air, and the atmosphere cooling after deposition was also varied.

Thin films without silver do not exhibit structural order and the films that incorporate the metallic element are nanocomposites with silver of nanometric dimensions dispersed in the amorphous polymer matrix. With the exception of thin films deposited from two polymeric targets all surfaces are hydrophobic. The values of water adhesion tension indicate that all surfaces can theoretically withstand protein accession without initiating the coagulation cascade.

In vitro tests with *P.aeruginosa* showed that the surface energy and the zeta potential values provide different capabilities with regard to the antimicrobial performance of each surface. None of the surfaces without silver was able to inhibit the adhesion and proliferation of the studied bacteria, and for the nanocomposite surfaces only those obtained by deposition of two polymeric targets PTFE/PA had positive results in the three sets of tests carried out. These coatings proved effective in modifying PTFE implants with the desired antimicrobial properties against *P.aeruginosa*.

Keywords: PTFE, Sputtering, Antimicrobial Resistance, Nosocomial Infections, *P.aeruginosa*.

Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
Simbologia e siglas.....	ix
Simbologia.....	ix
Siglas	x
Introdução.....	1
1. Revisão Bibliográfica	3
1.1. Infecções nosocomiais.....	3
1.1.1. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	5
1.2. Estratégias na prevenção de infecções.....	6
1.2.1. A prata	6
1.2.2. A superfície do material	7
1.3. O poli(tetrafluoroetileno) como biomaterial.....	9
2. Materiais e métodos.....	13
2.1. Técnica de deposição	13
2.2. Técnicas de Caracterização.....	14
2.2.1. Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier.....	14
2.2.2. Espectroscopia de Fotoeletrão X.....	15
2.2.3. Difração de raios X.....	15
2.2.4. Microscopia Eletrónica de Transmissão.....	16
2.2.5. Microscopia Eletrónica de Varrimento.....	16
2.2.6. Microscopia de Força Atómica.....	17
2.2.7. Medição do Ângulo de Contacto Estático	17
2.2.8. Potencial Eletrocinético.....	18
2.2.9. Testes microbianos	19
3. Resultados e discussão	21
3.1. Composição química e grupos funcionais	21
3.2. Análise Estrutural	26
3.3. Morfologia/Topografia	27
3.4. Molhabilidade.....	31
3.4.1. Avaliação do ângulo de contacto estático.....	32
3.4.2. Energia superficial.....	32
3.4.3. Tensão adesão da água	36
3.5. Potencial eletrocinético.....	38
3.6. Testes in vitro.....	39
CONCLUSÕES.....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXO A	A1
APÊNDICE A	A2
APÊNDICE B.....	A9
APÊNDICE C.....	A10
APÊNDICE D	A14

APÊNDICE E A17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representação esquemática das fases da formação de um biofilme (adaptado de [7])	4
Figura 3.1 - Composição química em profundidade do filme PTFEcF; do qual foi retirado o perfil do carbono de modo a tornar mais evidente o perfil dos outros elementos químicos.	22
Figura 3.2 - Desconvolução do espectro de alta resolução de C1s da superfície PTFEc....	23
Figura 3.3 - Espectros FTIR do alvo de PTFE(a) e do filme fino PTFEc(b).	26
Figura 3.4 - Difractogramas do alvo de PTFE e do filme fino PTFEcE.	27
Figura 3.5 - Imagens TEM em campo claro dos filmes PTFEcF(a) e PTFEcF_Ag(b).	27
Figura 3.6 - Micrografias da superfície (a) e da secção transversal (b) dos filmes PTFEc(1) e PTFEcB(2).	28
Figura 3.7 - Imagens topográficas (a,b) e de fase (c) das superfícies PTFEcF e PTFEcF_Ag.	30
Figura 3.8 - Valores da energia de superfície (γ_s) representada pelo somatório das componentes dispersiva (γ_s^d) e polar (γ_s^p).	34
Figura 3.9 - Tensão de adesão da água em todas as superfícies em estudo.	37
Figura 3.10 - Potencial zeta das superfícies dos filmes finos e dos alvos utilizados.	39
Figura 3.11 - Fotografia digital do halo de inibição de crescimento de <i>P.aeruginosa</i> devido à superfície PTFEcF_Ag.	40
Figura 3.12 - Micrografias da morfologia de várias superfícies após o teste da formação do halo de inibição	41
Figura 3.13 - Micrografias da morfologia de várias superfícies após o teste da formação de biofilme.	42
Figura 3.14 - Percentagem de colónias viáveis, avaliadas pelo teste de toxicidade, para vários tempos de contacto.	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 - Designação e parâmetros de deposição dos filmes finos de PTFE	14
Tabela 3.1 - Composição química elementar determinada por XPS.....	21
Tabela 3.2 - Identificação das ligações químicas presentes na superfície dos filmes finos após desconvolução dos espectros de XPS.	24
Tabela 3.3 - Quantificação das contribuições dos grupos químicos funcionais no alvo e filmes finos de PTFE.....	25
Tabela 3.4 - Parâmetros de rugosidade superficial e espessura dos filmes finos avaliados por AFM.....	31
Tabela 3.5 - Tensão superficial, componentes polar e dispersiva dos líquidos utilizados na avaliação do ângulo de contacto.....	31
Tabela 3.6 - Valores médios e desvio padrão dos ângulos de contacto estático entre as superfícies em estudo e a água e a formamida.	33
Tabela 3.7 - Valores das energias superficiais e da interface e da variação de energia livre de Gibbs no conjunto substrato/revestimento.	35

SIMBOLOGIA E SIGLAS

Simbologia

A – secção transversal.

d – distância entre os planos cristalinos

$\frac{dl}{dp}$ – declive da curva dos valores da corrente em função da pressão

E – energia no impacto

e – carga de um eletrão

ε – constante dielétrica do eletrólito

ε_0 – permitividade em vácuo

γ_{sv} – energia livre da interface sólido-vapor

γ_{sl} – energia de superfície da interface sólido-líquido

γ_{lv} – energia livre da interface líquido-vapor

γ_L – tensão do líquido

γ_L^p – componente polar do líquido

γ_L^d – componente dispersiva do líquido

γ_s – energia de superfície do filme

γ_s^d – componente dispersiva da energia de superfície

γ_s^p – componente polar da energia de superfície

γ^0 – tensão do líquido (água)

λ – o comprimento de onda da radiação incidente

n – número inteiro

Θ – ângulo de incidência dos raios X.

θ – ângulo de contacto

τ^0 – tensão de adesão da água

V – tensão aplicada

ζ – Potencial Zeta

Siglas

AFM – Atomic Force Microscopy

ATR – Attenuated Total Reflectance

DEM – Departamento de Engenharia Mecânica

EDS – Energy Dispersive Spectrometer

FCTUC – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

FEG – Field Emission Gun

FTIR – Fourier Transform Infra Red spectroscopy

ISC – Infecções de Sítio Cirúrgico

PBS – Phosphate Buffer Solution

SEM – Scanning Electron Microscopy

TEM – Transmission Electron Microscopy

XDR – X-Ray Diffraction

XPS – X-Ray Photoelectron

INTRODUÇÃO

As infecções nosocomiais, em especial as do sítio cirúrgico, são uma adversidade para a saúde pública. Quando uma bactéria consegue colonizar um dispositivo/implante e formar biofilme, as técnicas assépticas, de esterilização, bem como a utilização de fármacos não conseguem ser eficazes na eliminação da infecção obrigando à remoção dos dispositivos. Um material que consiga impedir a colonização e tenha a capacidade de não ser tóxico para as células eucariotas, poderá ser a solução para este problema.

Para determinado tipo de implantes/próteses, tais como tendões, ligamentos ou enxertos vasculares, os materiais de eleição são os polímeros. De entre estes o poli(tetrafluoroetileno) (PTFE) é um dos mais utilizados devido à conjugação de excelentes propriedades mecânicas, quando comparado com outros polímeros, com a inércia química e biológica. No entanto, no caso de infecções nosocomiais há situações em que nem mesmo os materiais tradicionalmente considerados biologicamente inertes são seguros. Com efeito, há estirpes bacterianas que se destacam, pelo aspeto negativo, como é o caso da *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) que é um dos principais organismos gram-negativos associados com este tipo de infecções. O aumento da frequência de *P.aeruginosa* resistentes a vários fármacos (MDRPA) é preocupante dado que as opções de antimicrobianos eficazes estão severamente limitadas.

O objetivo deste trabalho foi o de desenvolver revestimentos que possam ser utilizados na modificação da superfície de PTFE maciço e lhe confira as desejadas propriedades antimicrobianas contra *P.aeruginosa*. Assim, foram desenvolvidos filmes finos, por pulverização catódica rf magnetron, de PTFE e de PTFE/poliamida (PTFE/PA) com e sem a incorporação de prata, elemento químico conhecido pela ação antibacteriana do seu ião Ag^+ .

A caracterização abiótica incluiu a avaliação da composição química superficial, dos grupos químicos funcionais, da estrutura, da morfologia/topografia, da hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, da energia de superfície, da tensão de adesão da água, do trabalho de adesão na interface substrato/revestimento e da carga de superfície. Os resultados dos testes *in vitro* efetuados em algumas dos filmes finos desenvolvidos, com e sem prata, foram comparados com o desempenho do PTFE maciço. Estes testes incluíram a avaliação da formação do halo de inibição em meio de cultura sólido, a observação da

capacidade das superfícies, em condições dinâmicas, inibirem a formação de biofilme em meio líquido, e, por último, avaliar a toxicidade das superfícies modificadas na capacidade da *P.aeruginosa* em formar colónias viáveis.

Este trabalho está organizado em três capítulos: o primeiro contém o enquadramento teórico do problema, e aborda as infeções nosocomiais, em particular a ação da *P.aeruginosa*, os materiais utilizados e as abordagens utilizadas por outros investigadores para solucionar este tipo de infeções; o segundo, onde são descritos, de uma forma sucinta, os materiais, os métodos e as técnicas utilizados no procedimento experimental; e o terceiro, onde são apresentados e discutidos os resultados do trabalho desenvolvido.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os biomateriais são materiais, metálicos, cerâmicos, poliméricos ou compósitos, de origem natural ou feitos pelo Homem, com o objetivo de complementar ou substituir as funções dos tecidos vivos do corpo humano [1]. Este conceito de utilizar materiais para melhorar/substituir uma zona lesionada já estava presente nas civilizações antigas. Com o avanço da medicina e do conhecimento dos materiais, a implementação dos biomateriais tornou-se mais eficiente e abrangente, com aplicações diversas, como suturas, próteses, ligamentos, vasos sanguíneos ou *pacemakers*. Nos últimos anos, o uso de implantes tornou-se uma prática comum que veio melhorar a abrangência dos serviços médicos prestados bem como a qualidade de vida dos pacientes [2]. No entanto, para além dos problemas inerentes à falta de compatibilidade entre o material implantado e o tecido celular hospedeiro, o crescimento exponencial de cirurgias para o implante de dispositivos médicos trouxe associado o problema da ocorrência de infeções.

1.1. Infeções nosocomiais

Um dos maiores problemas inerentes à utilização de implantes é o risco de infeções nosocomiais, especialmente de infeções de sítio cirúrgico (ISC). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças define este tipo de infeções como “*uma infeção com um prazo de 30 dias depois de uma operação ou até 1 ano se um implante é deixado no lugar e a infeção está relacionada com um procedimento operatório*” [3].

As infeções relacionadas com a implantação, permanente ou temporária, de dispositivos médicos são uma preocupação pública e um fardo económico para entidades e pacientes. Apenas para dar alguns exemplos podem ser referidos dois estudos: um efetuado no continente americano e outro no europeu. Nos Estados Unidos são implantados por ano, em média, mais de 5 milhões de cateteres venosos centrais dos quais cerca de 80000 originam infeções relacionadas com bactérias [4]. O estudo que abrangeu quatro países europeus demonstrou que as infeções relacionadas com o mesmo tipo de cateter contabilizam mais de 1000 mortes, com um custo associado de 35 a 164 milhões de euros, por ano e por país [5].

O maior risco associado a qualquer infecção bacteriana é a formação de biofilme, que pode ser definido como uma comunidade estruturada de micro-organismos que aderem a superfícies vivas ou abióticas, produzindo substâncias poliméricas extracelulares que vão funcionar como uma proteção em relação ao meio envolvente. Esta camada protetora torna as bactérias mais resistentes a agentes antimicrobianos e ao sistema imunitário, funcionando como um fator de virulência. Vários estudos revelaram que o aparecimento do biofilme é o resultado de uma série de eventos. A primeira etapa é a adesão destes microrganismos às superfícies quando ainda estão na fase planctónica, seguida pelo crescimento e proliferação de microcolónias envolvidas numa matriz extracelular de exopolímeros. Na fase planctónica, a adesão pode ser reversível ou irreversível e a resistência das bactérias a sistemas de defesa é baixa. A segunda etapa, é a fase estacionária que é caracterizada pela formação de colónias e produção da matriz extracelular polimérica. Este comportamento da colónia leva a que o filme formado se comporte como uma barreira física, que impede o normal funcionamento de agentes antimicrobianos, do sistema imunitário do hospedeiro e conduz a um microambiente com valores de pH e níveis de CO₂ distintos do restante, o que também aumenta a resistência das bactérias (Figura 1) [6,7].

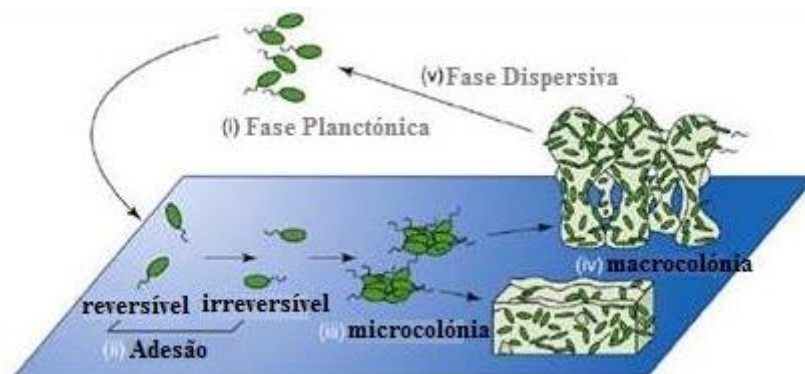


Figura 1.1 - Representação esquemática das fases da formação de um biofilme (adaptado de [7])

Quando a infecção atinge o ponto de formação do biofilme o tratamento a adotar é muito complicado e quase nunca eficaz o que implica, na maioria dos casos, a remoção do implante infetado [8]. Com efeito, após o desenvolvimento do biofilme, a medicina tradicional não tem como agir no tratamento da infecção [9], pelo que uma das vertentes a considerar para a solução destes casos passa pelo desenvolvimento de dispositivos médicos

com materiais/superfícies com capacidade de ação contra a adesão microbiana e a sua viabilidade celular [10].

1.1.1. *Pseudomona aeruginosa*

A espécie bacteriana responsável por mais infecções nosocomiais é *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), sendo por isso esta espécie considerada muito perigosa quando presente em ambiente hospitalar. As infecções causadas por esta bactéria podem desenvolver-se em diferentes regiões do corpo humano, tais como: trato respiratório, corrente sanguínea, coração, sistema nervoso central, ouvidos, olhos, ossos e ligamentos, trato intestinal e urinário e pele [11].

Esta bactéria é gram-negativa, com forma de bastonete (1-5 µm comprimento e 0,5-1,0 µm largura) e monoflagelada e possui uma versatilidade nutricional notável capaz de catabolizar uma vasta variedade de moléculas orgânicas. Este facto torna a *P. aeruginosa* num micro-organismo ubíquo, pois pode ser encontrado em ambientes tão distintos como solo, água, humanos, animais, plantas, esgotos e hospitais [12].

Esta bactéria é um agente patogénico oportunista para o ser humano pois raramente infeta indivíduos saudáveis. Está estimado que infeta cerca de dois terços dos doentes hospitalares em estado crítico, o que normalmente potencia a infeção por doenças mais invasivas. *P. aeruginosa* é, nos centros de saúde e hospitais, a campeã dos agentes patogénicos oportunistas Gram-negativos, sendo responsável por 40-60% de taxa de mortalidade e encontra-se também no topo da lista dos três mais perigosos agentes patogénicos Gram-negativos que dão origem às piores doenças oculares [13].

Este microrganismo apresenta uma capacidade de resposta excecional a diversos tipos de alterações como, por exemplo, o tratamento antimicrobiano [6]. Um caso bem estudado é o das infeções crónicas de fibrose pulmonar, onde estas bactérias adquirem uma resistência a vários antibióticos, e mesmo após terapia, a sua completa erradicação não é possível [14]. Os efeitos da infeção por *P. aeruginosa* estão profusamente descritos na literatura, sendo considerada um dos principais patogénicos em lesões cutâneas e queimaduras; 54% de todas as lesões crónicas são colonizadas por estas bactérias [15]. A capacidade de formação de biofilme por parte destes microrganismos também foi estudada, e revelou que a camada extracelular protetora se forma passado 10 e 72 horas, em testes *in vitro* e *in vivo*, respetivamente [16]. Vários estudos também demonstraram que o biofilme

destes micro-organismos os torna tolerante à maioria dos antibióticos convencionais e ao sistema imunitário, majorando o perigo das infeções causadas por *P. aeruginosa* [16,17].

1.2. Estratégias na prevenção de infeções

Como foi referido anteriormente, uma das estratégias ao combate destas infeções passa pela criação de materiais/superfícies com capacidade antimicrobiana. Uma das primeiras abordagens, efetuada desde os anos 70, é a de colocar antibióticos em cimentos ósseos de próteses cimentadas com o objetivo de conferir uma proteção bacteriana localizada [18]. Esta estratégia evoluiu posteriormente para a impregnação de antibióticos diretamente na superfície de implantes ortopédicos [19,20,21,22].

No entanto, a estratégia para lidar com uma infeção relacionada com dispositivos médicos é bastante mais complexa do que a descrita nos exemplos referidos, e tem que ter em consideração um conjunto de ações combinadas. O uso exclusivo das técnicas assépticas mais avançadas pode não eliminar totalmente o risco de contaminação. Acresce o facto de os sistemas baseados em libertação de fármacos, apesar do seu grande potencial na prevenção de infeções, possuírem problemas relacionados com a cinética de libertação do agente ativo e com a heterogeneidade da distribuição do fármaco [9]. Deve também ser considerada a diminuição de eficácia de muitos antissépticos e antibióticos, concomitantemente com o aparecimento de bactérias resistentes, pelo que se torna premente a investigação de outros agentes antimicrobianos [23] tais como o óxido nítrico [24,25], anticorpos bioativos [26], peptídeos antimicrobianos [27], alguns compostos naturais [28,29] e prata.

1.2.1. A prata

A prata no estado metálico é inerte mas, por reação com as soluções extra e intracorpóreas é ionizada [30]. As propriedades antimicrobianas dos iões prata (Ag^+) há muito que são conhecidas e, ao contrário de outros iões de metais pesados, apresentam valores baixos de toxicidade para os seres humanos [31]. Neste âmbito é destacada a sua aplicação na purificação de água, em detergentes e, como expectável, agente antimicrobiano, em cremes, revestimentos de dispositivos médicos e compressas para aplicação direta [30,31,32].

A atividade antimicrobiana de Ag^+ foi estudada nas últimas décadas e, apesar de o consenso não ser generalizado, é aceite que a prata interage com os grupos sulfidrilo presentes na superfície dos microrganismos, onde substitui os átomos de hidrogénio. Esta alteração inibe a respiração e a transferência de eletrões, colapsando a força electroprotomotriz, o que leva à morte celular. A toxicidade da prata depende da disponibilidade dos seus iões pelo que para se obter um efeito antimicrobiano longo, o ião Ag^+ tem que ser libertado devagar e continuamente [31,33].

Dado que a prata é cada vez mais utilizada em dispositivos médicos e a *P. aeruginosa* é uma das bactérias mais preocupantes a nível hospitalar, é fulcral compreender o comportamento destes microrganismos quando em contato com Ag^+ . Como foi referido anteriormente, este tipo de bactéria é tolerante a vários antibióticos [6,14,16,34]. Quando as células estão na fase planctónica, é necessária uma pequena quantidade de prata para impedir a colonização. Através de testes *in vitro*, ficou demonstrada a capacidade da prata em eliminar o biofilme de *P. aeruginosa* completamente desenvolvido [6]. Como esta bactéria é também responsável pela contaminação de fontes de água, Hwang e colaboradores [35] estudaram a possibilidade do uso de catiões de prata dissolvidos em água para inativação de *P. aeruginosa*. Este grupo concluiu que para baixas concentrações de prata, esta demonstrou capacidade antimicrobiana e que não influenciava a qualidade da água potável nem era citotóxica para as células de mamíferos. Em 2008, outro grupo de investigadores estudou a eficácia de iões de cobre conjugados com iões de prata na remoção de vários tipos de bactérias, entre elas a *P. aeruginosa*, de água potável. Este sistema demonstrou uma remoção de 99,999% para concentrações de iões de prata de 0,04 e 0,08 mg/L, em 72 e 12 horas, respetivamente [38].

1.2.2. A superfície do material

Nos exemplos até agora referidos o efeito antimicrobiano é devido a agentes que podem conferir ao material a capacidade para eliminar as infeções; tal origina uma dependência do agente a ser usado, da bactéria em causa e do meio com o qual a superfície contata. No entanto, outras abordagens podem ser ponderadas se considerarmos que o primeiro passo para ocorrer patogénese relacionada com infeções através de um corpo estranho é a adesão celular. Se as células procariotas não conseguirem aderir a uma superfície, a possibilidade de existir colonização é quase nula [10,37], e se menos bactérias

conseguirem colonizar o material, o risco de desenvolvimento de biofilme e, conseqüentemente, de infeção pode ser reduzido ou mesmo anulado [8]. A adesão de bactérias está dependente das propriedades/características associadas à superfície e que incluem a sua hidrofiliçidade, a carga de superfície, a composição química e a topografia.

A adesão de células depende da hidrofiliçidade/hidrofobicidade do material e da própria célula. No caso das bactérias, esta característica está dependente da composição química da estrutura celular externa dado que superfícies celulares hidrófilas são caracterizadas por uma razão azoto/carbono elevada, enquanto nas superfícies hidrófobas é a razão oxigénio/carbono que é elevada. A hidrofobicidade das células bacterianas também depende da espécie, da fase de desenvolvimento e do meio ambiente [8,38]. No entanto, alguns estudos relacionam genericamente a adesão microbiana com a molhabilidade pois evidenciam o facto de células com características hidrófobas se ligarem mais facilmente a superfícies que também o sejam [8,38]. No que diz respeito à carga de superfície destes microrganismos ela é, geralmente, negativa, o que indica que a ligação celular preferencial ocorre em superfícies carregadas positivamente.

Face ao exposto não é de estranhar que vários grupos de investigadores se tenham focado em desenvolver materiais com superfícies hidrófilas, com o objetivo de lhes conferir ação antibacteriana, contendo compostos como a heparina e o ácido hialurónico [39]. A utilização de cateteres urinários revestidos com heparina, por exemplo, mostrou reduzir o risco de formação de biofilme de *Proteus mirabilis* [40,41]. No entanto, e embora a heparina promova a hidrofiliçidade de superfícies, outros estudos revelaram que a incorporação deste composto pode aumentar as interações célula-célula, o que estimulou a formação de biofilme em várias linhagens de *Staphylococcus aureus* [42]. A hidrofobicidade e a carga das bactérias podem variar durante as diferentes fases de crescimento, o que implica comportamentos distintos durante a vida dos microrganismos. Assim sendo, há investigação em que se tenta o desenvolvimento de superfícies hidrófobas que mimetizam a morfologia da flor de lótus com o intuito de as tornar antiaderentes [43,44]. Ainda ao nível da vertente química há trabalhos em que a adesão bacteriana foi diminuída pela modificação de superfícies com “escovas” poliméricas de poli(etilenoglicol) (PEG) e poli(óxido de etileno) (PEO), pois produzem um efeito estérico que repela as bactérias e as proteínas [8,45].

Também a nanorugosidade e a nanotopografia condicionam a adesão celular, embora ainda não se compreenda totalmente esta interdependência. Geralmente, é assumido que superfícies menos rugosas são menos propícias à adesão celular. No entanto, na literatura há provas em contrário tais como o estudo que demonstrou que a adesão celular de *Staphylococcus epidermis* é igual em superfícies de titânio com diferentes rugosidades [46]. A relação entre a rugosidade e a adesão celular não é consensual e, se por um lado se reivindica que a rugosidade nanométrica aumenta a adesão microbiana, há trabalhos que demonstram o contrário [8]. Também a importância da nanotopografia não está completamente entendida. Inicialmente, era suposto que alterações nesta característica fossem completamente irrelevantes para a adesão microbiana. Mas, é vital compreender que uma ou várias destas propriedades/características são interdependentes e que, por exemplo, alterar a topografia ou a nanorugosidade pode implicar variações na molhabilidade dos materiais [8,23].

1.3. O poli(tetrafluoroetileno) como biomaterial

Um material com características interessantes para ser utilizado como biomaterial é o poli(tetrafluoroetileno) (PTFE). Este polímero, que foi sintetizado pela primeira vez por Pluncket em 1941 [47], é quimicamente estável, com elevado grau de ordem estrutural, grande resistência térmica, e uma excelente resistência mecânica, quando em comparação a outros polímeros [48]. Para aplicações na área da biomedicina, o PTFE consegue responder de forma positiva às condições peculiares presentes no corpo humano, como variações de pH, elevados esforços mecânicos e interações entre diferentes tipos de tecidos. O PTFE é considerado biocompatível, química e biologicamente inerte, e é utilizado como substituto de vasos sanguíneos e válvulas cardíacas, entre muitas outras aplicações [49].

