

ANÁLISE DE ADESÃO E CRESCIMENTO BACTERIANO EM SUPERFÍCIES-MODELO DE DIFERENTES TOPOGRAFIAS

Victor Teixeira Noronha ⁽¹⁾; Francisco de Assis Sousa ⁽²⁾; Ana Cecília Alves ⁽³⁾; Yasmine Maria Lima de Oliveira Aquino ⁽⁴⁾; Terezinha Feitosa Machado ⁽⁵⁾; Amauri Jardim de Paula ⁽⁶⁾

- (1) Grupo de Interfaces Sólido-Biológicas (SolBIN), Departamento de Física, Universidade Federal do Ceará, P.O. Box 6030, 60455-900, Fortaleza-CE, Brazil. victor.noronha@fisica.ufc.br
- (2) Grupo de Interfaces Sólido-Biológicas (SolBIN). diassis@fisica.ufc.br
- (3) Grupo de Interfaces Sólido-Biológicas (SolBIN). acecialves@gmail.com
- (4) Grupo de Interfaces Sólido-Biológicas (SolBIN). yasmineaquino@gmail.com
- (5) Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza-CE, Brazil. terezinha.feitosa@embrapa.br
- (6) Grupo de Interfaces Sólido-Biológicas (SolBIN). amaurijp@fisica.ufc.br

INTRODUÇÃO

A formação de biofilmes bacterianos causa prejuízos em diversos setores. No campo da medicina e odontologia, biofilmes podem ser observados em quase todos os tipos de aparatos médicos, como cateteres e implantes, sendo causa de periodontite e infecções crônicas. Em relação à área industrial, contaminações causadas por microrganismos patogênicos durante o processo de manufatura, processamento e embalagem de alimentos e remédios têm grande importância para a saúde pública. Além disso, o biofilme representa uma barreira para o transporte de massa e energia, o que resulta em diminuição de capacidade produtiva e aumenta os gastos energéticos. A remoção do biofilme resulta em altos custos de limpeza e manutenção para diversos tipos de indústrias, como marítima, de laticínios, alimentos, sistemas de água, petróleo, papel, óptica, odontológica e hospitais. A proposição de estratégias para reduzir ou eliminar a formação de biofilmes têm sido encorajada recentemente, muito em virtude da significativa resistência dos biofilmes aos antibióticos convencionais. Estas estratégias baseiam-se em: (i) inibição da adesão inicial dos microrganismos a superfície e da colonização; (ii) interferência nos processos de sinalização molecular presentes na modulação do crescimento do biofilme e (iii) desagregação do biofilme. Materiais com capacidade de inibir a formação de biofilmes podem ser alcançados tanto pela modificação da superfície do material (conferindo propriedades anti-adesivas, por exemplo) como pela incorporação de agentes biocidas. Grandes esforços têm sido realizados com o objetivo de “engenheirar” superfícies que possam impedir os primeiros estágios de adesão (Garrett, Bhakoo e Zhang, 2008; Hori e Matsumoto, 2010; Mebert *et al.*, 2016; Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013). A influência da rugosidade das superfícies na adesão bacteriana e formação de biofilmes têm sido estudados desde o início dos anos 80. A nanotecnologia proporcionou técnicas de fabricação com

melhores resoluções para o controle de superfícies com nanorrugosidade. Estas técnicas incluem corrosão íon-reativa, corrosão química, oxidação anódica e recobrimentos com polímeros. Com o advento destas técnicas, foi possível averiguar o papel da rugosidade com maior acuidade. Entretanto, embora diversos estudos tenham tentado estabelecer uma correlação direta entre nanotopografia e adesão bacteriana, uma explicação definitiva ainda não foi alcançada. (Crawford *et al.*, 2012; Hasan, Crawford e Ivanova, 2013; Mebert *et al.*, 2016; Rizzello, Cingolani e Pompa, 2013). Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar a adesão e crescimento bacteriano em superfícies modelo de silício com diferentes topografias.