No caso da utilização de PTFE como material maciço invasivo e das possibilidades de apresentar propriedades antibacterianas são vários os estudos realizados. Harvey e colaboradores estudaram a possibilidade de ligar antibióticos ao PTFE, através do uso de surfactantes, e testaram a possibilidade de uma interação entre surfactantes catiónicos e antibióticos aniônicos. O trabalho desenvolvido permitiu concluir que a concentração de fármaco se relacionava com a quantidade de surfactante, o que indicava que, dependendo do fármaco utilizado, as concentrações a utilizar variavam [50,51]. Em 1995, a equipa

liderada por Okahara desenvolveu uma técnica que fornecia uma propriedade de resistência às infeções através de antibióticos ligados ao PTFE, conseguidos pela imersão do polímero numa solução de dioxano contendo ácido láctico e o fármaco. Este trabalho conseguiu obter taxas de libertação do fármaco mais lentas dos que até então reportadas e permitiu concluir que a libertação dos agentes ligados de forma não covalente, estava relacionada com as propriedades do transportador e do agente em si, o que levava a uma alteração de cinética quando se alterava o fármaco utilizado [52]. Aumsuwan e colaboradores conseguiram ligar covalentemente diversos antibióticos, como a ampicilina e penicilina, ao PTFE, depois de quimicamente modificado com “escovas” de PEG, o que forneceu ao polímero resistência antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. thuringiensis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. putida* e *S. enterica*. Embora a quantidade de antibiótico presente na superfície do PTFE fosse inferior à conseguida por outros métodos, a mobilidade das moléculas do fármaco induziu uma resistência local superior [53,54].

No entanto, por vezes, há a necessidade de modificar, de uma forma mais permanente, a superfície dos biomateriais. De entre a variedade de técnicas disponíveis os tratamentos baseados em plasma apresentam-se como uma solução económica e eficiente, que permite a alteração das superfícies com o conjunto de propriedades/características apropriadas para alcançar a função desejada. Especificamente, a pulverização catódica (do inglês *sputtering*), para além de ser uma tecnologia limpa permite a deposição de filmes finos com boa adesão e com uma vasta gama de propriedades, função da variação dos parâmetros de deposição, e também fornece, no caso de materiais biomédicos, materiais já esterilizados no final do processo de deposição.

A pulverização catódica rádio frequência (r.f), como técnica para a deposição de filmes finos de PTFE, despertou o interesse da indústria desde a década de 70. Os filmes produzidos possuíam um coeficiente de atrito inferior ao do PTFE maciço, uma estabilidade térmica até 450°C, boa adesão ao substrato e elevados ângulos de contato, o que os tornou atrativos para as mais diversas aplicações [47,55,56].

Normalmente, as modificações do PTFE por plasma ou os filmes finos deste material são utilizados sempre que se pretende superfícies com carácter hidrófobo acentuado. Com efeito, o trabalho de Bierderman e colaboradores provou que os filmes finos de PTFE podem ter aplicações protetivas e repelentes de água, devido aos seus ângulos de contato estático altos [56]. À mesma conclusão chegou o grupo de trabalho de

Stelmashuk onde, através do aumento da pressão de deposição, conseguiram depositar filmes finos super-hidrófobos [57].

Tendo em consideração a vasta utilização do PTFE como biomaterial, as características hidrófobas da sua superfície e, apesar de ser referido na literatura como um polímero com resistência bacteriana, a probabilidade de ocorrer a formação de biofilme neste material, a combinação PTFE com Ag para aferir da sua capacidade como material antibacteriano tem sido objeto de investigação.

Com efeito, há estudos que demonstraram que a simples impregnação do material com soluções de prata é pouco eficiente pelo que a abordagem do desenvolvimento de revestimentos se afigura como mais eficiente [58]. Zhao e colaboradores desenvolveram, por deposição química, revestimentos de PTFE com Ag. Estes autores concluíram que, embora necessitassem do recurso a surfatantes para homogeneizar a distribuição de Ag, os compósitos apresentavam excelente comportamento antimicrobiano contra *E. coli* [59]. Outro grupo de investigação recorreu à irradiação por feixe de eletrões para preparar nanoestruturas de prata em PTFE tendo observado uma redução da adesão celular de *E. coli* de 99,9% em apenas 24 horas [58]. Siegel e colaboradores depositaram Ag em PTFE, através de pulverização catódica de díodo, fazendo variar os tempos de deposição. Estes autores concluíram que as alterações no tempo de deposição alteram a espessura da camada de prata, o que por sua vez vai alterar a biocompatibilidade e resistência antimicrobiana das superfícies [60]. O mesmo grupo de investigação depositou Ag em PTFE durante 1500 segundos, e sujeitou os filmes a um tratamento térmico de 100, 200 e 300°C e concluiu que este tratamento induziu a formação de aglomerados de prata à superfície do PTFE [61].

Outros investigadores estudaram a possibilidade de fabricação de compósitos de PTFE, Ag e Au por pulverização catódica rf magnetron. Do trabalho desenvolvido concluíram que os compósitos produzidos apresentavam resistência a diferentes espécies de bactérias, e que a eficiência da prata podia ser controlada pela espessura do filme [62]. Em 2013, foi desenvolvida uma superfície que consistia numa base de PTFE pulverizado por rf magnetron, com Ag nanométrica depositada como camada intermédia e uma camada superior de hexametildisiloxano (HMDSO), polimerizada por plasma, com diferentes espessuras. Estes autores concluíram que ao se alterar a camada superior, conseguia-se

controlar a liberação de íons de prata, o que permite um comportamento antimicrobiano programável [63,64].

No entanto, da literatura consultada não foi possível encontrar referências à utilização de filmes finos de PTFE com Ag em que fosse avaliado o seu desempenho contra *P. aeruginosa*. Assim, neste trabalho, o objetivo é o de modificar a superfície do PTFE com filmes finos de PTFE, com e sem a incorporação de prata, e avaliar a sua resistência microbiana a bactérias da espécie *P. aeruginosa* e compará-la com a do PTFE maciço.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Técnica de deposição

Os filmes finos foram depositados utilizando um equipamento Edwards Coating System E306A que possui três geradores de rádio frequência de 13,56MHz, que fornecem uma potência máxima de polarização aos alvos e aos substratos de 1000W e de 500W, respetivamente.

As deposições foram efetuadas a partir de um alvo de PTFE (99% de pureza), alvo de poliamida 6,6 (PA) (Goodfellow - 99,99% de pureza), ambos com 100 mm de diâmetro e 5 mm de espessura, e os gases utilizado na descarga o árgon (Ar) e o ar atmosférico (ar). As deposições foram efetuadas sobre substratos de silício (Si), aço inoxidável 316L (316L) de vidro e PTFE comercial. Antes da inserção na câmara de deposição todos os substratos foram limpos em banho ultrassons, sucessivamente em acetona e etanol, durante 10 minutos em cada líquido, e em seguida secos em corrente de ar quente. Em cada deposição, um dos substratos de silício foi parcialmente mascarado com um risco de caneta de acetato, de modo a, após destacamento, se avaliar a espessura do filme.

Após a inserção das amostras na câmara esta foi evacuada até uma pressão última de 10^{-4} Pa, tendo sido iniciado o procedimento de limpeza do alvo e dos substratos com os seguintes parâmetros: pressão de 0,7 Pa, tempo de 600 s, potência fonte de substratos de 250W (porta substratos com materiais não poliméricos) e 150 W (porta substratos com PTFE), densidade de potência (D_{dep}) do alvo de PTFE de $3,2 \times 10^{-2} \text{ W} \cdot \text{mm}^{-2}$ e no de PA de $7,6 \times 10^{-3} \text{ W} \cdot \text{mm}^{-2}$. Nos filmes finos co-depositados com prata, 8 chapas deste metal ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) foram colocadas na superfície do alvo de PTFE no local de erosão preferencial.

As condições de deposição, todas efetuadas à pressão final de 0,7 Pa, bem como as designações das superfícies, estão sumariadas na tabela 2.1

Tabela 2.1 - Designação e parâmetros de deposição dos filmes finos de PTFE

Designação	$D_{\text{dep}} \times 10^2$ ($\text{W} \cdot \text{mm}^{-2}$)		t_{dep} (s)	Gás	Prata	Arrefecimento
	PTFE	PA				
PTFEc	3,2	--	900	Ar	Não	$v=1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em vácuo
PTFEc_Ag	3,2	--	900	Ar	Sim	$v=1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em vácuo
PTFEcA*	3,2	--	900	Ar	Não	$v=1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em vácuo
PTFEcB*	3,2	--	900	Ar	Não	$v=1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em vácuo
PTFEcC*	3,2	--	900	Ar	Não	$v=1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em vácuo
PTFEcD	3,2	--	900	Ar+ar ^o	Não	Abertura logo no fim da deposição
PTFEcD_Ag	3,2	--	900	Ar+ar ^o	Sim	Abertura logo no fim da deposição
PTFEcE	3,2	--	900	Ar+ar ^o		$v=1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em ar (0,1 Pa)
PTFEcF	3,2	--	900+300 ^Δ	Ar	Não	$v=1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em vácuo
PTFEcF_A	3,2	0,76	900+300 ^Δ	Ar	Sim	$v=1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, em vácuo

*variação na pressão antes da deposição: A=apenas 1h de vácuo antes da deposição; B=apenas 0,5h de vácuo antes da deposição; C =apenas 0,25h de vácuo antes da deposição
^oAr(0,6Pa)+ar(0,1Pa)

^Δ dois alvos sempre a funcionar: 900s os substratos sobre o alvo de PTFE + 300s os substratos sobre o alvo de PA e D_{dep} do alvo de PTFE decresce para $1,3 \times 10^{-2} \text{ W} \cdot \text{mm}^{-2}$.

2.2. Técnicas de Caracterização

2.2.1. Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR – do inglês “*Fourier Transform Infra Red spectroscopy*”) permite identificar os grupos químicos funcionais presentes na superfície de um material. Esta identificação é feita através da interação de um feixe de comprimento de onda infravermelho que é absorvido pelo material e promove a vibração das ligações covalentes do material. Cada vibração é típica de um grupo funcional químico e, por comparação com valores conhecidos, é possível identificar os grupos presentes.

Neste trabalho foi utilizado um equipamento Jasco, modelo FTIR-4200 Mk II equipado com o acessório ATR (do inglês “*Attenuated Total Reflectance*”). Os espectros

foram registados com uma resolução espectral de 4cm^{-1} e uma acumulação de 64 interferogramas.

2.2.2. Espectroscopia de Fotoeletrão X

A técnica XPS (do inglês *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) explora o efeito fotoelétrico para obter informação da composição química de uma superfície. Um feixe monocromático de raios X incide na superfície de uma amostra colocada numa câmara em vácuo, da ordem de 10^{-8} Pa. Se os fótons incidentes possuírem a energia necessária provocam a emissão de um eletrão, da superfície do material, que é característico de cada elemento e de cada orbital molecular. A deteção de eletrões com energias discretas manifesta-se pelo aparecimento de picos sobrepostos sobre o fundo contínuo do espetro. Num espetro XPS a área de cada um dos picos é uma medida da quantidade relativa de cada um dos elementos presentes, enquanto a forma e a posição dos picos indicam o ambiente químico de cada elemento.

Neste estudo foi utilizado um equipamento Thermo Scientific K-Alpha ESCA equipado com fonte de raios X com radiação monocromática Al $K\alpha$ ($h\nu=1486.6$ eV). Devido à natureza não condutora das superfícies foi necessário a utilização de um canhão de eletrões (entre 0 a 14 eV) e um canhão de iões Ar de baixa energia. Os fotoeletrões foram detetados com um ângulo de 90° em relação à superfície da amostra. As medições foram efetuadas com um passo de 100 eV para o espetro geral e um passo de 20 eV para os espetros de alta resolução. A composição química elementar foi determinada usando as fotoemissões padrão Scofield. A indexação dos espetros foi feita após desconvolução e tratamento no programa CasaXPS.

2.2.3. Difração de raios X

A difração de raios X (XDR – do inglês “*X-Ray diffraction*”) permite caraterizar a ordem estrutural de um material, através da interação construtiva de um feixe de raios X com os planos cristalinos; nestas condições o feixe é difratado de acordo com a lei de Bragg:

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

em que n é um número inteiro, λ o comprimento de onda da radiação incidente, d a distância interplanar e θ o ângulo de incidência dos raios X.

O equipamento utilizado neste trabalho foi Philips X'Pert, com goniómetro PW 3020/00, com uma tensão de aceleração de 40 kV e uma intensidade de corrente de 35 mA, cujo anticátodo é de cobalto com comprimento de onda de $K\alpha_1 = 0,178896$ nm e $K\alpha_2 = 0,179285$ nm. A gama de varrimento foi de 10 a 120°, com passo de 0,08° e tempo de aquisição de 2 segundos por passo.

2.2.4. Microscopia Eletrónica de Transmissão

A microscopia eletrónica de transmissão (TEM – do inglês “*Transmission Electron Microscopy*”) permite a avaliação da microestrutura de materiais e baseia-se na transmissão de um feixe de eletrões de alta voltagem através de um material com espessura submicrométrica.

Neste trabalho foi utilizado um microscópio FEI Tecnai G² 200 kV. Os filmes finos, depositados sobre grelhas de cobre para TEM, foram observados diretamente sem qualquer tipo de preparação adicional.

2.2.5. Microscopia Eletrónica de Varrimento

A microscopia eletrónica de varrimento (SEM – do inglês *Scanning Electron Microscopy*) permite averiguar a morfologia de um material, através da incidência de um feixe de eletrões na superfície em análise. Quando ocorre o contacto do feixe com a superfície, vai ser gerada difusão, difracção e emissão de electrões da amostra que são captados por detetores apropriados. Para avaliação da morfologia as micrografias são resultado da deteção de eletrões secundários, que têm a sua origem de uma profundidade de cerca 30-50nm da superfície.

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram dois: um com filamento de tungsténio da marca JOEL modelo XL30 e outro com canhão de emissão de campo (FEG – do inglês *Field Emission Gun*) marca FEI Quanta 400FEG ESEM, ambos equipados com sistema EDS (Energy Dispersive Spectrometry) da EDAX. Esta caracterização permitiu não só a observação da morfologia, superficial e da seção transversal, mas também a morfologia e a quantidade de bactérias nas superfícies em estudo.

2.2.6. Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (AFM – do inglês “*Atomic Force Microscopy*”) permite avaliar a topografia de uma superfície e o seu funcionamento baseia-se no varrimento de uma superfície com uma ponta, e nas forças de interação repulsiva e atrativa entre a ponta e a superfície. O equipamento utilizado pode operar em três modos distintos: o modo de contacto, no qual a ponta está em contacto permanente com a superfície (forças de interação repulsivas); em modo de não contacto, em que a ponta se situa sempre a uns angströms de distância da superfície, nunca contactando com ela (forças de interação atrativas); e o modo de contacto intermitente (*tapping*) no qual a ponta intermitentemente contacta com a superfície em análise (forças de interação alternadamente atrativas e repulsivas).

Através desta técnica foi possível também avaliar a espessura dos revestimentos além de caracterizar a rugosidade das superfícies, nomeadamente através dos parâmetros: S_a , rugosidade média linear, determinada pela média aritmética do desvio da altura em relação à linha média do perfil; S_{ms} valor quadrático médio da altura da superfície em relação ao valor médio; assimetria (*skewness*), valor adimensional que indica a simetria de picos e vales da superfície em relação ao plano médio; e curtose (*kurtosis*), valor adimensional que se relaciona com a suavidade da superfície (picos e vales em forma de lomba ou em forma de escarpa).

O equipamento utilizado neste trabalho é um Veeco, modelo di Innova. As pontas utilizadas foram de Si_3N_4 , RTESPA-CP da Bruker, com frequência de ressonância, f_0 , de 291-326 kHz e constante de força, k , 20-80 Nm^{-1} .

2.2.7. Medição do Ângulo de Contacto Estático

A molhabilidade de uma superfície é definida como a tendência de um determinado fluído se espalhar ou aderir em determinada superfície e que pode ser avaliada através da medição do ângulo de contacto entre fluído e superfície. O ângulo de contacto estático é o ângulo formado pelas tangentes das interfaces líquido-sólido-gás. O conhecimento deste valor permite inferir sobre a hidrofobicidade/hidrofilicidade da superfície de um sólido, se o líquido utilizado for a água. A equação de Young permite relacionar as tensões nas interfaces:

$$\gamma_{sv} = \gamma_{sl} + \gamma_{lv} \cos\theta$$

onde θ é o ângulo de contacto; γ_{sv} a tensão da interface sólido-vapor; γ_{sl} a tensão da interface sólido-líquido e γ_{lv} a tensão da interface líquido-vapor.

Os ângulos de contacto foram medidos num equipamento DataPhysics, modelo QCA-20. Os líquidos utilizados foram a água destilada e desionizada e a formamida, e o volume de cada gota de líquido foi de 10 μ L. Este procedimento foi repetido, no mínimo, em seis locais diferentes de cada superfície, e a média das medições foi apresentada como o valor de ângulo de contacto estático.

O estudo desta propriedade também permitiu a avaliação da tensão de superfície e das suas componentes polar e dispersiva.

2.2.8. Potencial Eletrocinético

O potencial zeta (ζ) de uma superfície é uma medida da magnitude das cargas superficiais quando um sólido se encontra em contacto com um líquido. A acumulação de cargas induz a formação de uma dupla camada eletroquímica: a “camada de Stern” onde as cargas estão fixas na interface sólido/líquido e uma camada onde as cargas estão móveis. O potencial entre estas duas camadas é designado potencial zeta ou eletrocinético.

Neste trabalho foi utilizado um analisador eletrocinético SurPass, da Anton Paar GmbH. As avaliações foram efetuadas com célula fechada (“clamping cell”) e o eletrólito utilizado foi KCl 1mM, a pH fisiológico, pH=7,4. A relação entre o valor da corrente, nas condições usadas neste trabalho, e o potencial zeta é dada pela equação de Helmholtz-Smoluchowski

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

em que $\frac{dl}{dp}$ representa o declive da curva de valores da corrente em função da pressão; η representa a viscosidade do eletrólito; ε corresponde à constante dielétrica do eletrólito; ε_0 é a permissividade em vácuo; L é o comprimento do canal de medição e A a secção transversal do canal de medição.

2.2.9. Testes microbianos

Antes de qualquer um dos testes *in vitro* com células procariotas as superfícies a testar foram desinfetadas numa solução de etanol 70% (v/v) entre 15 a 20 minutos em caixas multipoços. No final deste tempo foram transferidas para caixas multipoços, novas e esterilizadas, e foi permitida a evaporação total do álcool.

Também em todos os testes o pré-inóculo de *P.aeruginosa* foi preparado, durante a noite, em meio líquido Luria-Bertani (LB), a 37°C e 150 rpm.

2.2.9.1. Avaliação da toxicidade

A cada superfície em estudo foi adicionado 1 mL de uma solução de NaCl 0,85% (p/v) e colocadas a 37°C, durante 24 horas, com agitação de 150 rpm. Ao fim de 24 horas foi efetuada uma suspensão do pré-inóculo de bactéria com a solução de NaCl (que esteve em contacto com cada uma das superfícies) com uma $DO_{600nm}=0,5$. Ao fim de tempos bem determinados (t=0, t=1 e t=4h) foram retirados 100 µl de cada poço, fizeram-se diluições seriadas e finalmente as suspensões inoculadas em caixas de Petri com meio sólido LB. Entre cada tempo, as caixas foram colocadas a 37°C e 150 rpm. As caixas de Petri foram incubadas durante 24h a 37°C e, findo o tempo, as colónias foram contadas para assim determinar as taxas de mortalidade. Como controlo foi efetuada a mesma metodologia com solução de NaCl sem ter contactado com as superfícies em estudo. Cada superfície foi estudada em duplicado e cada diluição foi incubada em triplicado.

2.2.9.2. Formação de biofilme

Neste teste foi avaliada a capacidade do micro-organismo formar biofilme nas superfícies em estudo.

O pré-inóculo de *P.aeruginosa* foi inoculado em novo meio de cultura com densidade óptica, $DO_{600nm}=0,08$ e, em seguida, 2 mL do meio de cultura foram inoculados, em cada poço contendo as superfícies em estudo, durante 24 horas a 37°C e a 150 rpm.

No final do teste as superfícies foram fixadas quimicamente e desidratadas para observação por SEM. Cada superfície foi lavada duas vezes com 2 mL de solução tampão

PBS (do inglês – *Phosphate Buffer Solution*) estéril, à temperatura ambiente, a 150 rpm e durante 10 minutos. De seguida, as superfícies foram transferidas para novas caixas multipoços e foram adicionados 2 mL de uma solução de glutaraldeído 5% (v/v) a cada poço e foram agitadas, à temperatura ambiente, a 150 rpm, durante 10 minutos. As amostras foram novamente transferidas para novas caixas multipoços e sofreram o processo de desidratação por contato, durante 5 minutos por solução, com 2 mL soluções (v/v) com teores crescentes de etanol, 25%, 50%, 75% e 100%.

Devido à natureza não condutora das superfícies estas foram revestidas, por pulverização catódica, com 30 nm de ouro imediatamente antes da observação em SEM.

2.2.9.3. Formação do halo de inibição

O objetivo deste teste foi o de averiguar a capacidade antimicrobiana das superfícies quando colocadas em meio sólido inoculado com a estirpe bacteriana teste.

Com o pré-inóculo de *P.aeruginosa* foi efetuada uma suspensão em solução de NaCl 0,85% (p/v), com uma DO=0,5 na escala de McFarland, e 100 µL foi inoculada em caixas de Petri com meio LB sólido. As superfícies de interesse foram colocadas em contato com o meio inoculado e as caixas de Petri incubadas durante 24 horas a 37°C. Ao fim deste tempo as caixas foram observadas para aferir da existência ou não do halo de inibição. Como complemento a esta observação as superfícies foram preparadas para observação em SEM, de acordo com o protocolo descrito na alínea anterior.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição química e grupos funcionais

A composição química da superfície dos filmes finos foi determinada por XPS (tabela 3.1). A relação F/C, que no material maciço é de 2, indica que, qualquer que seja a conjugação de parâmetros de deposição, os filmes finos são deficientes em flúor. Este facto era expectável pois foi observado em trabalhos anteriormente efetuados no grupo de Nanomateriais e Microfabricação do CEMUC (GNM) [65,66] e ocorre devido à natureza da pulverização a partir de alvos poliméricos onde é observada a ejeção, não de átomo a átomo, mas de pequenos fragmentos, que no caso do PTFE são do tipo CF_x. Estes podem sofrer recombinação tanto durante o percurso no plasma como após a sua chegada ao substrato dando origem a cadeias curtas, ramificadas e insaturadas [67]. Deve ser ainda referido o facto de que a formação de ligações insaturadas é energeticamente mais favorável do que a de uma ligação simples ($\Delta H^0_{C=C} = 614$ kcal/mol; $\Delta H^0_{C=O} = 799$ kcal/mol; $\Delta H^0_{C-F} = 485$ kcal/mol [68]).

Tabela 3.1 - Composição química elementar determinada por XPS.

Superfície	Composição química (% at.)					
	C	O	N	Ag	F	F/C
PTFEc	45,8	3	-	-	51,2	1,1
PTFEc_Ag	42,5	1,2	-	0,8	55,5	1,3
PTFEcB	47,9	3,6	-	-	48,5	1,0
PTFEcD	46,3	3,0	0,8	-	49,9	1,1
PTFEcD_Ag	45,3	1,7	1,0	1	51,0	1,1
PTFEcF	67,8	7,7	2,3	-	22,2	0,3
PTFEcF_Ag	68,7	6,5	4,7	0,9	19,2	0,3

No caso específico das superfícies designadas por PTFEcF, com ou sem prata, a relação F/C é particularmente baixa devido ao facto de o processo de deposição ser

efetuado a partir de dois alvos poliméricos, PTFE e PA, e o período final da deposição (300 s) ocorrer com os substratos sobre o alvo de PA, levando à incorporação de C e N em detrimento de F. Acresce o facto de, dado que a técnica de XPS dá informação sobre a composição química da superfície (a profundidade de análise é de cerca de 10 nm), ser natural que nestas superfícies a deficiência de F seja mais acentuada. Com efeito, a análise da composição química em profundidade do filme PTFEcF (Figura 3.1) evidencia este facto, sobretudo pelo perfil da composição de flúor que aumenta da superfície para o interior do filme.

O teor de prata nos filmes finos depositados com o propósito de incorporar este elemento metálico é muito semelhante dado que o número de pastilhas de Ag utilizadas e os principais parâmetros de deposição são os mesmos.

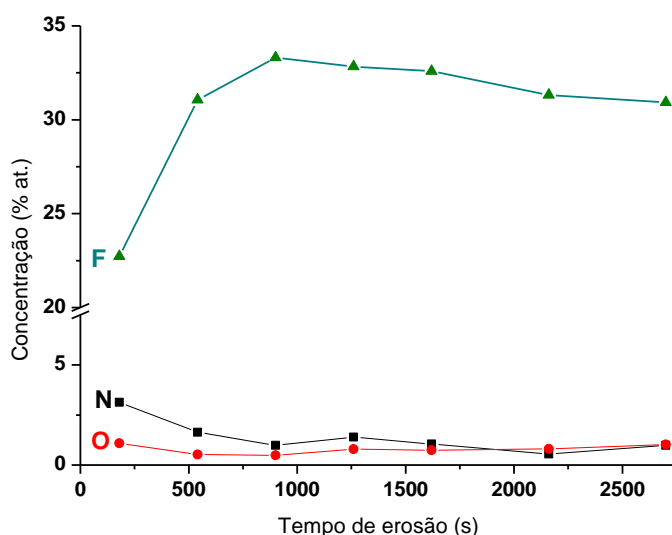


Figura 3.1 - Composição química em profundidade do filme PTFEcF; do qual foi retirado o perfil do carbono de modo a tornar mais evidente o perfil dos outros elementos químicos.

A desconvolução de todos os espectros de alta resolução de XPS (Apêndice A) foi efetuada com recurso ao programa “CasaXPS” e na figura 3.2 é dado um exemplo do tratamento efetuado. A análise ao tratamento efetuado permitiu identificar o tipo de ligação presente na superfície de cada filme tal como se encontra resumido na tabela 3.2.

A análise às superfícies revela a presença de azoto nas superfícies resultantes da codeposição de PTFE e PA, tal como seria de esperar, bem como nos filmes PTFEcD e PTFEcD_Ag. Nestes últimos casos a inserção destes grupos é devida ao facto de a deposição ser efetuada numa mistura Ar+ar e, imediatamente após a deposição, a câmara

ter sido aberta. No entanto, e apesar de muitas vezes a presença de ar estar associada à incorporação de oxigénio, considerando que o ar atmosférico é constituído por uma razão N_2/O_2 de cerca de 3:1 e que o valor da entalpia média de formação das ligações C-N e C-O é semelhante ($\Delta H^0_{C-N}=305$ kcal/mol; $\Delta H^0_{C-O}=350$ kcal/mol, [68]) o fator concentração é predominante o que leva à incorporação de azoto.

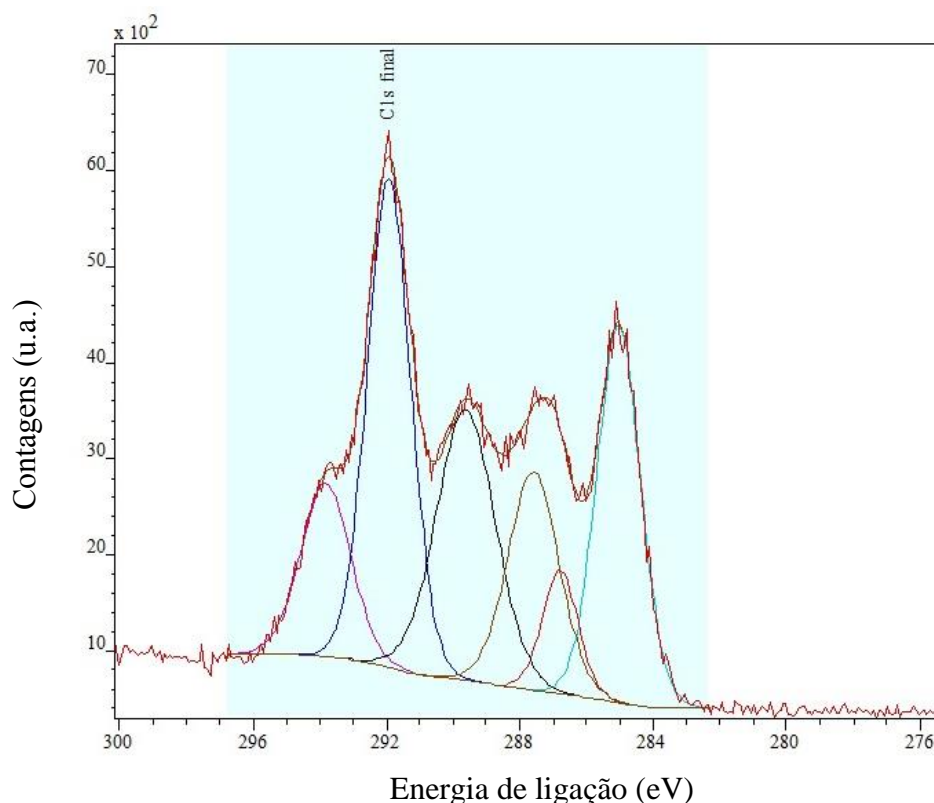


Figura 3.2 - Desconvolução do espectro de alta resolução de C1s da superfície PTFEc

Da caracterização efetuada deve ainda ser realçado o facto de a incorporação da prata se efetuar sob a forma de prata metálica o que implica que para que este elemento consiga apresentar propriedades antibacterianas deve, de acordo com a literatura [30], sofrer oxidação de modo a poder libertar Ag^+ . Da análise dos resultados é também evidente a presença de ligações insaturadas tal como a razão C/F da tabela 3.1e o relatado na literatura tinham já indicado.

Tabela 3.2 - Identificação das ligações químicas presentes na superfície dos filmes finos após desconvolução dos espectros de XPS.

	PTFEc	PTFEcAg	PTFEcB	PTFEcD	PTFEcDAg	PTFEcF	PTFEcFAg	Ref
C-F ₃	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[67,69]
C-F ₂	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[67,69]
C-F		✓	✓	✓	✓	✓	✓	[67,69]
C-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[67,69]
C/C-H								[67,69]
C=O	✓	✓	✓		✓	✓	✓	[67,69]
O-C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	[67,69]
Ag-Ag		✓			✓		✓	[62]
C-N				✓	✓	✓	✓	[70]
N-H				✓	✓	✓	✓	[71]

Devido ao constrangimento da técnica de XPS, de apenas fornecer a composição química dos 10 nm mais superficiais dos filmes finos, a análise foi complementada pela caracterização por FTIR, que permite avaliar os grupos químicos funcionais presentes em todo o revestimento. O PTFE maciço (figura 3.3a) apresenta um espectro de FTIR com picos bem definidos, característicos de materiais com ordem estrutural, enquanto os filmes (Apêndice B) têm espectros caracterizados por picos mais largos e com menor definição, associados a materiais com baixa ordem estrutural (figura 3.3b).

A identificação dos grupos funcionais foi efetuada após desconvolução, no programa “*Origin*”, da gama característica dos grupos químicos presentes no PTFE e após comparação das vibrações características com as apresentadas na literatura (Anexo A). A contribuição quantitativa de cada grupo funcional foi calculada dividindo a área do respectivo pico pelo somatório das áreas dos picos característicos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Quantificação das contribuições dos grupos químicos funcionais no alvo e filmes finos de PTFE.

Banda (cm ⁻¹)	Contribuição do grupo químico funcional (%)										
	Alvo	PTFE c	PTFEc Ag	PTFEc A	PTFEc B	PTFEc C	PTFEc D	PTFEcD Ag	PTFEc E	PTFEc F	PTFEcF Ag
-NH (686)	--	--	--	--	--	--	2,9	0,8	0,8	0,3	15,3
-CF ₃ (980)	2,1	1,1	0,8	0,4	1,7	0,2	1,4	2,5	1,5	1,6	0,8
-CF _x (1,2,3) (1038)	--	8,2	0,8	4,6	--	2,0	1,4	20,6	0,3	0,8	--
>CF ₂ (1151)	46,6	37,3	16,5	--	11,9	35,3	18,1	27,1	42,9	6,1	6,4
>CF ₂ (1210)	42,9	6,8	10,7	50,9	55,1	4,2	17,0	14,2	--	3,8	3,4
≡ C-F > CF ₂ (1340)	--	--	11,6	--	2,9	19,5	--	2,7	2,4	33,1	0,2
-N* (1538)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2,7	--
> C=CF (1626)	--	4,2	1,7	0,9	--	--	0,6	1,2	--	0,8	--
>C=O (1636)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,8	2,0
>C=O (1709)	--	5,9	0,8	9,4	--	--	1,2	--	6,5	0,2	--
-CF=CF- (1730)	--	0,6	0,8	--	--	11,1	1,7	--	--	0,2	0,2
-COOH (1776)	--	--	1,2	2,3	--	0,4	1,2	--	--	0,2	--
-CF=CF ₂ (1787)	--	--	0,6	--	--	--	--	--	--	0,2	0,2
-CF=O (1883)	--	7,9	21,5	--	1,0	0,7	2,9	9,9	--	3,7	0,3
-CF=C=CF (1959)	--	4,0	8,3	0,9	1,9	1,5	1,2	1,4	22,6	2,2	17,5
-C-O- (2932)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2,2	2,4
-NH (3299)	--	--	--	--	--	--	3,2	2,1	3,8	21,1	7,4
- O-H (2900-3500)	8,4	24,0	24,8	30,7	25,4	25,3	47,4	17,7	19,2	20,1	44,0

N* - amida monosubstituída

Deste estudo é evidente que os filmes finos têm incorporação de grupos químicos funcionais que não existem no material maciço. Acresce que, tal como esperado, os filmes apresentam ligações insaturadas que, como foi referido, são maioritariamente responsáveis pela deficiência de flúor. As terminações das cadeias são efetuadas, para além dos grupos CF₃ que normalmente ocorrem no PTFE maciço, por grupos tais como >C=O e -CF=CF₂.

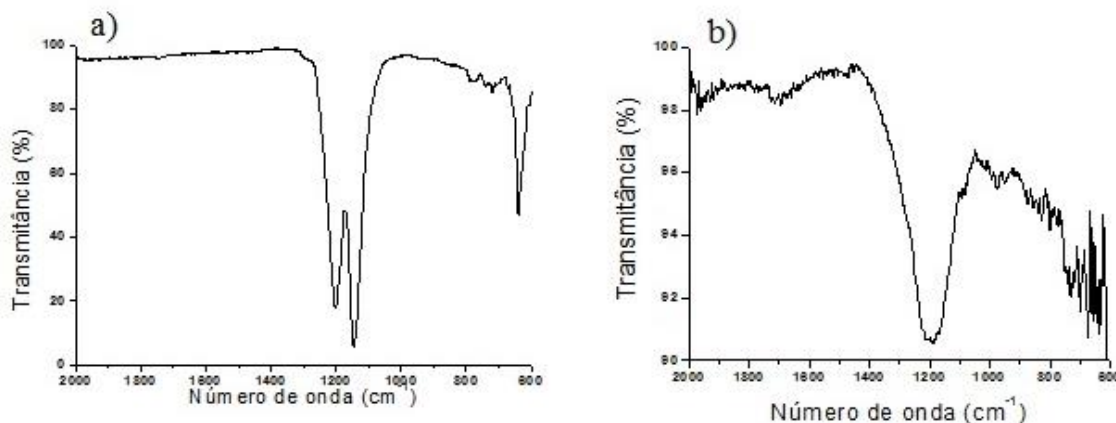


Figura 3.3 - Espectros FTIR do alvo de PTFE(a) e do filme fino PTFEc(b).

3.2. Análise Estrutural

A estrutura dos filmes finos de PTFE foi determinada tendo em conta os resultados da difração de raios X (figura 3.4) e TEM (figura 3.5).

Na figura 3.4 são comparados os difractogramas do alvo de PTFE e do filme designado por PTFEcE. O alvo de PTFE apresenta ordem estrutural, o que é usual no PTFE maciço, dado que é um dos polímeros com maior percentagem de cristalinidade [73] contrariamente aos filmes finos depositados por pulverização catódica, e do qual é exemplo o PTFEcE, o que está de acordo com o reportado na literatura [47,73].

A caracterização por TEM veio confirmar a baixa ordem estrutural dos filmes depositados sem prata (figura 3.5a) e nos codepositados com o elemento metálico são evidentes zonas mais escuras de dimensões nanométrica (figura 3.5b). Estas zonas correspondem a material com maior densidade eletrónica, ou seja, correspondem à distribuição de Ag de dimensões nanométricas na matriz amorfa de PTFE. Assim, os filmes finos codepositados com prata podem ser considerados nanocompósitos, o que está de acordo com trabalhos realizados não só no Grupo GNM como em outros laboratórios [62].

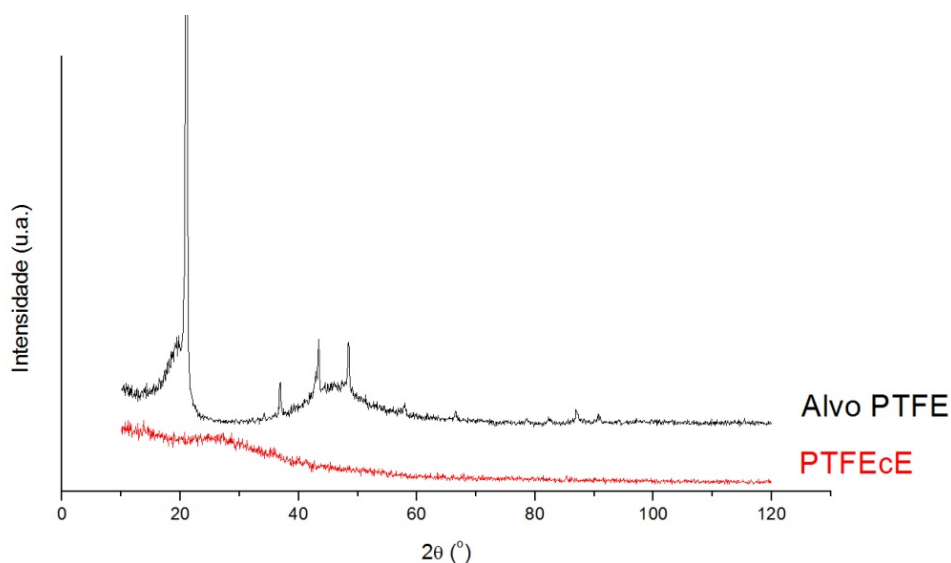


Figura 3.4 - Difratomogramas do alvo de PTFE e do filme fino PTFEcE.

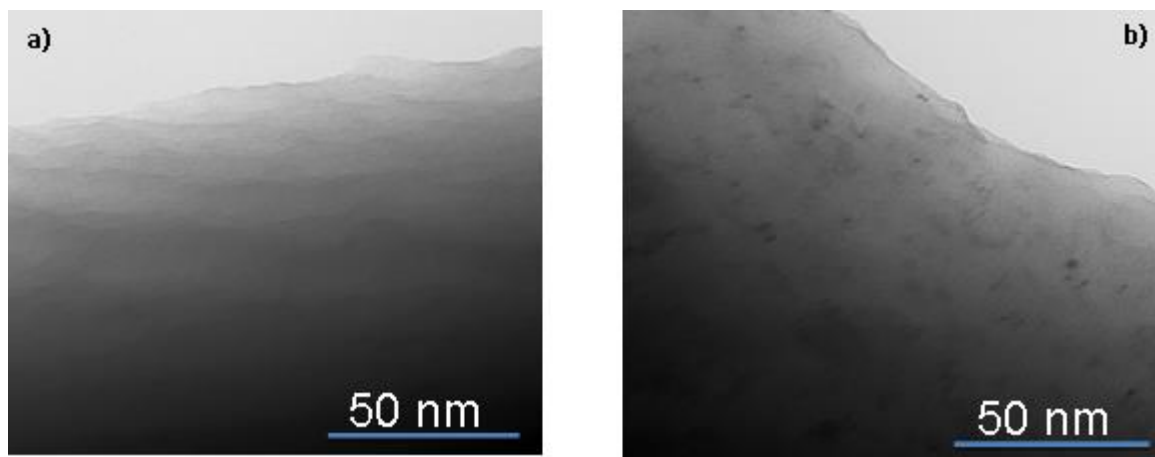


Figura 3.5 - Imagens TEM em campo claro dos filmes PTFEcF(a) e PTFEcF_Ag(b).

3.3. Morfologia/Topografia

A morfologia da superfície e da secção transversal de todos os filmes finos foi observada em SEM (Apêndice C). Na figura 3.6 estão as micrografias da superfície e secção transversal dos filmes PTFEc e PTFEcB. As imagens referentes à secção transversal evidenciam o facto dos filmes finos não possuírem morfologia aparente, pois as secções apresentam-se densas e sem porosidade, o que é característico de material sem ordem estrutural, especialmente nos filmes finos de material polimérico depositados por

pulverização catódica. As imagens das superfícies mostram que os diferentes parâmetros de deposição promovem alterações na morfologia dos filmes.

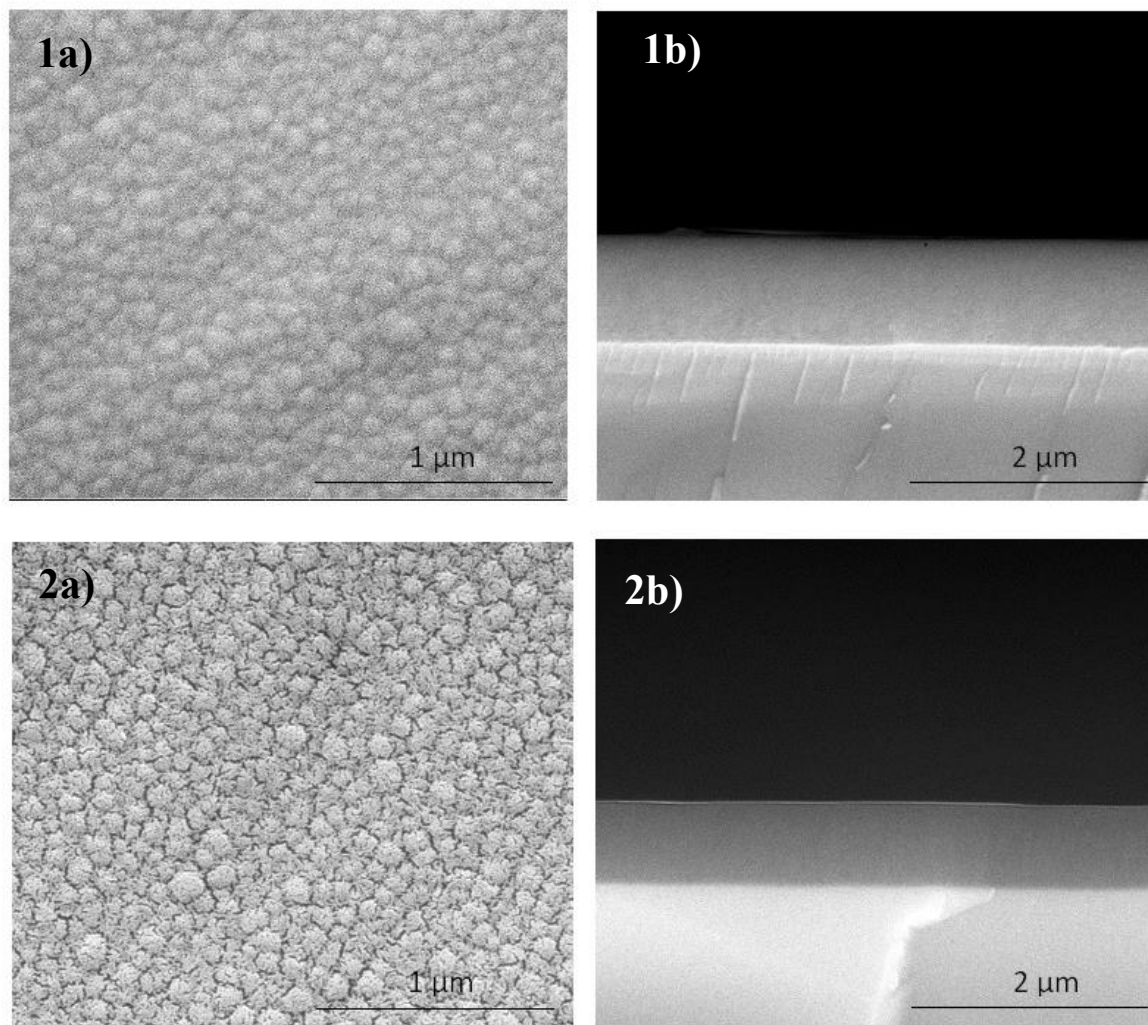


Figura 3.6 - Micrografias da superfície (a) e da secção transversal (b) dos filmes PTFEc(1) e PTFEcB(2).

De forma a compreender melhor as alterações induzidas na topografia superficial, todos os filmes foram caracterizados por AFM (Apêndice D). O modo de análise utilizado foi “*tapping*” que permite a aquisição, em simultâneo, das imagens topográficas e de fase, sendo estas consequência da variação entre a fase de oscilação sinusoidal do *cantilever* ao percorrer a superfície e o sinal nele [74]. Através da análise das imagens de fase é possível identificar e diferenciar regiões da superfície do filme que interajam de modo distinto com a ponta.

Na figura 3.7 estão apresentadas as imagens topográficas e de fase das superfícies PTFEcF, com e sem prata. As imagens topográficas evidenciam superfícies muito distintas: enquanto que no filme fino sem prata há uma topografia “ondulada” a superfície

PTFEcF_Ag é mais nivelada. As respetivas imagens de fase mostram que na superfície sem prata é evidente a presença de dois componentes que interagem de modo distinto com a superfície; dado que os substratos foram colocados sobre a PA nos últimos 300 s de deposição as zonas mais escuras na imagem de fase devem corresponder aos aglomerados deste polímero. A codeposição destes dois polímeros com prata dá origem a uma superfície mais nivelada onde deixa de ser possível distinguir, na imagem de fase, cada um dos materiais poliméricos.

A análise das imagens de AFM foi feita pelo programa *Gwyddion* que também permitiu determinar a espessura dos filmes e os parâmetros de rugosidade das superfícies (Tabela 3.4). Os valores de espessura são semelhantes, há a exceção dos filmes finos PTFEcD e PTFEcF_Ag. No caso do primeiro, a atmosfera de deposição, que é reativa, e as condições de arrefecimento, abertura da câmara mal finalizada a deposição, têm como consequência o aumento da espessura do filme. O facto de a deposição ser feita em atmosfera reativa implica que, após a ejeção de material do alvo, os radicais formados não formem ligação intermoleculares (reticulação) nem intramoleculares (insaturação) pois ligam-se às espécies reativas do gás de deposição [75]. Este facto implica que o rendimento de ejeção se mantenha durante toda a deposição ao invés de ser dificultada pela presença de ramificações e insaturações no alvo, o que acontece quando a deposição decorre em atmosfera inerte. Acresce o facto de o filme PTFEcD, ao ser exposto imediatamente após o fim da deposição à atmosfera ambiente, pode completar as ligações pendentes com as espécies gasosas a que está exposto, ao invés do que acontece quando o arrefecimento se dá em vácuo. No caso do filme PTFEcF_Ag, aparentemente, a área de alvo de PTFE que fica coberto pelas pastilhas de Ag, e que não contribui para a ejeção de material polimérico, conjuntamente com a presença de um maior número de espécies no plasma (devido à codeposição de PA) contribuem decisivamente para a brusca diminuição da espessura deste filme fino. De acordo com o que foi observado nas imagens de fase, esta deve também ser a razão pela qual esta superfície apresenta uma distribuição mais uniforme de PA, o que também corrobora o maior teor em N tal como determinado por XPS.

Os parâmetros de rugosidade, S_a e S_{ms} , evidenciam que todos os filmes finos apresentam rugosidade superficial nanométrica sendo que, para as superfícies sem prata, o filme com menor rugosidade é o filme PTFEc. A incorporação de prata nas superfícies ou não produz alterações significativas (caso da superfície PTFEc) ou então contribui para

uma redução dos parâmetros de rugosidade. No entanto, os parâmetros adimensionais, designados por *skew* e *kurtosis*, permitem entender melhor o tipo de superfície característico de cada filme fino.

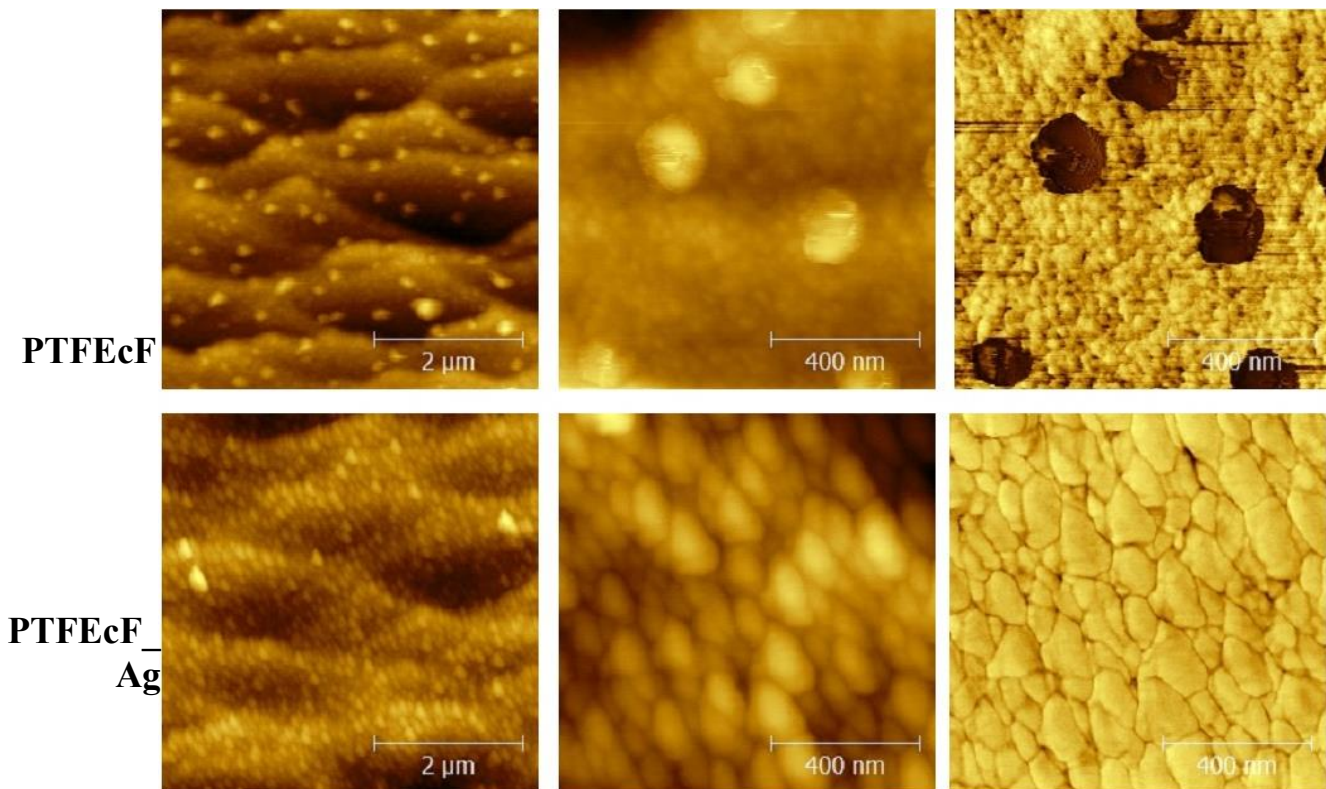


Figura 3.7 - Imagens topográficas (a,b) e de fase (c) das superfícies PTFEcF e PTFEcF_Ag.

Valores de *skew* negativos indicam que os vales são dominantes na área analisada e valores positivos indicam que os picos são dominantes. No caso do *kurtosis*, a superfície também apresenta características específicas de acordo com o valor deste parâmetro: para valores superiores a 3 a superfície os picos e vales têm perfil pontiagudo; para valores inferiores a 3 o perfil de vales e picos é arredondado e para valores iguais a 3 a superfície é perfeitamente aleatória [76]. No caso das superfícies em análise, todos os valores de *kurtosis* são inferiores a 3 indicando perfis arredondados. Para os filmes finos sem prata todos apresentam valores de *skew* positivos, com exceção de PTFEcA e PTFEcB, indicando que a topografia destas superfícies é essencialmente constituída por picos de perfil arredondado. A incorporação de prata induz o aparecimento de superfícies com mais vales de perfil arredondado [76].

Tabela 3.4 - Parâmetros de rugosidade superficial e espessura dos filmes finos avaliados por AFM.

Superfície	Parâmetros de rugosidade				Espessuras (nm)
	Sa (nm)	Sms (nm)	Skew	Kurtosis	
PTFE	78,0	89,0	--	--	--
PTFEc	23,1	27,6	0,002	-0,727	850 - 900
PTFEc_Ag	34,2	43,1	-0,287	0,299	1100 - 1190
PTFEcA	70,4	82,7	-0,073	-0,950	700 - 900
PTFEcB	40,6	49,6	-0,061	-0,669	710 - 790
PTFEcC	92,7	112,5	0,056	-0,628	700 - 800
PTFEcD	90,7	104,6	0,158	-1,180	1200 - 1500
PTFEcD_Ag	28,3	33,7	-0,131	-0,551	1200 - 1300
PTFEcE	67,7	80,4	0,232	-0,791	1170 - 1280
PTFEcF	39,5	46,5	0,001	-0,960	900 - 1000
PTFEcF_Ag	13,1	16,6	-0,313	0,267	320 - 350

3.4. Molhabilidade

O desempenho in vivo de um material está dependente do seu comportamento quando em contato com os fluídos do corpo humano. Para compreender e melhor avaliar a molhabilidade das superfícies foi medido o ângulo de contacto estático. Este foi determinado entre as superfícies em estudo e dois líquidos a água e a formamida, cujos valores de tensão superficial, e respetivas componentes polar e dispersiva, estão apresentados na tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Tensão superficial, componentes polar e dispersiva dos líquidos utilizados na avaliação do ângulo de contacto.

Líquido	Tensão superficial ($\text{mJ}\cdot\text{m}^{-2}$)		
	γ_L^p	γ_L^d	γ_L
Água	51,0	21,8	72,8
Formamida	39,5	18,7	58,2

3.4.1. Avaliação do ângulo de contacto estático

Um método para averiguar a hidrofobicidade/hidrofilicidade de um material é a medição do ângulo de contacto estático (θ) entre a sua superfície e uma gota de água. O material é considerado hidrófobo quando o ângulo é superior a 65° ou 90° , consoante a área de investigação dos autores reportados na literatura, e para ângulos inferiores a este(s) valor(es) é considerado hidrófilo. Na tabela 3.6 estão apresentados os valores médios dos ângulos de contacto medidos.

O PTFE é um polímero hidrófobo [48,58] e este facto é confirmado nos valores dos ângulos de contacto estático do material maciço e do filme fino de PTFE (PTFEc) [67]. Os filmes finos que foram depositados em condições que induziram a incorporação de grupos químicos funcionais com características hidrófilas (PTFEcA a PTFEcE) apresentam ângulos de contacto inferiores, mas acima de 100° , o que os classifica como hidrófobos. Neste conjunto de filmes a presença de Ag aumenta o ângulo de contacto relativamente à superfície sem a incorporação do elemento metálico. No caso dos filmes finos designados por PTFEcF, com e sem prata, devido ao facto de os últimos 300 s de deposição ocorrerem com os substratos diretamente colocados sobre o alvo de PA, faz com que o ângulo de contacto, na superfície sem prata, seja de cerca de 90° , sendo que esta descida é devida ao facto de o PA ser um polímero com características mais hidrófilas do que o PTFE. A incorporação de Ag provoca uma descida significativa do valor do ângulo de contacto que apresenta valores semelhantes aos do PA maciço. Tal facto pode ser devido, mais uma vez, à diminuição da área do alvo de PTFE capaz de sofrer pulverização, devido à presença das pastilhas de Ag, concomitantemente com a codeposição de PA [60].

3.4.2. Energia superficial

Após a medição dos valores do ângulo de contacto estático com dois líquidos foi possível medir a energia superficial através das equações:

$$\gamma_S = \gamma_S^d + \gamma_S^p$$

$$\gamma_L (1 + \cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p}$$

onde γ_S , γ_S^d , γ_S^p , γ_L , γ_L^d , γ_L^p e θ representam, respetivamente, a energia superficial do filme, a componente dispersiva da energia superficial, a componente polar da energia superficial, a tensão do líquido, a componente dispersiva da tensão do líquido, a

componente polar da tensão do líquido e o ângulo de contacto estático medido para cada líquido.

Tabela 3.6 - Valores médios e desvio padrão dos ângulos de contacto estático entre as superfícies em estudo e a água e a formamida.

Superfícies	Ângulo de contato estático (°)	
	Água	Formamida
PTFE	116 ± 2	86 ± 3
PA	66 ± 2	29 ± 1
PTFEc	113 ± 4	101 ± 1
PTFEcAg	118 ± 4	92 ± 4
PTFEcA	108 ± 3	100 ± 3
PTFEcB	104 ± 3	99 ± 2
PTFEcC	107 ± 2	97 ± 3
PTFEcD	107 ± 2	87 ± 2
PTFEcDAg	122 ± 3	96 ± 1
PTFEcE	107 ± 2	90 ± 3
PTFEcF	93 ± 3	79 ± 1
PTFEcFAg	67 ± 1	42 ± 2

Na figura 3.8 estão representadas as energias superficiais das superfícies, como sendo a soma das respetivas componentes polar e dispersiva. O PTFE maciço apresenta uma componente dispersiva alta, enquanto a componente dispersiva é baixa o que é expectável num material com elevada estabilidade química. No filme fino PTFEc, apesar da energia de superfície diminuir em relação ao PTFE, a sua componente polar aumenta, consequência da incorporação de grupos funcionais com reatividade química. Para o conjunto de superfícies em que se fez variar a pressão última antes da deposição, PTFEcA, PTFEcB e PTFEcC, não é visível uma relação direta, sendo apenas possível afirmar que a maior relação componente polar/dispersiva foi conseguida para o filme fino PTFEcB. Aliás, este conjunto de superfícies é a que, no global, apresenta uma maior contribuição da componente polar para a energia de superfície total de todas as superfícies estudadas. Nem a deposição em atmosfera reativa, nem a codeposição com PA consegue contribuições relativas tão elevadas. A incorporação de Ag nos filmes finos de PTFE e PTFE/PA induz poucas alterações na relação entre as componentes da energia superficial das mesmas superfícies sem prata. No entanto, o facto de a energia superficial total dos filmes PTFEcD, e F, com e sem prata, ser superior indica superfícies com menor estabilidade química e,

portanto, maior reatividade. Esta observação é importante pois a prata foi incorporada sob a forma metálica, de acordo com os resultados de XPS; tal implica que tenha que sofrer oxidação para libertar Ag^+ , espécie química à qual são atribuídas propriedades antimicrobianas. Esta sucessão de acontecimentos é facilitada em superfícies com maior reatividade, isto é, com maior energia de superfície e com maior componente polar; no caso das superfícies nanoestruturadas com prata a que apresenta melhores características é a PTFEcF_Ag.

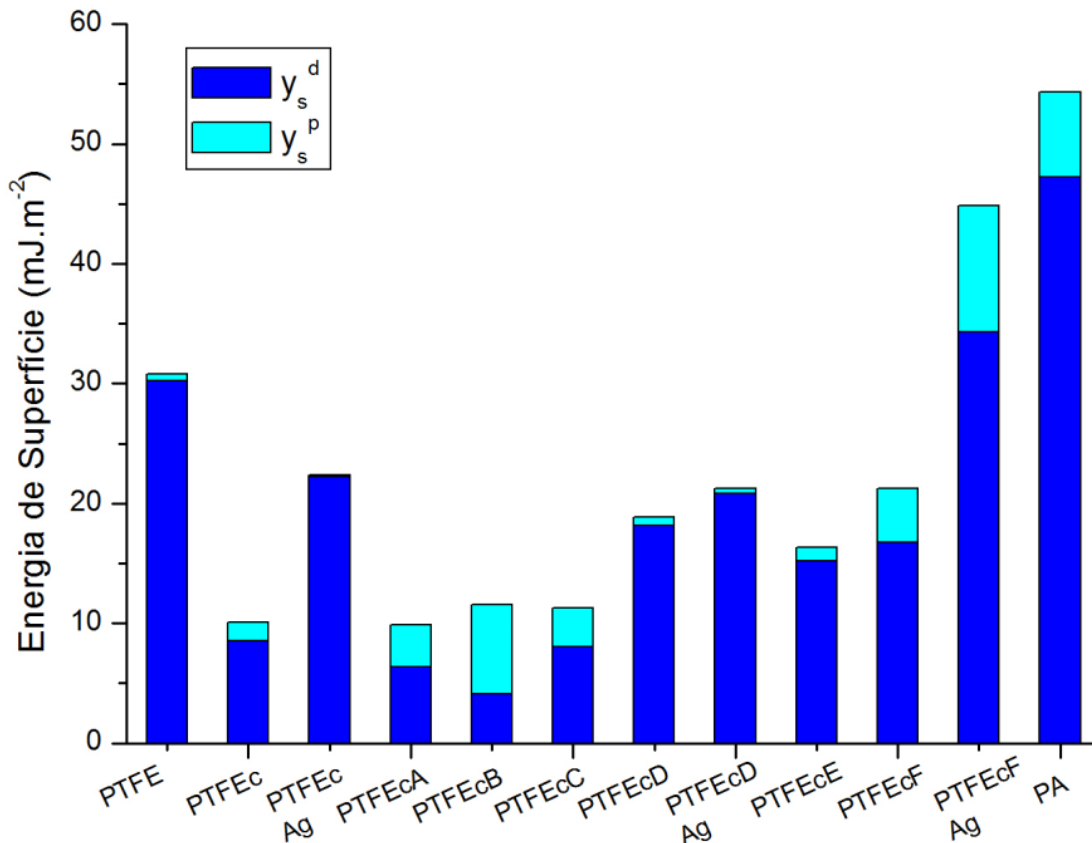


Figura 3.8 - Valores da energia de superfície (γ_s) representada pelo somatório das componentes dispersiva (γ_s^d) e polar (γ_s^p).

Após calcular a energia de superfície dos filmes, foi possível também calcular a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) que é uma medida da adesão, entre filme fino e substrato, de acordo com as equações

$$\Delta G_{12} = -Wa = \gamma_{12} - \gamma_1 - \gamma_2$$

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2(\gamma_1\gamma_2)^{\frac{1}{2}}$$

onde, W_a é o trabalho de adesão, γ_1 e γ_2 a energia de cada um dos componentes do sistema, substrato e filme respetivamente, e γ_{12} a energia da interface entre os componentes [65]. Deste modo foi possível avaliar, de uma forma indireta, a adesão entre os revestimentos e o substrato de PTFE, sem recorrer aos testes físicos convencionais que poderiam danificar o polímero. Os resultados sumariados na tabela 3.7 indicam que há adesão entre os filmes finos e a superfície de PTFE, tal como seria esperado dado que há uma continuidade química entre substrato e revestimento, evitando assim os problemas associados às interfaces entre materiais dissimilares.

Tabela 3.7 - Valores das energias superficiais e da interface e da variação de energia livre de Gibbs no conjunto substrato/revestimento.

Superfícies	γ_1 (mJ.m ⁻²)	γ_2 (mJ.m ⁻²)	γ_{12} (mJ.m ⁻²)	ΔG_{12} (mJ.m ⁻²)
PTFE	30,8	--	--	--
PTFEc	--	10,1	5,7	-35,2
PTFEcAg	--	22,3	0,7	-52,4
PTFEcA	--	9,9	5,8	-34,9
PTFEcB	--	11,6	4,6	-37,8
PTFEcC	--	11,3	4,8	-37,2
PTFEcD	--	18,9	1,4	-48,2
PTFEcDAg	--	21,2	0,9	-51,1
PTFEcE	--	16,4	2,3	-44,9
PTFEcF	--	21,3	0,9	-51,2
PTFEcFAG	--	44,8	1,3	-74,3

3.4.3. Tensão adesão da água

Quando um material é concebido para estar em contacto com fluídos humanos é oportuno avaliar a tensão de adesão da água, τ^0 , pois inclui o papel biofísico da água o que permite prever a resposta biológica aos materiais inseridos no organismo [77]. Na literatura o valor que determina a capacidade de um material conseguir suportar a adsorção de proteínas sem iniciar a cascata de coagulação, responsável pela formação de trombos, é de $\tau^0 = 30 \text{ mJ.m}^{-2}$ e é designado por limite de Berg. Apenas as superfícies que possuam valores inferiores aos deste limite, teoricamente, são capazes de adsorver proteínas sem desencadear a resposta biológica adversa. O cálculo deste parâmetro é efetuado multiplicando a tensão da água (γ^0) pelo cosseno do ângulo de contacto estático correspondente ($\cos\theta$),

$$\tau^0 = \gamma^0 \cos\theta.$$

Na Figura 3.9 estão os valores da tensão de adesão da água para todas as superfícies em estudo incluindo as dos alvos. Todos os filmes, excetuando o PTFEcF_Ag, possuem valores de τ^0 negativos. O valor para esta superfície encontra-se perto do valor de limite de Berg, tal como o da superfície de PA indicando, mais uma vez, a maior contribuição de material ejetado deste alvo na superfície PTFEcF_Ag do que na do respetivo filme fino sem prata.

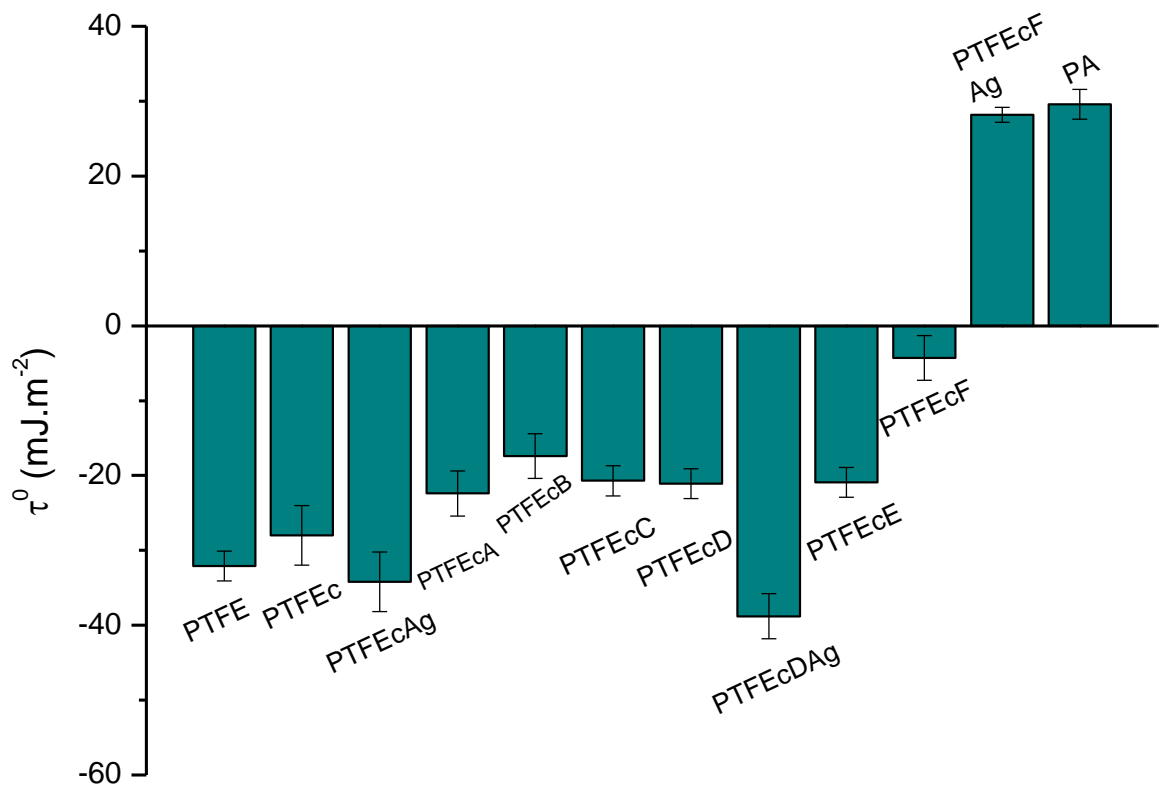


Figura 3.9 - Tensão de adesão da água em todas as superfícies em estudo.

Os valores calculados para todas as superfícies são indiretamente importantes neste trabalho. Com efeito, não foi encontrada na literatura nenhuma referência da relação entre este parâmetro e propriedades antimicrobianas. No entanto, se as superfícies desenvolvidas neste trabalho são para evitar infeções nosocomiais em dispositivos invasivos de PTFE, é necessário ter em consideração que vão estar em contacto com células eucariotas e é, desde logo, necessário assegurar uma boa compatibilidade celular. Os valores calculados, por serem inferiores ao limite de Berg, dão indicações positivas sobre uma boa compatibilidade biológica [77].

3.5. Potencial eletrocinético

O potencial eletrocinético, ou potencial zeta (ζ), avalia a carga de superfície quando na presença de um eletrólito e é influenciado pela morfologia, rugosidade e composição química da superfície [78,79].

P. aeruginosa apresenta potencial zeta negativo, tanto na fase exponencial como na fase estacionária [79]. Assim, idealmente, as superfícies que apresentem um potencial zeta negativo devem dificultar a fase de adesão destes microorganismos devido às interações repulsivas [80].

Os valores médios e respetivos desvios padrão das superfícies em estudo estão apresentados na figura 3.10. Todos os filmes finos apresentam valores negativos de potencial zeta à exceção das superfícies PTFEcD e PTFEcD_Ag. Na literatura está documentado a influência da quantidade relativa que grupos químicos podem induzir nos valores de potencial zeta [81]. Com efeito, cadeias terminadas em $-\text{NH}_2$ dão origem a valores de potencial zeta nulos ou positivos, enquanto a presença de $-\text{COOH}$ e $-\text{OH}$ contribuem para o valor negativo da carga de superfície, apenas para mencionar alguns dos grupos químicos. Assim, o valor negativo de todas as superfícies é expectável sobretudo se tivermos em consideração os valores dos materiais poliméricos maciços a partir dos quais os filmes finos foram depositados. O valor nulo das superfícies PTFEcD, com e sem prata, apenas pode ser justificado por um balanço, na superfície do filme fino, de grupos químicos funcionais que desenvolvem carga positiva e negativa na presença de KCl.

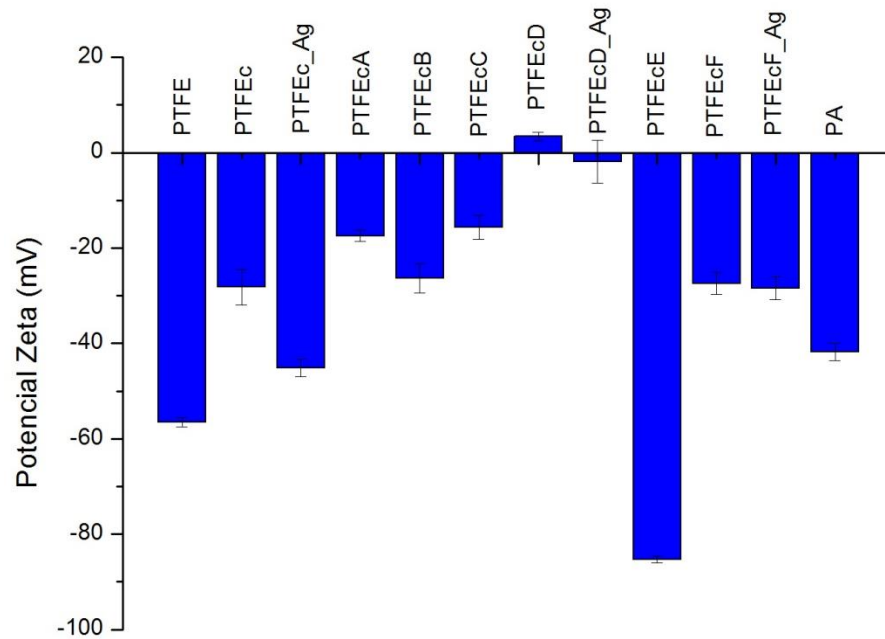


Figura 3.10 - Potencial zeta das superfícies dos filmes finos e dos alvos utilizados.

3.6. Testes in vitro

A resistência antimicrobiana das superfícies foi avaliada através de três testes: formação do halo de inibição, formação de biofilme e avaliação da toxicidade. Os testes foram efetuados às superfícies PTFEc, PTFEcD e PTFEcF, com e sem Ag, e ao PTFE maciço que foi usado como controlo.

Não ocorreu halo de inibição nem no PTFE maciço nem nas superfícies que não continham prata, tal como seria expectável. Nas superfícies com Ag apenas a superfície PTFEcF_Ag deu origem ao aparecimento do halo de inibição (Figura 3.11). Este comportamento pode ser devido, de acordo com as caracterizações já efetuadas, ao facto de ser a superfície com maior energia de superfície e, consequentemente, com maior reatividade aliada a um potencial zeta negativo que, teoricamente, é menos atrativo para a adesão de células com carga negativa como é o caso de *P.aeruginosa*. A superfície PTFEc_Ag possui potencial zeta negativo, mas uma baixa energia superficial e a superfície PTFEcD_Ag apresenta uma energia de superfície semelhante à de PTFEc_Ag, mas um valor nulo de potencial zeta.

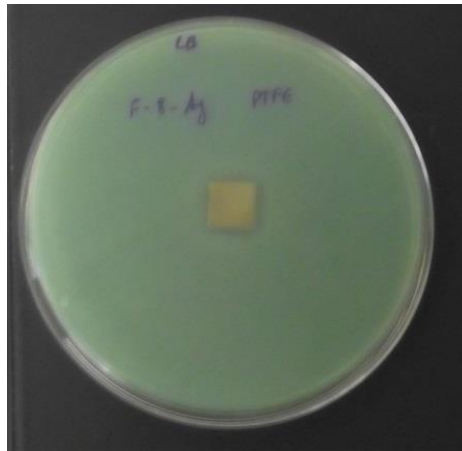


Figura 3.11 - Fotografia digital do halo de inibição de crescimento de *P.aeruginosa* devido à superfície PTFEcF_Ag.

As superfícies, após o teste do halo de inibição, foram observadas em SEM (figura 3.12). No PTFE maciço não só a superfície está colonizada por bactérias como estas degradaram a superfície do material polimérico, tendo utilizado o PTFE como fonte de alimento. Este facto é surpreendente pois a literatura refere que este polímero é caracterizado por ser biologicamente inerte. Quando se comparam as superfícies com e sem prata, após o teste, é evidente que nos filmes sem prata a densidade de bactérias sobre a superfície PTFEcD é superior à da observada na superfície PTFEc, o que seria expectável dada a carga superficial nula da primeira. No entanto, a superfície PTFEc_F encontra-se colonizada por bactérias e a integridade do filme foi destruída tal como acontece na superfície PTFEc_D indicando que *P.aeruginosa* utiliza como fonte de alimento os filmes finos que contêm C, N e O. Com efeito, o filme PTFEc, que possui menos grupos químicos funcionais que os outros dois é o que apresenta maior integridade da sua superfície. A presença de prata não afeta o aspeto morfológico dos filmes PTFEc_Ag e PTFEcD_Ag, quando comparado com as superfícies sem prata, sendo que a grande diferença é observada na superfície PTFEcF_Ag. Esta superfície inibe efetivamente o crescimento bacteriano pelas razões anteriormente referidas.

De realçar que este teste, por ser efetuado em condições estáticas e em meio sólido, não reproduz o que acontece no corpo humano. Por este motivo o mesmo conjunto de superfícies testadas na formação do halo de inibição foi avaliado na sua capacidade de inibir a formação de biofilme em condições dinâmicas e em meio líquido.

Após este teste, as superfícies foram observadas em SEM, o que confirmou a capacidade antimicrobiana de PTFEcF_Ag (Figura 3.13) que, mais uma vez, não permitiu a adesão e proliferação das bactérias. No entanto, nas superfícies PTFEc_Ag e PTFEcD_Ag também não foi possível observar a formação de biofilme ao contrário do que aconteceu nas superfícies sem prata e, sobretudo, na do PTFE maciço.

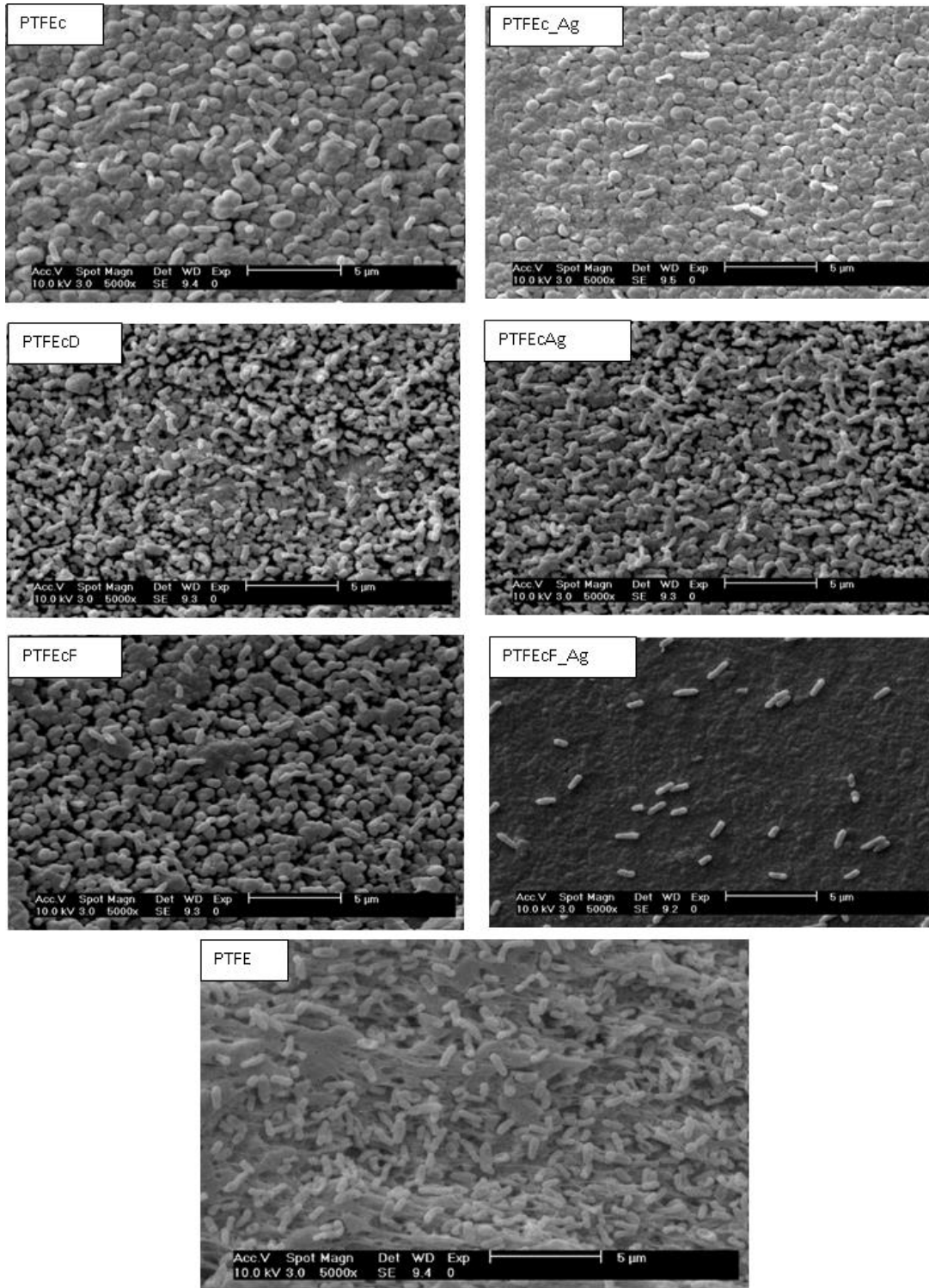


Figura 3.12 - Micrografias da morfologia de várias superfícies após o teste da formação do halo de inibição

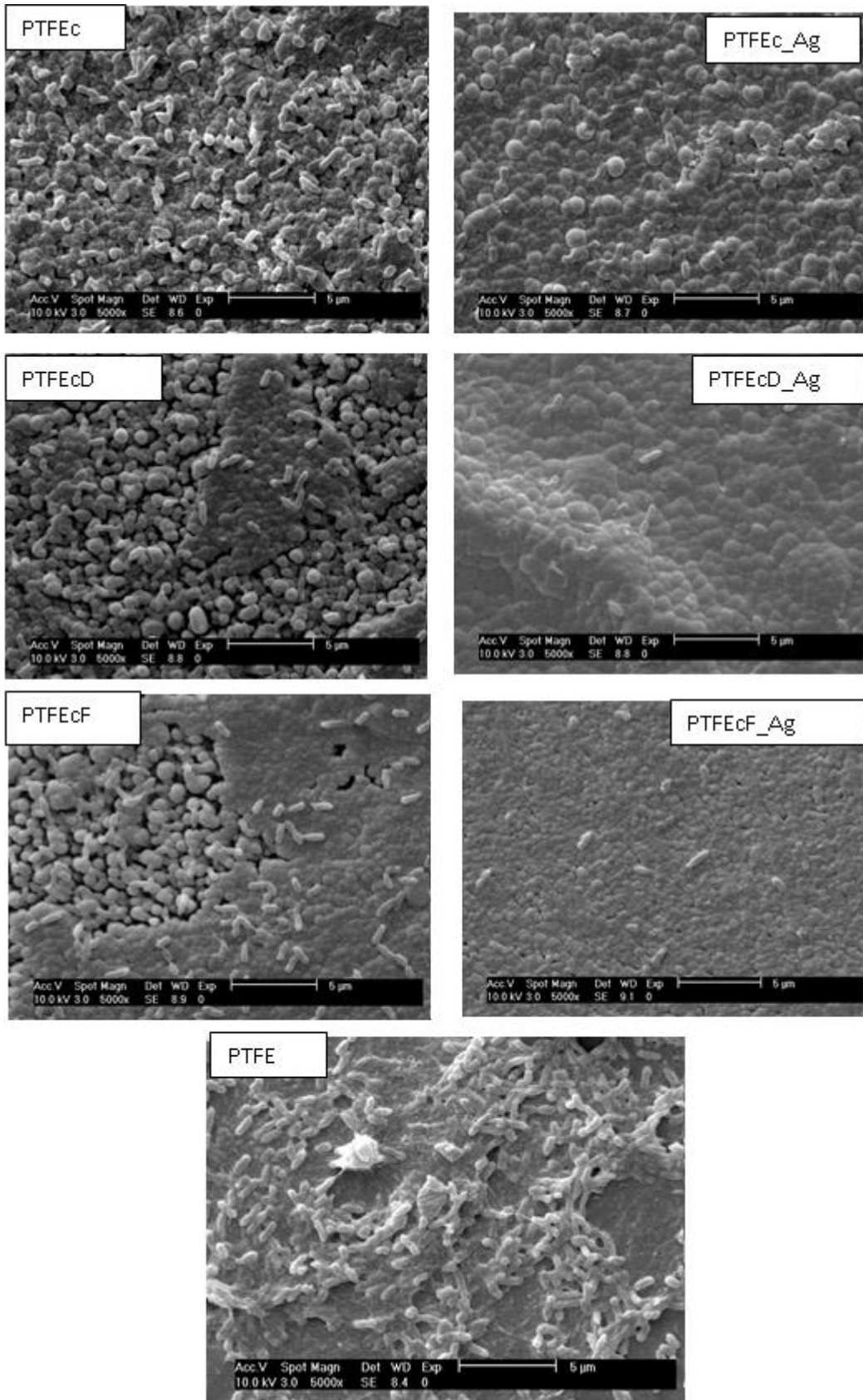


Figura 3.13 - Micrografias da morfologia de várias superfícies após o teste da formação de biofilme.

Sendo um teste que ocorre em condições dinâmicas por um lado é mais difícil a fase de adesão das células procariotas para posterior proliferação e formação do biofilme, mas por outro a ionização da prata metálica é mais fácil em contacto com o meio LB líquido do que no caso do mesmo meio mas sólido, como no teste do halo de inibição. Novamente, é importante realçar que apenas após 24 horas e, em condições dinâmicas, há formação de biofilme sobre a superfície do PTFE maciço. A formação do biofilme é bastante evidente não só pela colonização das bactérias mas, sobretudo, pela formação da matriz extracelular de exopolímeros, de acordo com o descrito na revisão bibliográfica, é essencial para formação do biofilme.

Com o intuito de avaliar se o efeito observado, quer no teste da formação do halo quer no da formação do biofilme, era devido à ação das células procariotas ou dos meios de cultura e do soro fisiológico foram efetuados controlos. As superfícies foram colocadas em contacto com o meio LB sólido mas sem estar inoculado com *P.aeruginosa* e foram submetidas ao mesmo teste da formação do biofilme mas com as bactérias na presença de tampão PBS e sem meio de cultura. A observação em SEM mostrou inequivocamente que a ação de degradação das superfícies anteriormente observadas era devida à ação bacteriana (Apêndice E)

A avaliação da toxicidade dos filmes é dado pelo número de colónias viáveis (CFU) ao fim de vários períodos de tempo de contacto com uma solução de NaCl, previamente incubada a 37°C, durante 24 horas, com as superfícies PTFEc_Ag, PTFEcD_Ag e PTFEcF_Ag. O controlo é efetuado, para os mesmos tempos, com uma solução de NaCl que não esteve em contacto com nenhuma das superfícies em estudo (Figura 3.14). No controlo, há um decréscimo no número de colónias viáveis com o tempo pelo facto de as células procariotas não proliferarem normalmente num meio que é escasso em nutrientes. Deste modo este decréscimo representa a mortalidade normal pelo contacto com o soro fisiológico. Quando se compara esta tendência com a observada para as superfícies contendo prata é evidente que a superfície PTFEcD_Ag apresenta um comportamento semelhante o que implica que esta superfície não apresenta toxicidade para a *P.aeruginosa*. O comportamento das duas outras superfícies é semelhante entre si e com um desempenho mais efetivo, em termos de toxicidade, que o controlo.

De todos os testes antimicrobianos efetuados a superfície PTFEcF_Ag foi a única que apresentou um desempenho antimicrobiano efetivo, sendo assim possível afirmar que

esta será uma superfície de eleição para a modificação da superfície de dispositivos médicos invasivos de PTFE de modo a conferir propriedades antimicrobianas contra uma das bactérias mais perigosa no que concerne as infeções nosocomiais.

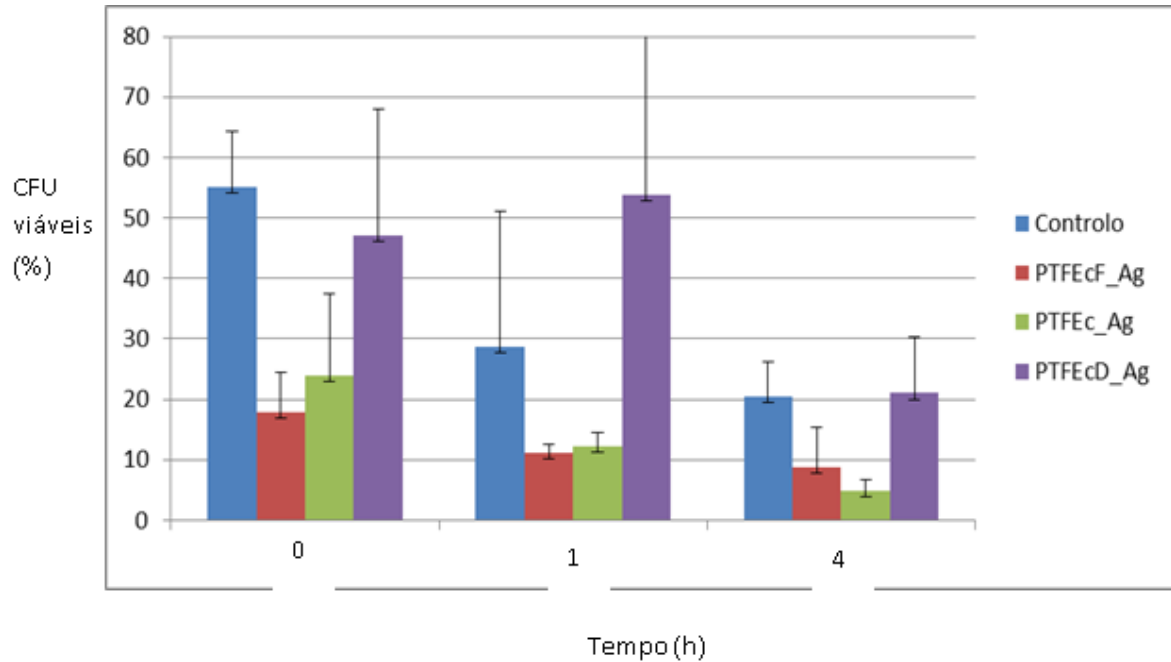


Figura 3.14 - Percentagem de colónias viáveis, avaliadas pelo teste de toxicidade, para vários tempos de contacto.

CONCLUSÕES

O objetivo primordial deste trabalho era o de modificar PTFE com revestimentos com a capacidade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*. Assim, as principais conclusões retiradas deste trabalho podem ser sumariadas, como se segue:

- pela utilização da pulverização catódica rf magnetron foi possível desenvolver filmes finos à base de PTFE, sem e com a incorporação de reduzidos teores de prata;
- a inserção de prata leva à formação de filmes finos nanocompósitos onde a prata de dimensões nanométricas se encontra dispersa numa matriz polimérica amorfa;
- as variações dos parâmetros de deposição e a codeposição com PA permitiram conferir às superfícies um leque variado de propriedades/características;
- todas as superfícies apresentaram valores de tensão de adesão da água inferiores ao limite de Berg o que, teoricamente, as habilita a serem utilizadas em contacto com células eucariotas sem ativar a cascata de coagulação
- de todas as propriedades/características avaliadas as que mais diretamente se conseguiram relacionar com o desempenho antimicrobiano foram a energia de superfície e a carga superficial;
- contrariamente ao descrito na literatura o PTFE maciço não apresentou inércia biológica em relação a *P.aeruginosa*, sendo mesmo a superfície onde o biofilme desta bactéria mais facilmente se desenvolveu;
- a superfície que, inequivocamente, apresentou capacidade antimicrobiana contra *P.aeruginosa* foi a desenvolvida por codeposição de PTFE, PA e Ag: PTFEcF_Ag.

Como trabalho futuro é sugerido avaliar, experimentalmente, a toxicidade da superfície PTFEcF_Ag em testes *in vitro* com células eucariotas, tais como células endoteliais do sistema vascular, de modo a confirmar se as indicações dadas pelas caracterizações efetuadas neste trabalho são validadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. Ramakrishna, J. Mayer, E. Wintermantel, Kam W. Leong; “*Biomedical applications of polymer-composite materials: a review*”; COMPOS SCI TECHNOL, 61 (2001), 1189-1124
- [2] D. Coskun, J. Aytac, C. Ozturk, M. Tezer; “*Five-year surveillance of nosocomial infections following orthopedic surgery in a private medical center*”; Eur J Orthop Surg Traumatol, 18 (2008), 197-202
- [3] R. Barnes, I. Chetter; “*Infection in prosthetic material*”; Surgery 30:12 (2012), 667-672
- [4] David C. McGee, Michael K. Gould; “*Preventing Complications of Central Venous Catheterization*”; N ENG J MED, 348:12 (2003), 1123-1133
- [5] E. Tacconelli, G. Smith, K. Hieke, A. Lafuma, P. Bastide; “*Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature- and registry-based estimates*”; J. Hosp. Infect., 72 (2009), 97-103
- [6] T. Bjarnsholt, K. Kirketer-Moller, S. Kristiansen, R. Phipps et al; “*Silver against Pseudomona aeruginosa biofilms*”, APMIS 115 (2007), 921-928.
- [7] Russel D. Monds, George A. O’Toole; “*The development model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for reviews*”; Trends Microbiol., 17:2, (2009), 73:87.
- [8] C. Desrousseaux, V. Sautou, S. Descamps, O. Traoré; “*Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation*”; J. Hosp. Infect., 85 (2013), 87-93.
- [9] D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, C. R. Arciola; “*Antibiotic-loaded materials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use*”; Biomaterials, 31 (2010), 6363-6377.

- [10] A. L. Hook, C. Y. Chang, J. Yang, et al; “*Combinatorial discovery of polymers resistant to bacterial attachment*”; Nat Biotechnol, 30:9 (2012), 868-878.
- [11] K. D. Lessnau; “*Pseudomona aeruginosa Infections*”; acessado em <http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview>, a 05/06/14.
- [12] Lederberg, Joshua et al. Pseudomonas. Encyclopedia of Microbiology. Second Edition. Volume 3. San Diego, 2000. p. 876-891
- [13] <http://www.textbookofbacteriology.net/>, acessado a 02/06/14.
- [14] Milagres, L., Garcia, D, et Al; “Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection in cystic fibrosis:serologic diagnosis and therapeutic”; Pediatría (São Paulo) (2008) 30(1): 56-65.
- [15] Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Krogfelt KA. “Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study”. Int Wound J 2006;3:225-231.
- [16] Harrison-Balestra, Catherine, Cazzaniga, Alejandro L., Davis, Stephen C., et Al; “A Wound-Isolated *Pseudomona aeruginosa* Grows a biofilm In Vitro Within 10 Hours and Is Visualized by Light Microscopy”; Dermatol Surg (2003); 29:631-635.
- [17] Bjarnsholt, T. and Givskov, M.; “The role of quorum sensing in the pathogenicity of the cunning agressor *Pseudomona aeruginosa*”; Anal Bioanal Chem (2007) 387:409-414
- [18] Buchholz HW, Engelbrecht H. U” ber die Depotwirkungeiniger Antibiotika bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos.Chirurg 1970;41:511–515
- [19] Price, J. S., Tencer, A. F. Arm, D. M., Bohach, G. A.; “Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants”; J Biomed Mater Res, 1996, 30:281-286.
- [20] Gautier, H., Merle, C., Auget, J.L., Daculsi, G.; “Isostatic compression, a new process for incorporating vancomycin into biphasic calcium phosphate: comparison with a classical method”; Biomaterials (2000) 21:243-249.

- [21] Gautier, H., Daculsi, G., Merle, C.; “Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro characterization and microbiological activity”; *Biomaterials* (2001) 22:2481-2487.
- [22] Stigter, M., Bezemer, J., de Groot, K., Layrolle, P.; “Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy”; *J Control Release* (2004) 99:127-137.
- [23] Bazaka, K., Jacob, Mohan V., Crawford, Russel J., Ivanova, Elena P.; “Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms”; *Appl Microbiol Biotechnol* (2012) 95:299-311.
- [24] Nablo, Brian J., Chen, Ta Chen and Schoenfisch, Mark H.; “Sol-Gel derived nitric-oxide releasing materials that reduce bacterial adhesion”; *J. Am. Chem. Soc.* (2001), 123:9712-9713.
- [25] Marxer, Stephanie M., Rothrock, Aaron R., Nablo, Brian J., et Al; “Preparation of nitric oxide (NO)-releasing Sol-gels for biomaterial applications”; *Chem. Mater.* (2003) 15:4193:4199.
- [26] Rojas, Ignacio A., Slunt, Jeffrey B., Grainger, David W.; “Polyurethane coatings release bioactive antibodies to reduce bacterial adhesion”; *J Control Release* (2000) 63:175-189.
- [27] Shukla, A., Fleming, K. E., Chuang, H. F., Chau, T. M.; “Controlling the release of peptide antimicrobial agents from surfaces”; *Biomaterials* (2010) 31:2348-2357.
- [28] Bazaka, K., Jacob, Mohan V., Crawford, Russel J., Ivanova, Elena P.; “Plasma-assisted surface modification of organic biopolymers to prevent bacterial attachment”; *Acta Biomater* (2011) 7:2015-2028.
- [29] Bazaka, K., Jacob, Mohan V., Crawford, Russel J., Ivanova, Elena P.; “The effect of polyterpenol thin film surfaces on bacterial viability and adhesion”; *Polymers-Basel* (2011) 3:388-404.

- [30] Rai, Mahendra, Yadav, Alka, Gade, Aniket; “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials”; *Biotechnol J.*(2009) 27:76-83.
- [31] Mijndonckx, K., Leys, N., Mahillon, J., Silver, S., Van Houdt, R.; “Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance”; *Biometals* (2013) 26:609-621.
- [32] Schierholz, J. M., Lucas, L.J., Rump, A., Pulverer, G.; “Efficacy of silver-coated medical devices”, *J Hosp Infect* (1998) 40:257-262.
- [33] Holt, K. B., Bard, A. J.; “Interaction of Silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli* : An electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺”; *Biochem J* (2005) 44:13214-13223.
- [34] Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Burmolle, M., et Al; “*Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent”; *Microbiology+* (2005), 151:373-383.
- [35] Hwang, M. G., Katayama, H., Ohgaki, S.; “Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomona aeruginosa* : evaluation of the bactericidal ability of silver cations”; *Water Res* (2007) 41:4097-4104.
- [36] Huang, H. I., Shih, H.Y., Lee, C. M., Yang, T. C., Lay, J. J., Lin, Y. E.; “In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: Implications for on-site disinfection for hospital infection control”; *Water Res* (2008) 42:73-80.
- [37] Campoccia, D, Montanaro, L., Arciola, C.R.; “A review of the biomaterial technologies for infection-resistant surfaces”; *Biomaterials* (2013) 34:8533-8554.
- [38] Campoccia, D, Cangini, I., Selan, L., Vercellino, M., Montanaro, L., Visai, L., Arciola, C. R.; “An overview of the methodological approach to the *in vitro* study of anti-infective biomaterials”; *Int J Artif Organs* (2012) 35(10):800-816.

- [39] Carlson, G. A., Dragoo, J. L., Samimi, B., Bruckner, D. A.; “Bacteriostatic properties of biomatrices against common orthopaedic pathogens”; *Biochem Bioph Res Co* (2004) 321:472-478.
- [40] Riedl, C. R., Witkowski, M., Plas, E., Pflueger, H.; “Heparin coating reduces encrustation of ureteral stents: a preliminary report”; *Int J Antimicrob Ag* (2002) 19:507-510.
- [41] Tenke, P., Riedl, C. R., Jones, G. J.L., Williams, G.J., Stickler, D., Nagy, E.; “Bacterial biofilm formation on urologic devices and heparin coating as preventive strategy”; *Int J Antimicrob Ag* (2004) 23S1:S67-S74.
- [42] Shanks, R. M. Q., Donegan, N. P., Graber, M. L., Buckingham, S. E.; “Heparin stimulates *Staphylococcus aureus* biofilme formation”; *Infec. Immun.* (2005) 73:4596-4606.
- [43] Rios, P. F., Dodiuk, H., Kenig, S., Mccarthy, S., Dotan, S.; “The effects of nanostructure and composition on the hydrophobic properties of solid surfaces”; *J. Adhesion Sci. Technol.* (2006) 20(6):563-587.
- [44] Dodiuk, H., Rios, P.F., Dotan, A., Kenig, S.; “Hydrophobic and self-cleaning coatings”; *Polym. Adv. Technol.* (2007) 18:746-750.
- [45] Arciola, C.R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., Costerton, J. W.; “Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials”; *Biomaterials* (2012) 33:5967-5982.
- [46] An YH, Friedman RJ, Draughn RA, Smith EA, Nicholson JH, John JF.; “Rapid quantification of staphylococci adhered to titanium surfaces using image analyzed epifluorescence microscopy”. *J Microbiol Meth* (1995);24:29-40.
- [47] Li, L., Jones, P. M., Hsia, Y.T.; “Characterization of a nanometer-thick sputtered polytetrafluoroethylene film”; *Appl Surf Sci* (2011) 257:4478-4485.

- [48] Shi, Z., Zhou, H., Qing, X., Dai, T., Lu, Y.; “Facile fabrication and characterization of poly(tetrafluoroethylene)/polypyrrole/nano-silver composite membranes with conducting and antibacterial property”; *Appl Surf Sci* (2012) 258:6359-6365.
- [49] Lotz, A., Heller, M., Brieger, J., Gabriel, M., Forch, R. (2012), “Derivatization of plasma polymerized thin films and attachment of biomolecules to influence HUVEC-cell adhesion”, *Plasma Process and Polym*, 9, 10-16.
- [50] Harvey, R. A., Greco, R. S.; “The noncovalent bonding of antibiotics to a polytetrafluoroethylene-benzalkonium graft”; *Ann. Surg.* (1981) 195(5):642-647-
- [51] Donetz, A. P., Harvey, R.A., Greco, R.S.; “Stability of antibiotics bound to polytetrafluoroethylene with cationic surfactants”; *J Clin Microbiol* (1984) 19(1):1-3.
- [52] Okahara, K., Kambayashi, J., Shibuya, T., Kawasaki, T.; “An infection-resistant PTFE vascular graft: spiral colling of the graft with ofloxacin-bonded PTFE thread”; *Eur J Vasc Endovasc Surg* (1995), 9:408-414.
- [53] Aumsuwan, N., Danyus, R.C., Heinhorst, S., Urban, M. W.; “Attachment of ampicillin to expanded poly(tetrafluoroethylene): surface reactions leading to inhibition of microbial growth”; *Biomacromolecules* (2009), 9:1712-1718.
- [54] Aumsuwan, N., R.C., Heinhorst, S., Urban, M. W.; “The effectiveness of antibiotic activity of penicillin attached to expanded poly(tetrafluoroethylene) (ePTFE) surfaces: a quantitative assesement”; *Biomacromolecules* (2007), 8:3525-3530.
- [55] Bierderman, H., Bilkova, P., Jezek, J., Hlidek, P., Slavinska, D.; “ RF magnetron sputtering of polymers”; *J Non-Cryst Solids* (1997), 218:44-49.
- [56] Bierderman, H., Zeuner, M., Zaiman, J., Bilkova, P., Jezek, J., Slavinska, D.; “Rf magnetron sputtering of polytetrafluoroethylene under various conditions”; *Thin solid Films* (2001) 392:208-213.

- [57] Stelmashuk, V., Bierderman, H., Slavinska, D., Zemek, J., Trchova, M.; “Plasma polymer film rf sputtered from PTFE under various argon pressures”; *Vacuum* (2005) 77:131-137.
- [58] Yoon, H.J., Kim, S.E., Kwon, Y.K., Kim, E.J.; “Synthesis of silver nanostructures on polytetrafluoroethylene (PTFE) using electron beam irradiation for antimicrobial effect”; *J Ind Eng Chem* (2012) 18:586-590.
- [59] Zhao, Q., Liu, Y., Wang, C.; “Development and evaluation of electroless Ag-PTFE composite coatings with anti-microbial and anti-corrosion properties”; *Appl Surf Sci* (2005) 252:1620-1627.
- [60] Siegel, J., Polivkova, M., Kasalkova, N. S., Kolska, Z., Svorcik, V.; “Properties of silver nanostructured-coated PTFE and its biocompatibility”; *Nanoscale Res Lett* (2013) 8:388:398
- [61] Siegel, J., Jurik, P., Kolska, Z., Svorcik, V.; “Annealing of silver nanolayers sputtered on polytetrafluoroethylene”; *Surf. Interface Anal.* (2013) 45:1063-1066.
- [62] Zaporojtchenko, V., Podschun, R., Schurmann, U., Kulkarni, A., Faupel, F.; “Physico-chemical and antimicrobial properties of co-sputtered Ag-Au/PTFE nanocomposite coatings”; *Nanotechnology* (2006), 17:4904-4908.
- [63] Alissawi, N., Zaporojtchenko, V., Strunskus, T., Hrkac, T.; “Tuning of the ion release properties of silver nanoparticles buried under a hydrophobic polymer barrier”; *J Nanopart Res* (2012) 14:928-940.
- [64] Alissawi, N., Peter, T., Strunskus, T., Ebbert, C., Grundmeier, G., Faupel, F.; “Plasma-polymerized HMDSO coatings to adjust the silver ion release properties of Ag/polymer nanocomposites”; *J Nanopart Res* (2013) 15:2080-2092.
- [65] Piedade, A. P. (2001). “A Pulverização Catódica e os Biomateriais”. Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica na especialidade de Ciência e Engenharia de Materiais, Departamento de Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra.

- [66] Pinho, A. C. S. (2012). “Nanocompósitos de polímero/metal para a imobilização de compostos pró-ativos”. Tese de Mestrado em Engenharia de Materiais na especialidade de Biomateriais, Departamento de Engenharia Mecânica, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra.
- [67] Drabik, M., Polonskyi, O., Kylan, O., Cechvala, J.; “Super-hydrophobic coatings prepared by RF magnetron sputtering of PTFE”; *Plasma Process. Polym.* (2010), 7:544-551.
- [68] *Handbook of Chemistry and Physics*, David R. Lide Editor-in-chief, 85th edition, CRC Press, Florida, 2004
- [69] Bodas, D. S., Mandale, A.B., Gangal, S.A.; “Deposition of PTFE thin films by RF plasma sputtering on { 1 0 0 } silicon substrates”; *Appl Surf Sci* (2005), 245:202-207.
- [70] Karam, L., Jama, C., Mamede, A.S., Fahs, A.; “Study of nisin adsorption on plasma-treated polymer surfaces for setting up materials with antibacterial properties”; *React Funct Polym* (2013), 73:1473-1479.
- [71] Finke, B., Hempel, F., Testrich, H., Artemenko, A.; “Plasma processes for cell-adhesive titanium surfaces based on nitrogen-containing coatings”; *Surf Coat Tech* (2011) 205:S520-S524.
- [72] Arfin, T., Falch, A., Kriek, R.J.; “Evaluation of charge density and the theory for calculating membrane potential for a nano-composite nylon-6,6 nickel phosphate membrane”; *Phys. Chem. Chem Phys.* (2012) 14:16760-16769.
- [73] He, J.L., Li, W. Z., Wang, L.D., Wang, J., Li, H.D.; “Deposition of PTFE thin films by ion beam sputtering and a study of the ion bombardment effect”; *Nucl Instrum Meth B* (1997) 135:512-516.
- [74] Alonso, J. L., Goldman, W. H. ; “Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology”, *Life Sci*, (2003) 72:2553-2560
- [75] Kousal, J., Hanus, J., Choukourov, A., Polonskyi, O.; “In situ diagnosis of RF magnetron sputtering of Nylon”; *Plasma Process. Polym* (2009), 6:803-807.

- [76] Kumar, B. R., Rao, T. S.; “AFM studies on surface morphology, topography and texture of nanostructured zinc aluminum oxide thin films”; *Dig J Nanomater Bios* (2012), 7(4):1881-1889.
- [77] Vogler, E. A.; “Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces”; *Adv Colloid Interfac* (1998), 74:69-117.
- [78] Kolska, Z., Reznickova, A., Hnatowicz, V., Svorcik, V.; “PTFE surface modification by Ar plasma and its characterization”; *Vaccum* (2012) 86:643-647.
- [79] Marcus, I. M., Herzberg, M., Walker, S. L., Freger, V.; “*Pseudomona aeruginosa* attachment on QCM-D Sensors: The role of cell and surface hydrophobicities”; *Langmuir* (2012) 28:6396-6402.
- [80] Walker, S. L., Hill, J. E., Redman, J. A., Elimelech, M.; “Influence of growth phase on adhesion kinetics of *Escherichia coli* D21g”; *Appl Environ Microb* 2005, 71(6):3093-3099.
- [81] Cai, K.; Frant, M.; Bossert, J.; Hildebrand, G.; Liefelth, K.; Jandt, 565 K. D. *Colloids Surf., B* 2006, 50, 1–8.

ANEXO A

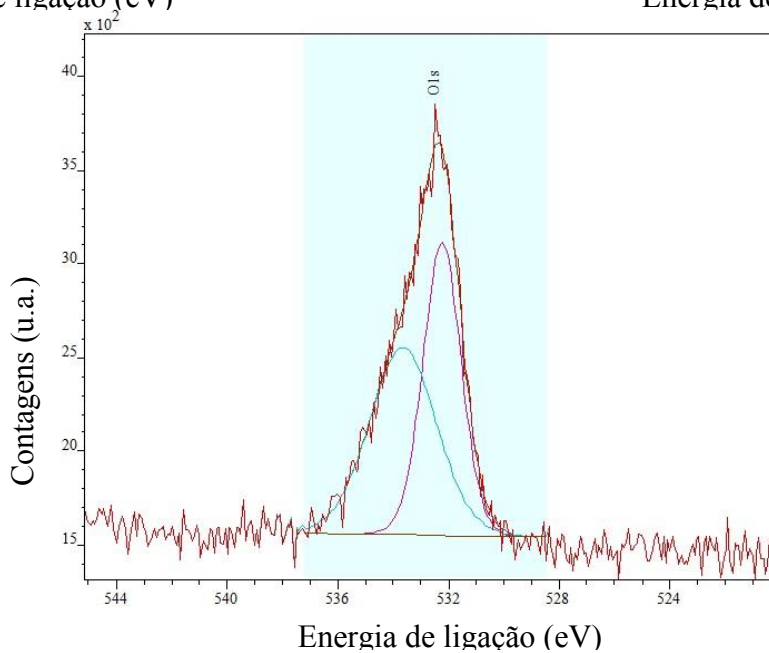
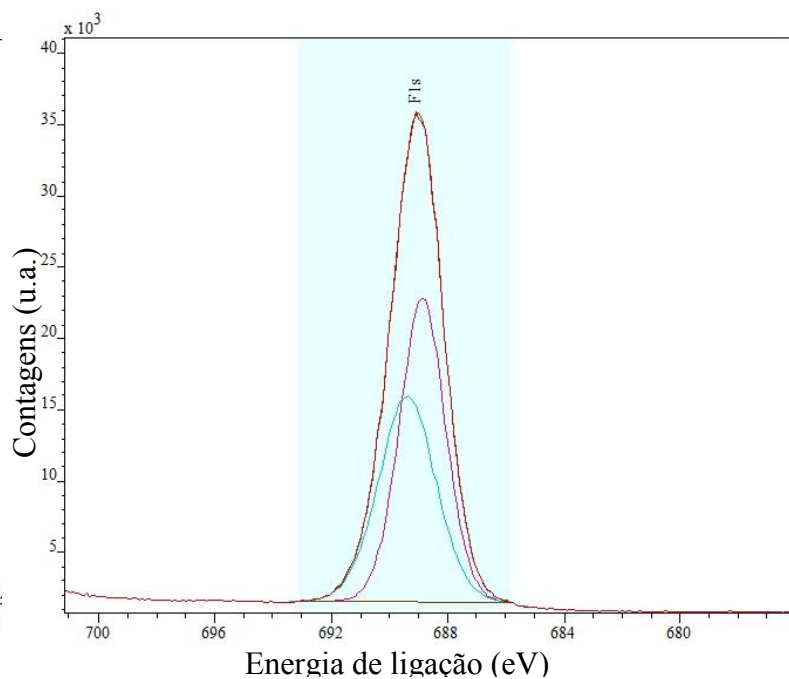
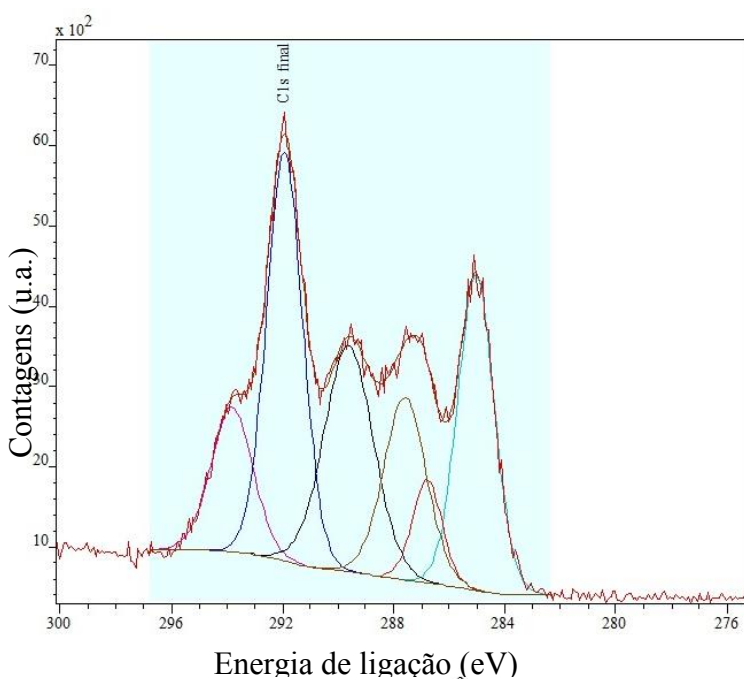
Correspondência entre bandas de infravermelho e grupos químicos funcionais de interesse do PTFE.

Bandas (cm ⁻¹)	Descrição	Referência
980	-CF ₃ vibração de deformação	[65]
1038	-CF _x (x=1,2 e 3)	[65]
1151	> CF ₂ vibração de elongação simétrica	[65]
1210	> CF ₂ vibração de elongação assimétrica	[65]
1340	≡ C-F vibração de elongação > CF ₂ vibração de elongação axial	[65]
1626	> C=CF- vibração de elongação quando reticulada	[65]
1709	C=O vibração de elongação	[65]
1730	-CF=CF- vibração de elongação	[65]
1776	-COOH ligado por pontes de H, vibração de elongação	[65]
1787	-CF=CF ₂ vibração de elongação	[65]
1883	-CF=O vibração de elongação	[65]
1959	-CF=C=CF- vibração de elongação	[65]
2900-3500	O-H vibração de elongação	[65]
686	NH fora do plano de corte	[72]
1538	N monosubstituída do grupo amida	[72]
1636	-C=O vibração de elongação da amida	[72]
2932	-C-O vibração de elongação da amida	[72]
3077	-C-O vibração de elongação da amida	[72]
3299	-N-H vibração de elongação	[72]

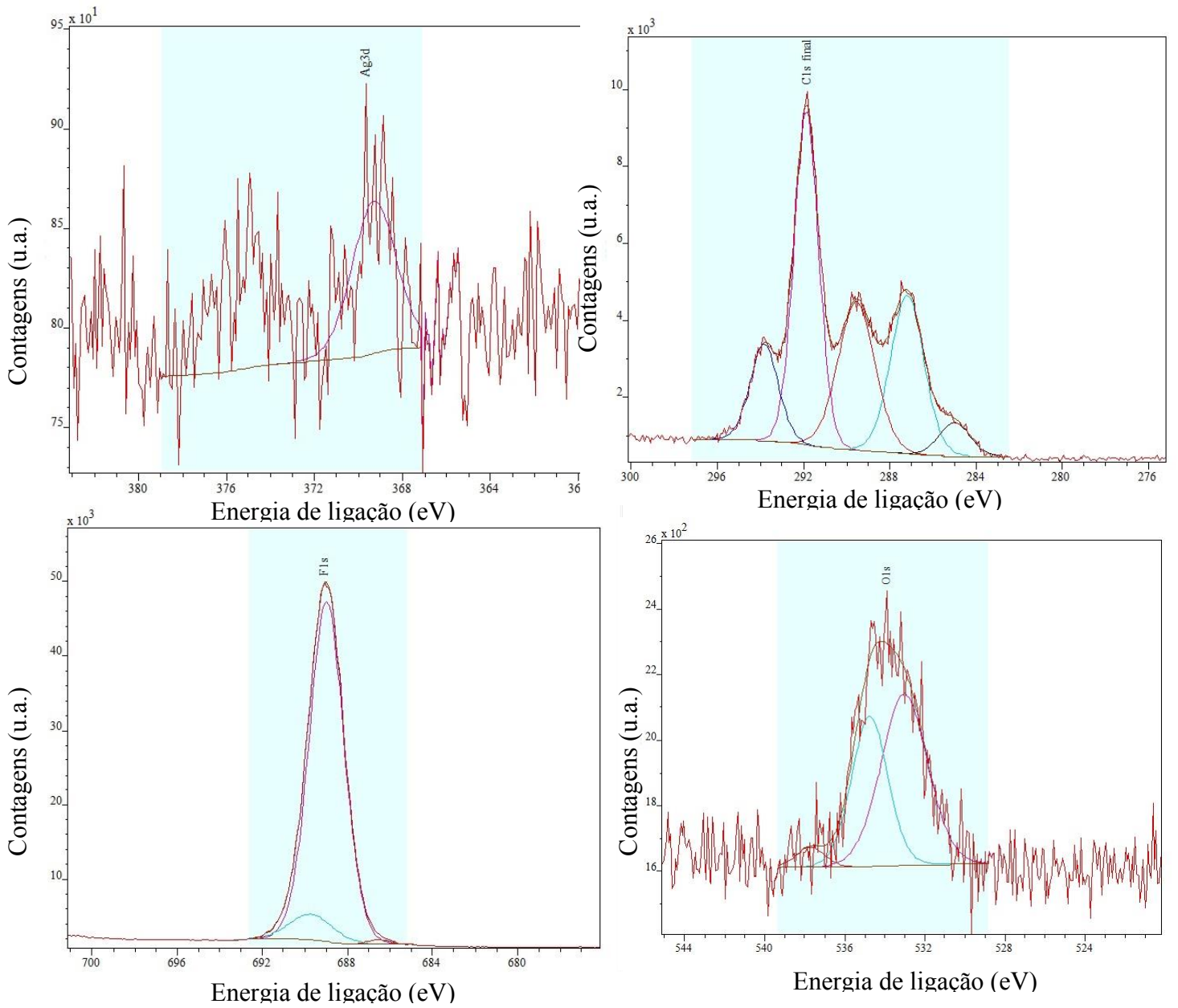
APÊNDICE A

Desconvolução dos espectros de XPS.

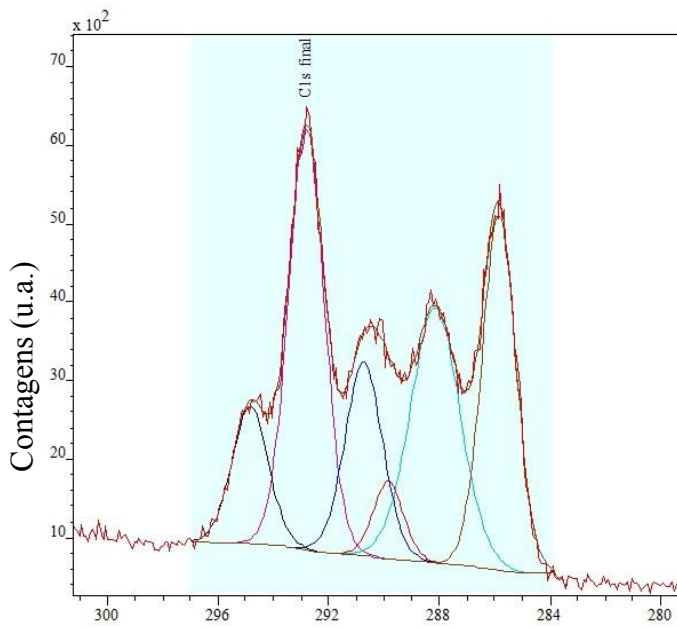
PTFEc



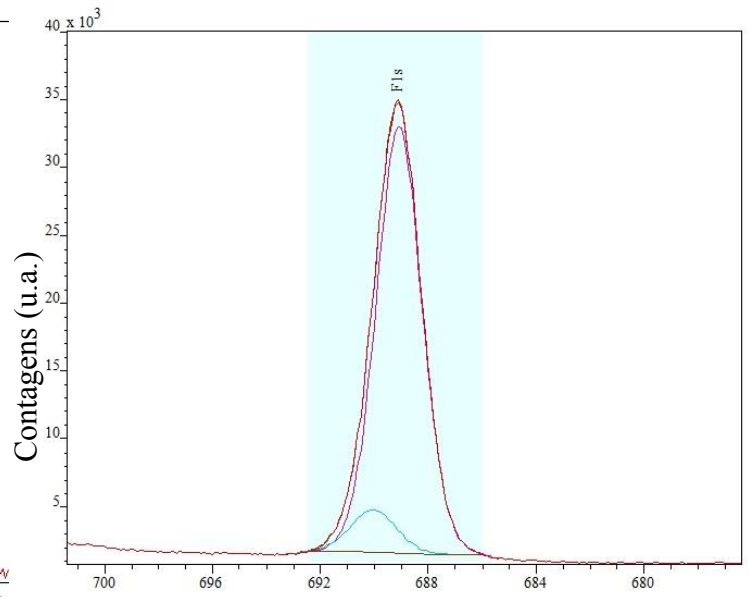
PTFECAg



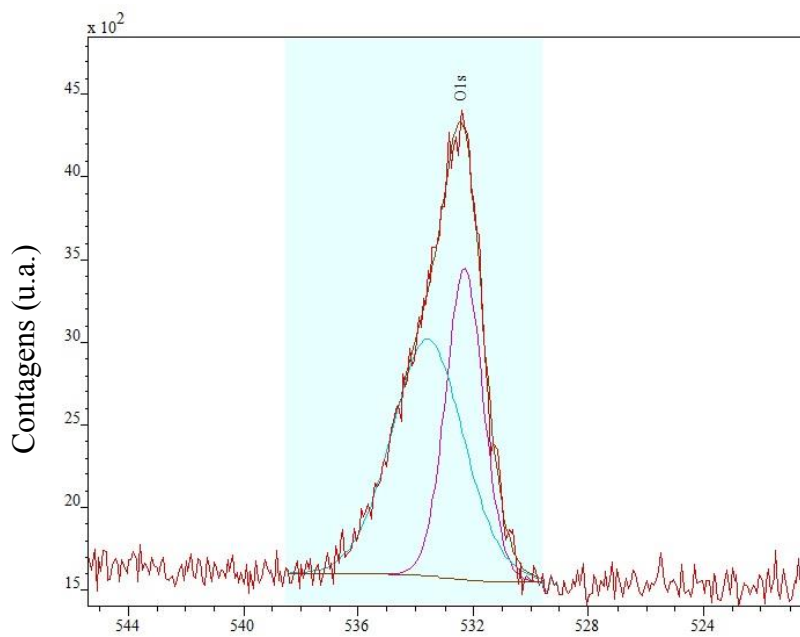
PTFEcB



Energia de ligação (eV)

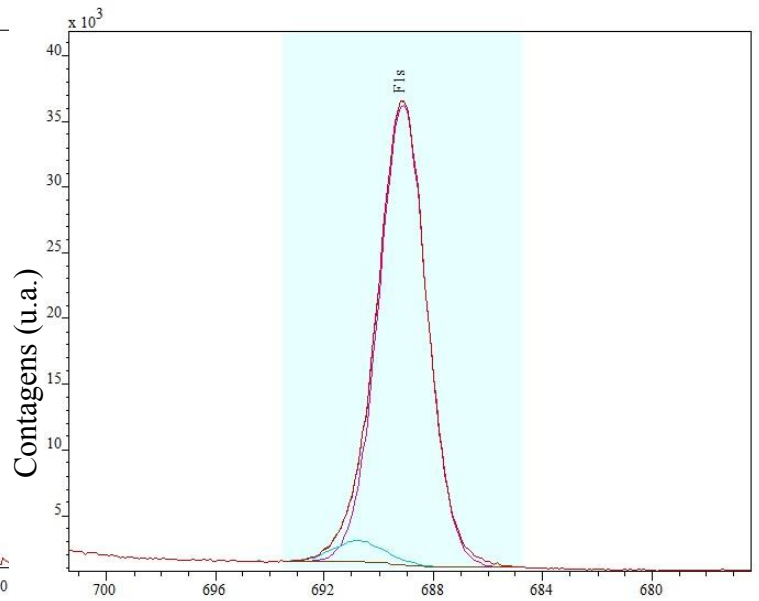
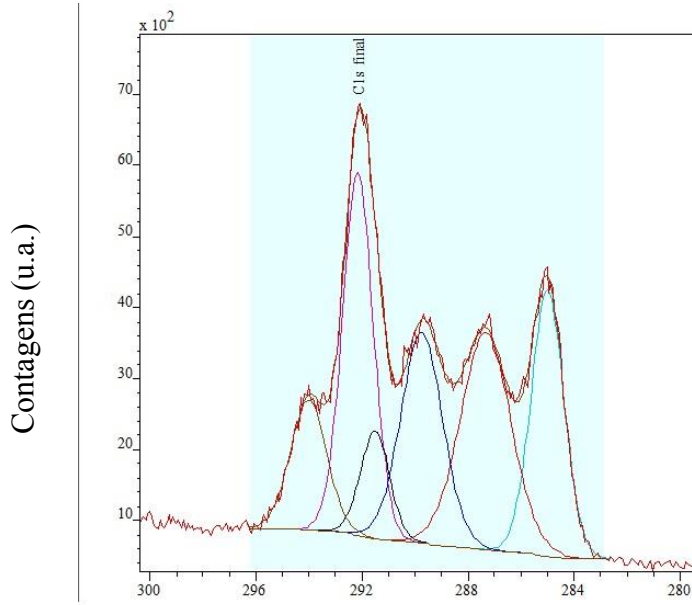


Energia de ligação (eV)

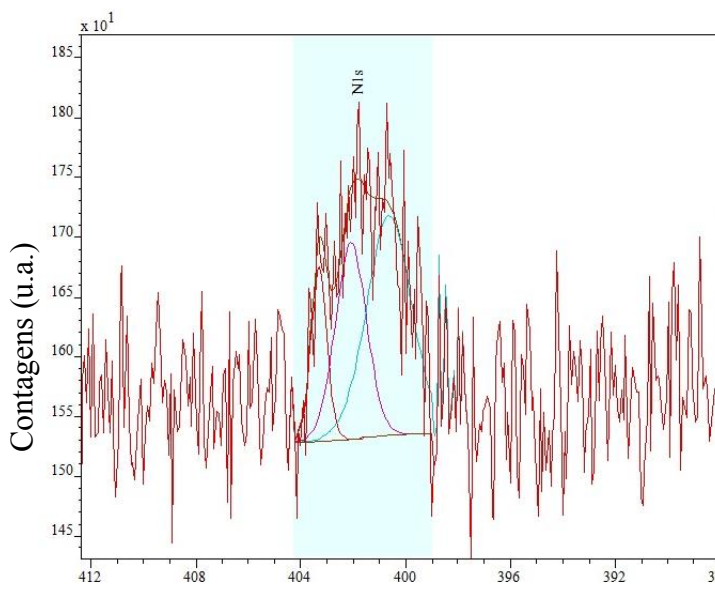


Energia de ligação (eV)

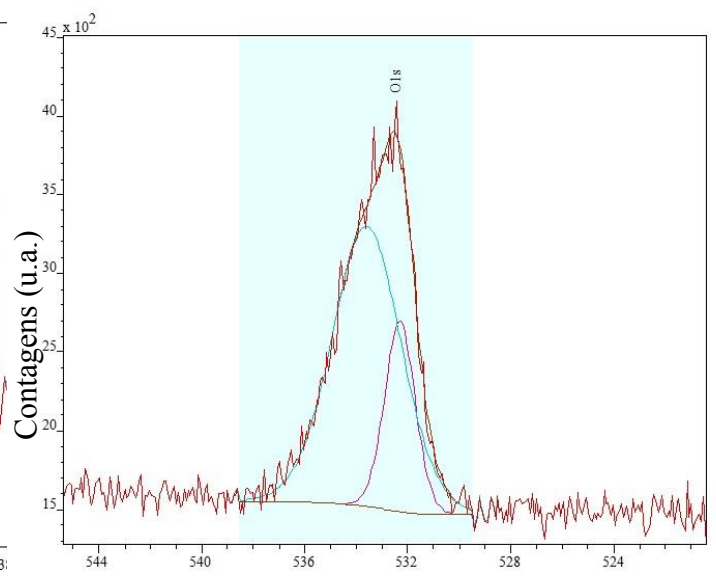
PTFEcD



Energia de ligação (eV)

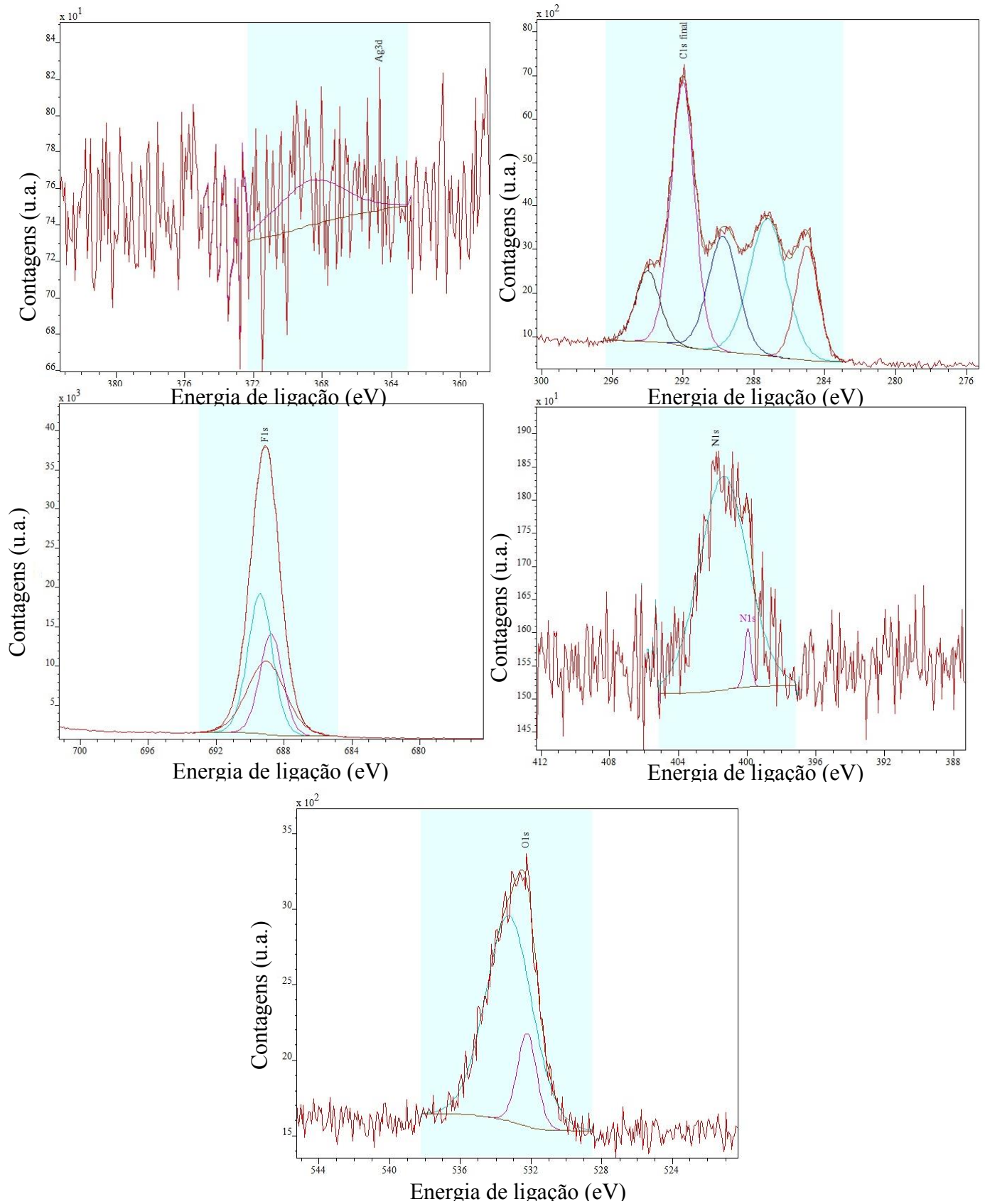


Energia de ligação (eV)

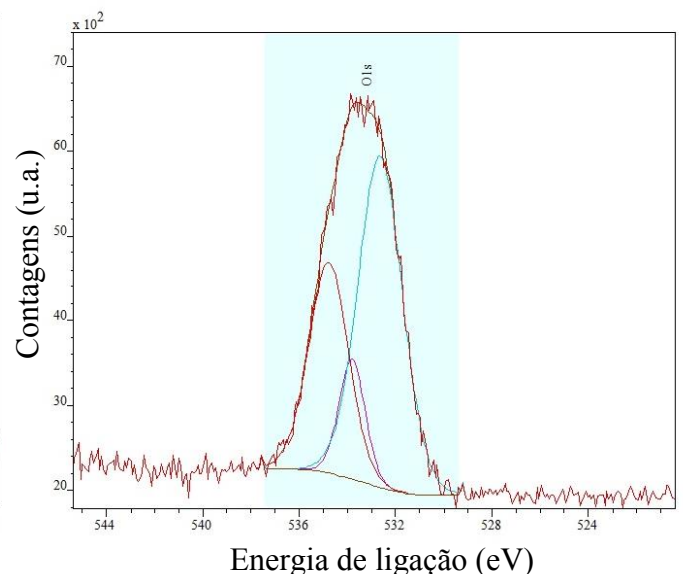
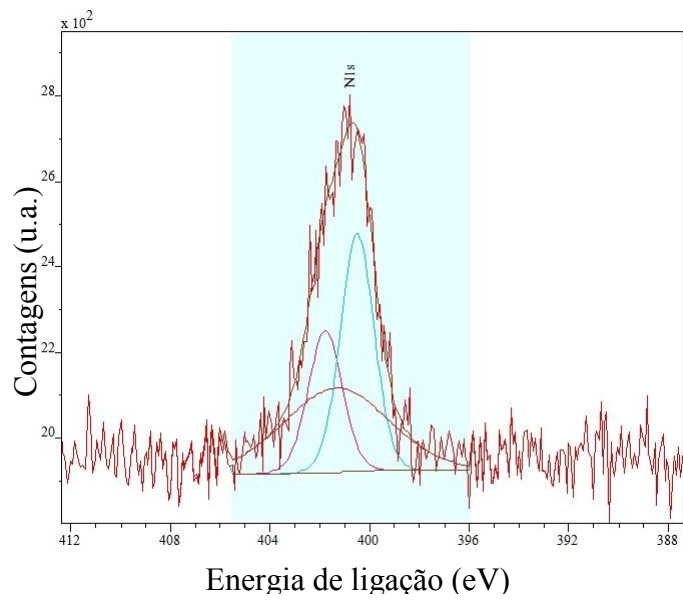
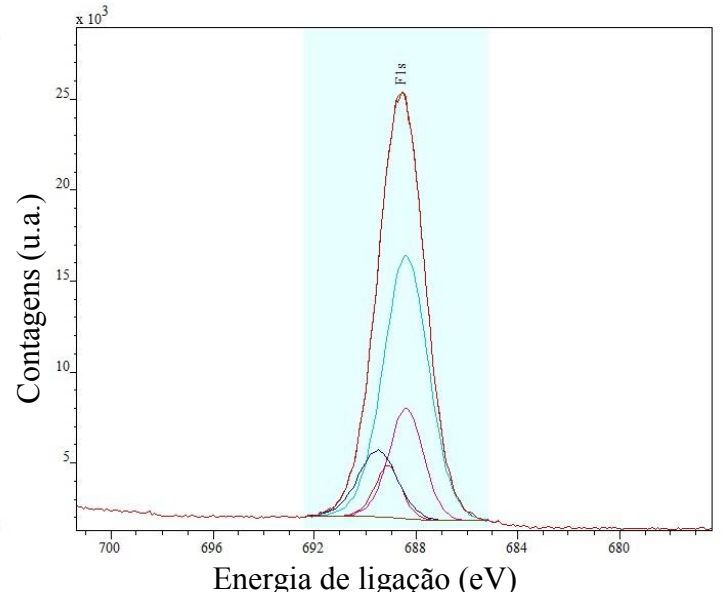
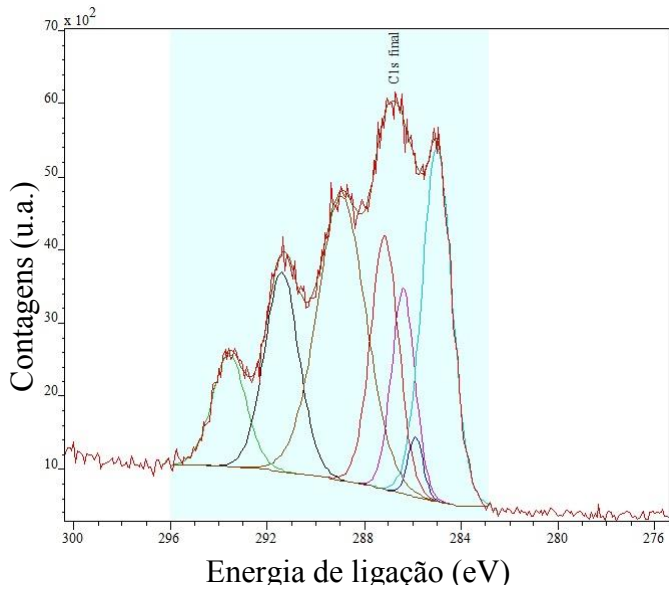


Energia de ligação (eV)

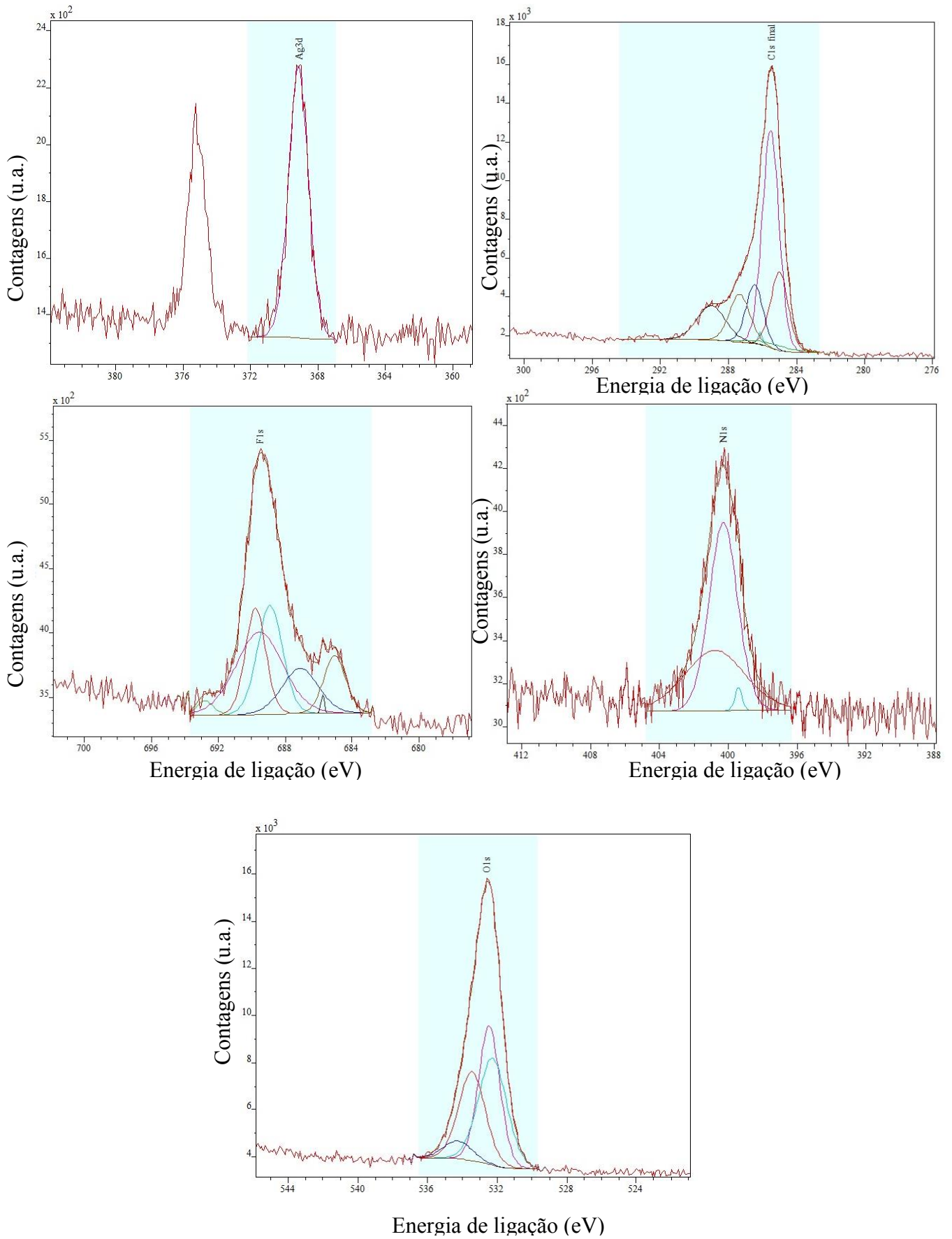
PTFEcD_Ag



PTFEcF

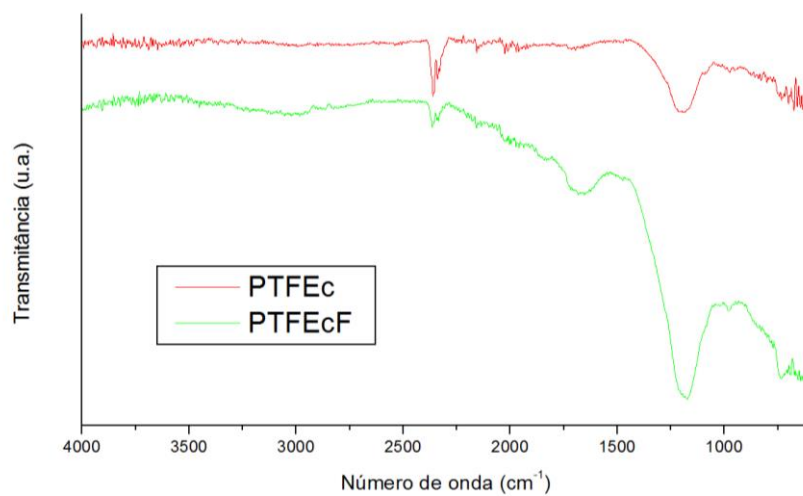
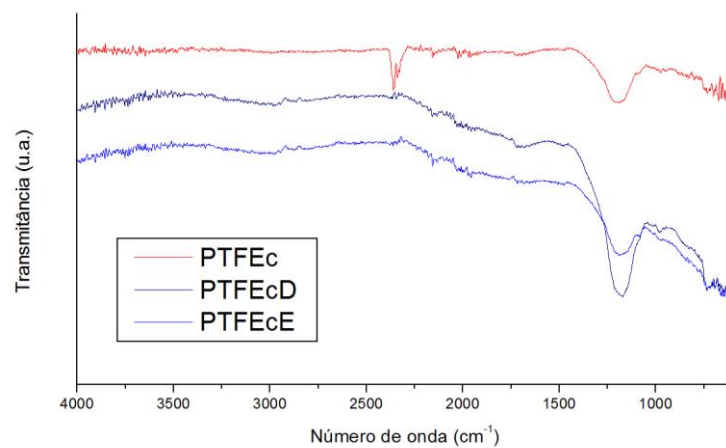
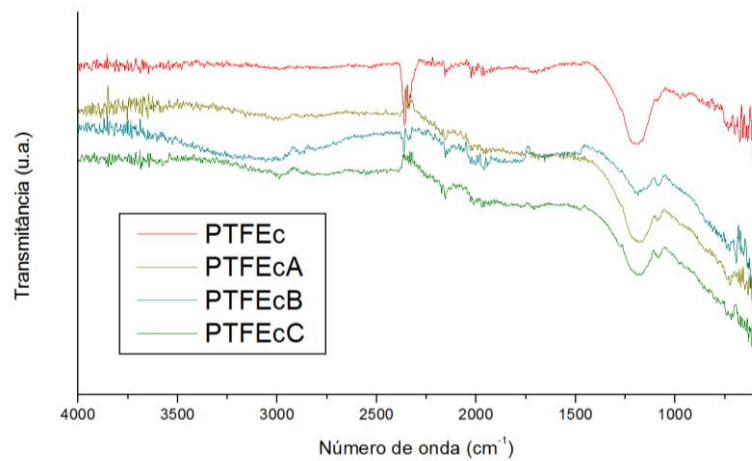


PTFEcF_Ag



APÊNDICE B

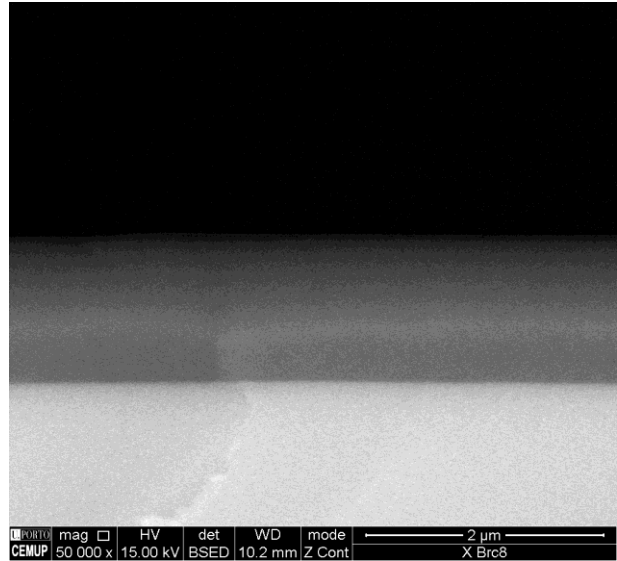
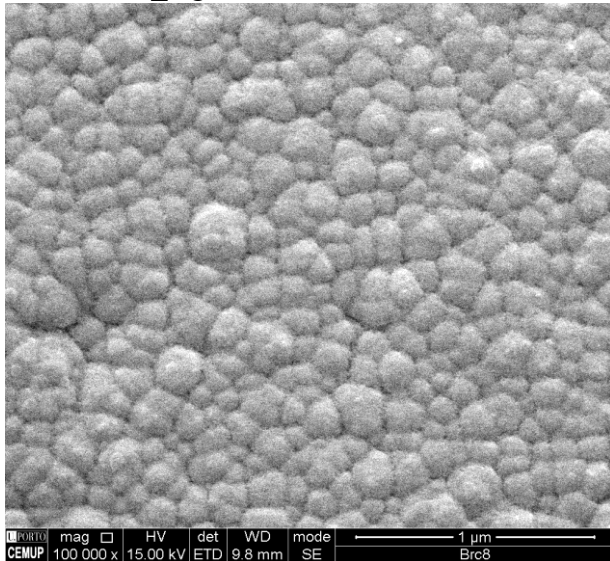
Espetros de FTIR dos filmes.



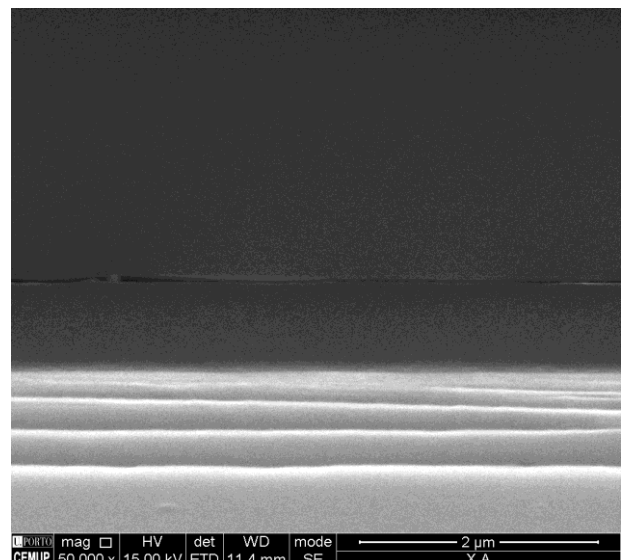
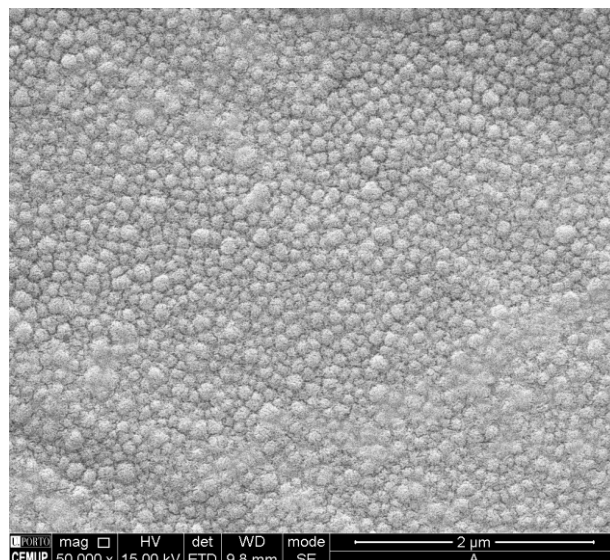
APÊNDICE C

Micrografias de SEM de superfície e secção transversal.

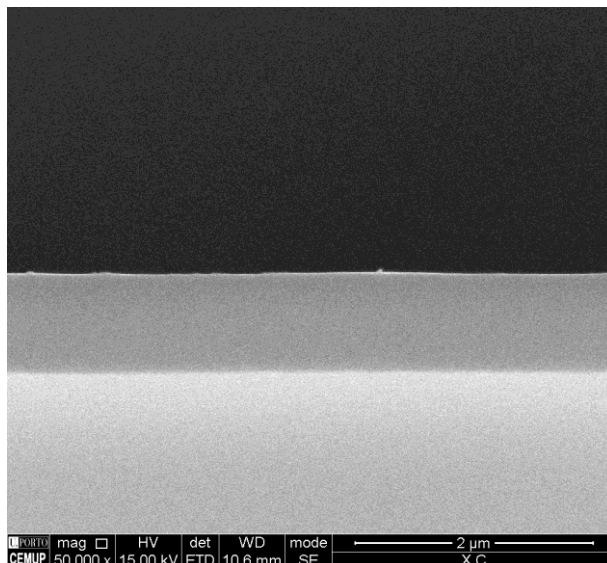
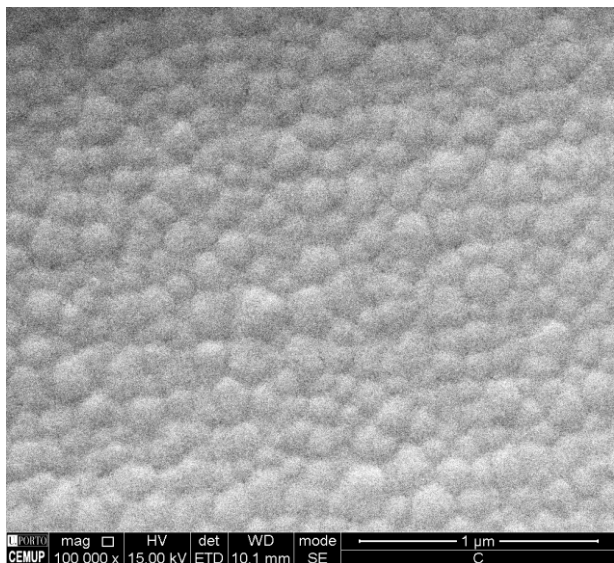
PTFEc_Ag



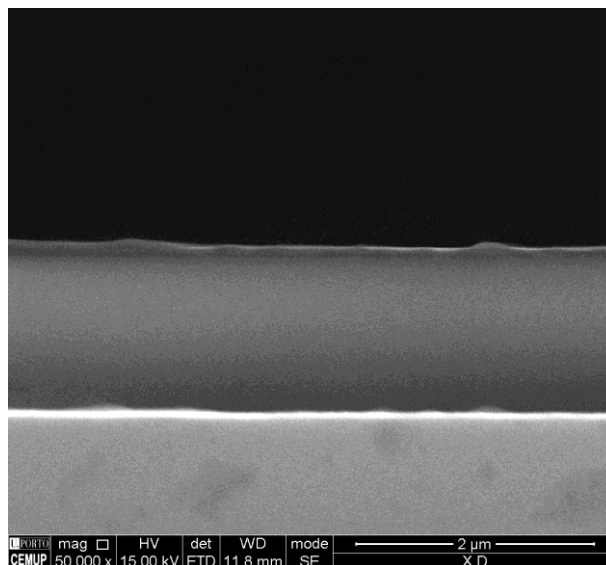
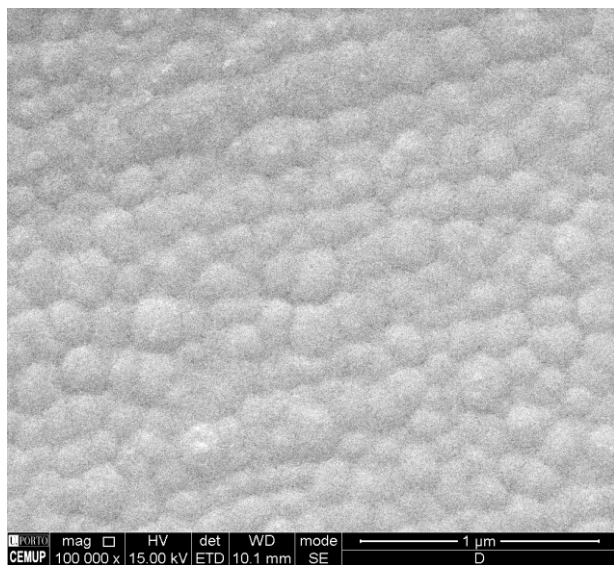
PTFEcA



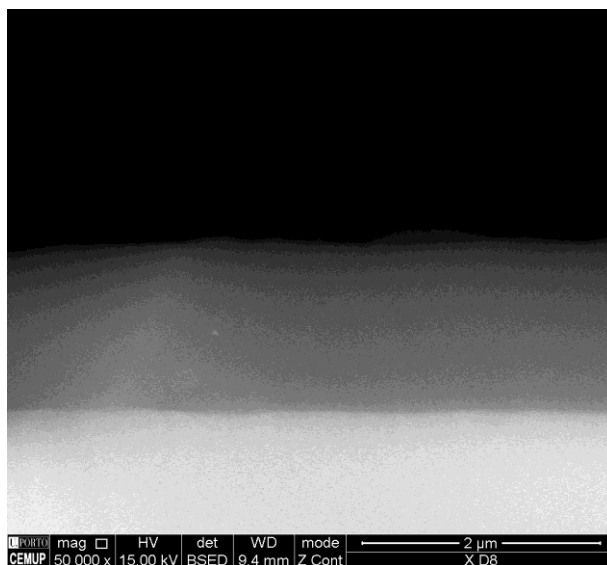
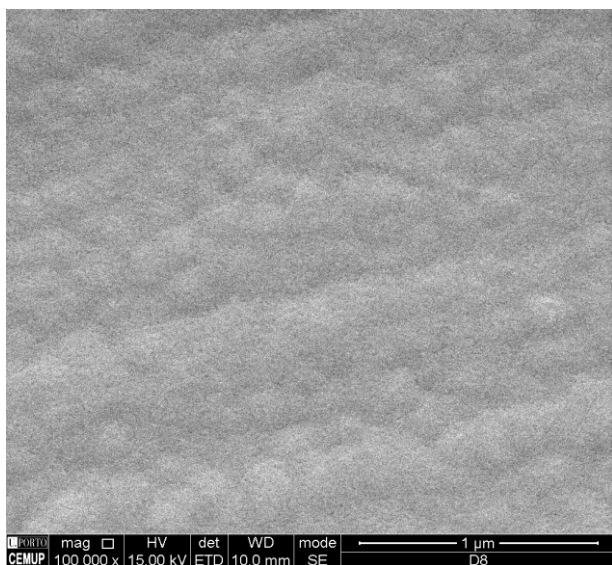
PTFEcC



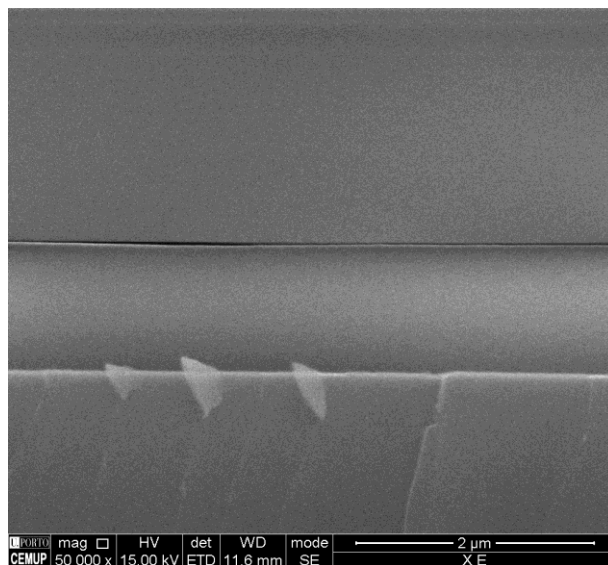
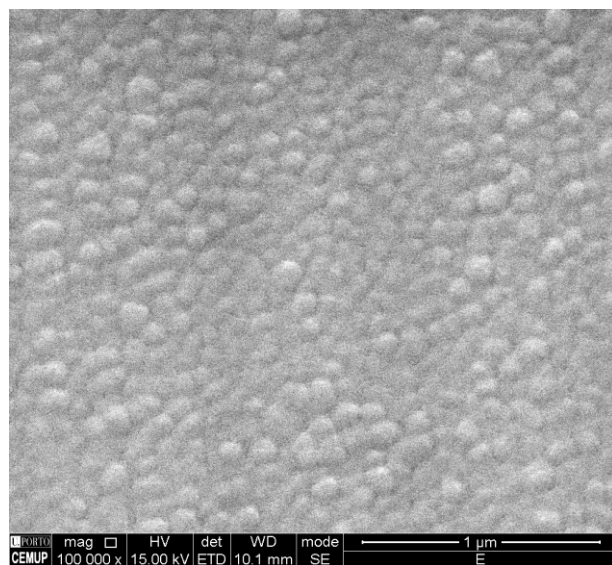
PTFEcD



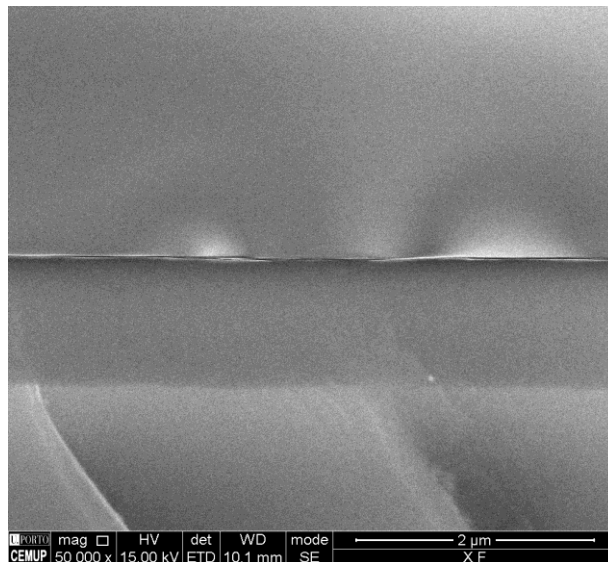
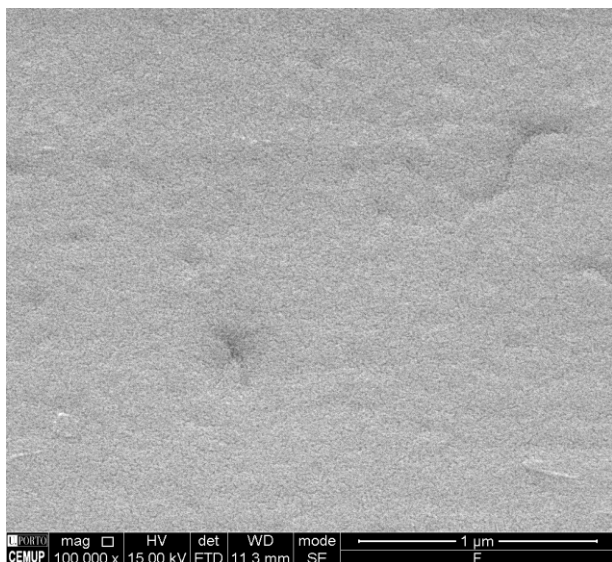
PTFEcD_Ag



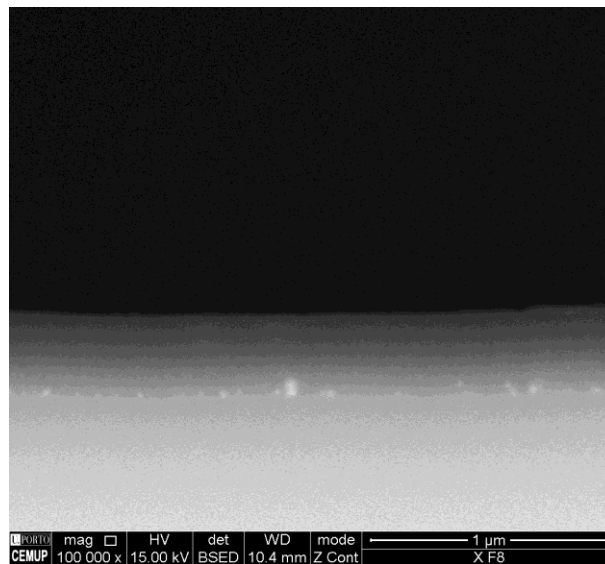
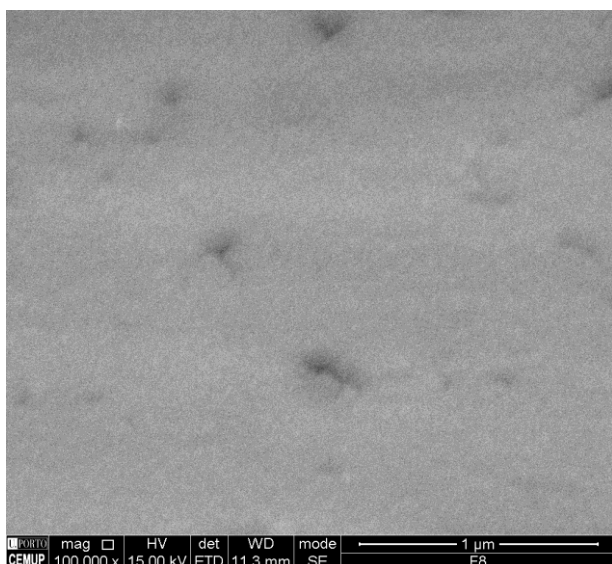
PTFEcE



PTFEcF



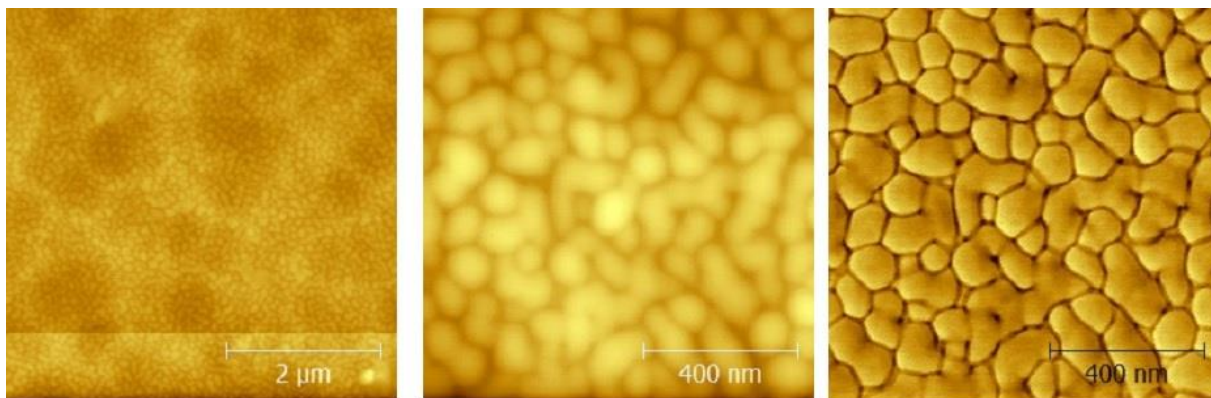
PTFEcF_Ag



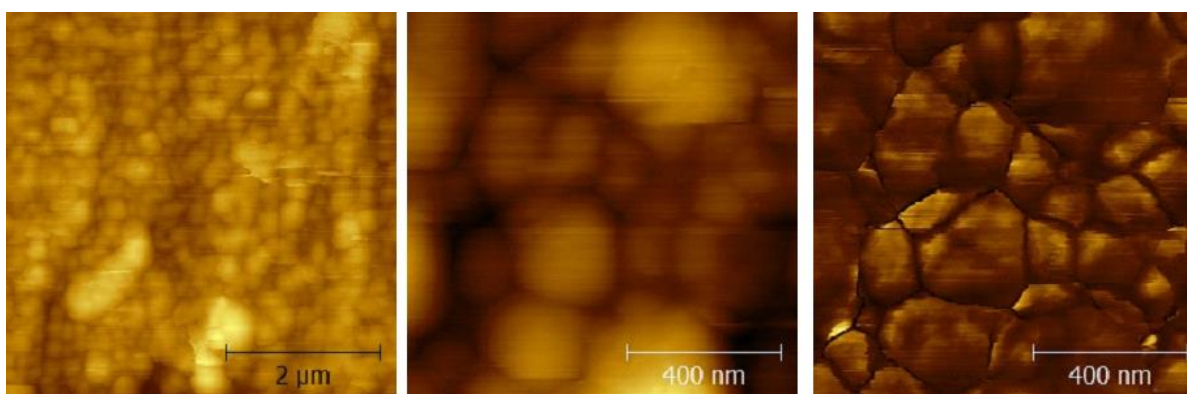
APÊNDICE D

Imagens de AFM topográficas de uma área de 5×5 e $1 \times 1 \mu\text{m}^2$, respetivamente, e de fase.

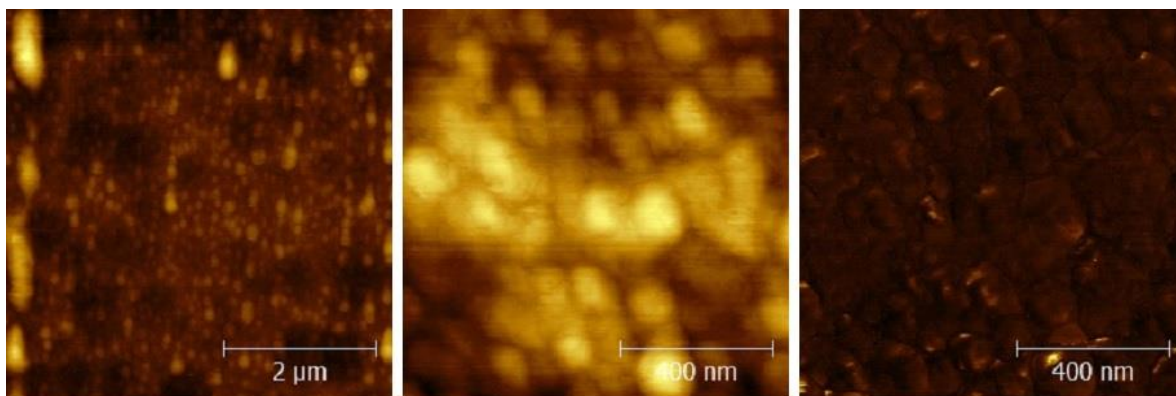
PTFEc



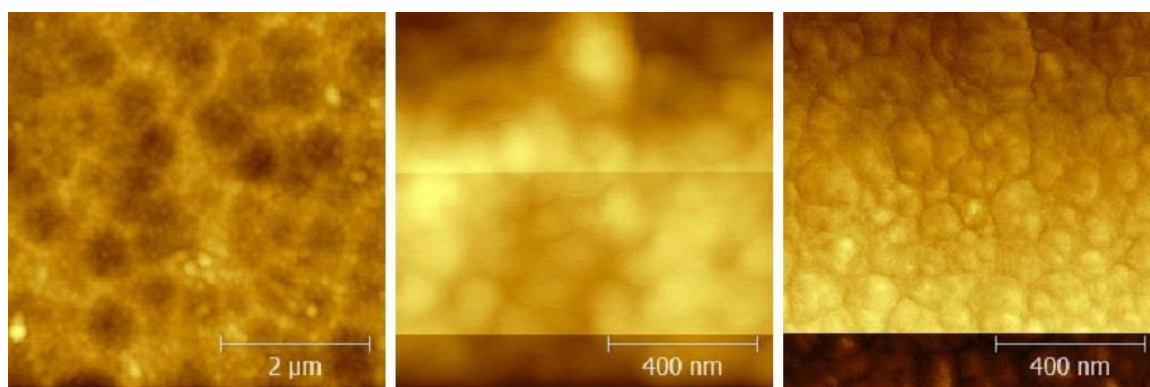
PTFEc_Ag



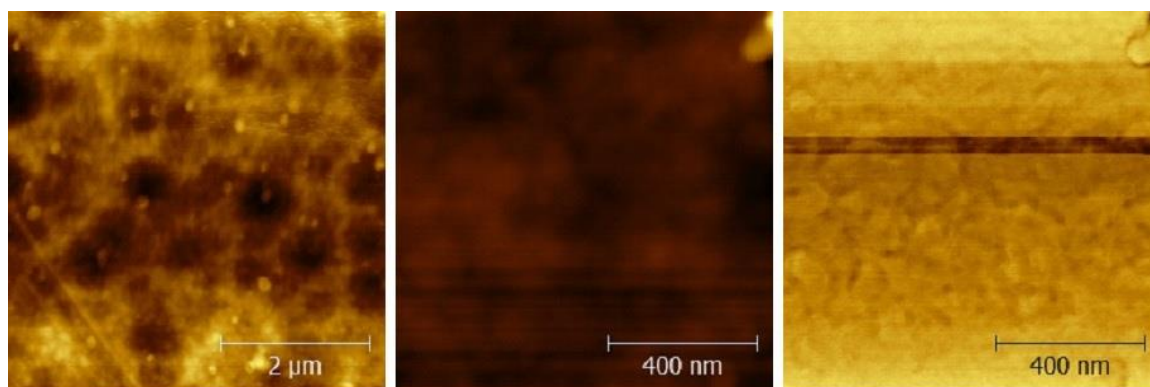
PTFEcA



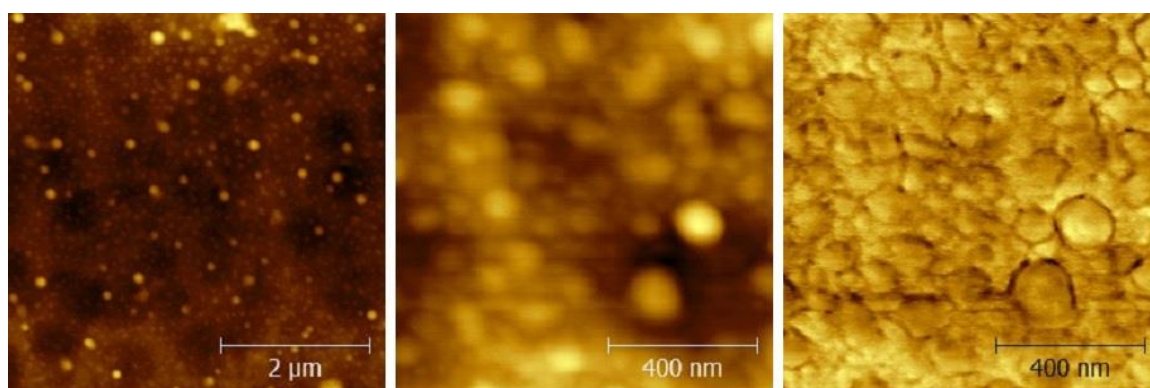
PTFEcB



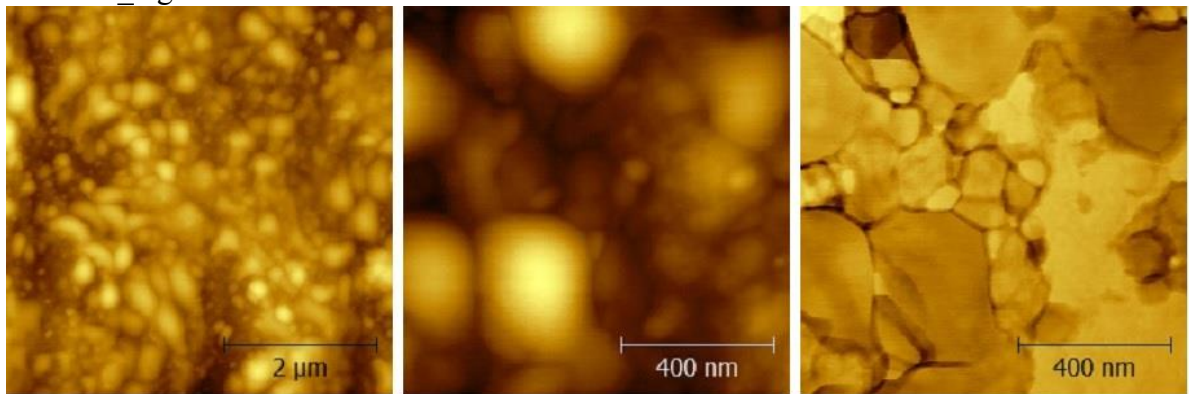
PTFEcC



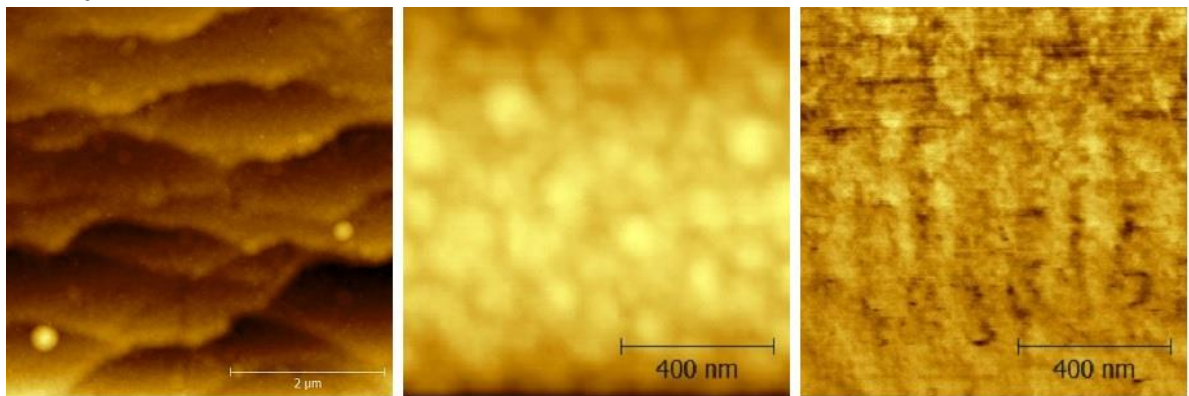
PTFEcD



PTFEcD_Ag



PTFEcE



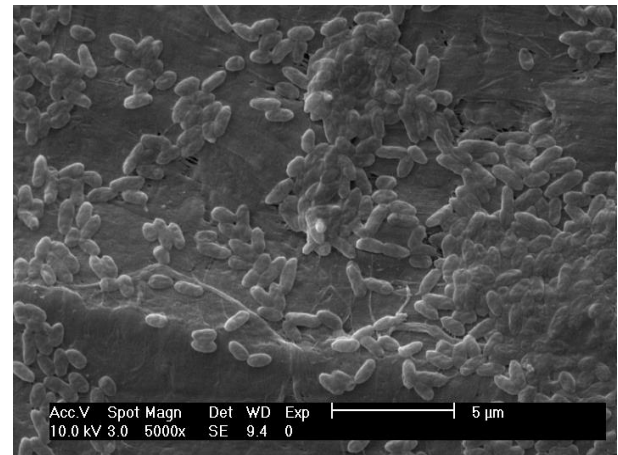
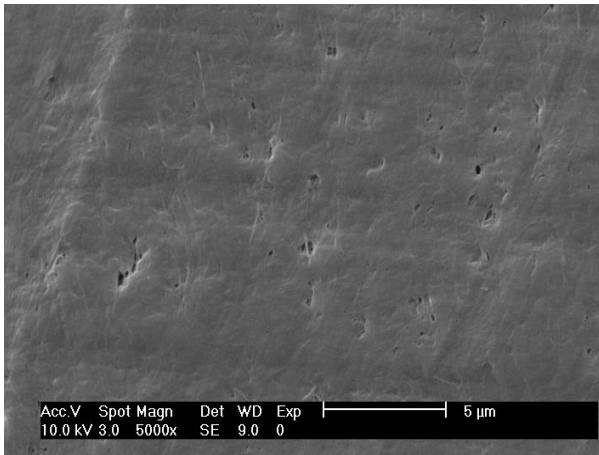
APÊNDICE E

Micrografias de SEM do contato das superfícies PTFE e PTFEcF com o meio sólido utilizado no teste do halo e o tampão PBS utilizado na formação de biofilme.

MEIO

TAMPÃO PBS

PTFE



PTFEcF