METODOLOGIA

Preparação das superfícies modelo (substratos de silício)

Os substratos de silício de 5 x 5 mm pré-cortados foram primeiramente limpos por sonicação em acetona por 5 min e, então, extensivamente enxaguados com água ultrapura (Si Limpo). Depois da etapa de limpeza, as amostras foram então submetidas à corrosão (ou “ataque”) anisotrópica com solução de hidróxido de potássio 1 M. As amostras de silício foram submersas através de pinças na solução de KOH 1 M e mantidas sob agitação magnética. Para avaliação do efeito da topografia na adesão microbiana três diferentes combinações de tempo de ataque e temperatura foram avaliados: 60 °C e 15 min, 70 °C e 15 min, 70 °C e 60 min. Após o ‘ataque’, as amostras foram lavadas com água ultrapura em abundância e submetidos à sonicação em água ultrapura por 5 minutos. Após o ataque, as amostras foram lavadas com água ultrapura em abundância e submetidos à sonicação em água ultrapura por 5 minutos.

Incubação com suspensão bacteriana

A cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6539 foi utilizada para quatro tipos de amostra (cada uma feita em triplicata): silício limpo, silício atacado com KOH 1 M a 60°C por 15 minutos, silício atacado com KOH 1 M a 70°C por 20 minutos e silício atacado com KOH 1 M a 70°C por 60 minutos. Todas as amostras foram esterilizadas em luz UV durante 30 minutos (15 minutos para cada uma das faces). 40 uL de uma suspensão bacteriana de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL foram inoculados em cada um dos poços que continham 2 mL de caldo BHI e um substrato de silício por poço em uma placa para cultura de células (24 poços). Após o inóculo, as placas foram incubadas em estufa a 35° C durante três diferentes tempos: 3h, 24 h e 96 h. Após esse período, os

substratos foram lavados com NaCl 0,85% duas vezes cada e prosseguiram para o processo de coloração com o kit para avaliação de viabilidade bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™. Por fim, as amostras foram submetidas a uma tensão de cisalhamento, passando-se por uma placa de petri de 90 mm de diâmetro contendo solução NaCl 0,85% em quantidade suficiente para cobrir a amostra de silício. Depois desta etapa, as amostras foram secas livremente ao ar e montadas em lâmina para visualização através de microscopia confocal por varredura a laser (LSCM).

Análise das micrografias obtidas por LF-CLSM

As imagens obtidas através da microscopia foram primeiramente exportadas em escala de cinza e, então, binarizadas (o limiar de binarização de 0,003). Depois disso, os elementos da imagem (bactérias) foram identificados e a área de cada elemento foi calculada. Uma etapa de eliminação de ruídos é realizada e a área total de todos os elementos é somada. Por fim, a área total coberta pelos elementos é obtida através de soma e dividida pela área individual de uma bactéria (em pixels) para estimativa do número de bactérias presentes. A área individual de uma bactéria foi estimada através de análise qualitativa das imagens, sendo fixada em 61,7 pixels.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições de temperatura e tempo de ataque testadas, superfícies com diferentes graus de rugosidade puderam ser obtidas. Através do processo de corrosão, crateras e pirâmides foram criadas na superfície do substrato, estas estruturas causaram as mudanças de rugosidade. Para descrição da rugosidade das superfícies, dois parâmetros foram utilizados: a Rugosidade média (R_a) e a Rugosidade média quadrática (RMS ou R_q). A partir dos valores de rugosidade obtidos por microscopia de força atômica (AFM), pode-se afirmar que as amostras que permaneceram durante mais tempo em solução de ataque (Si 70°C 60 min) apresentaram os maiores valores de R_a e RMS dentre as condições testadas. Nessas amostras, algumas regiões apresentaram a presença de pirâmides muito grandes, da ordem de 1 a 2 μm , enquanto o restante da superfície apresenta elementos de algumas dezenas ou poucas centenas de nanômetros, resultando em elevados valores de desvio padrão. Para os substratos atacados durante 15 min em temperaturas diferentes, pode-se observar valores muito próximos de R_a e RMS. Embora as superfícies apresentem valores parecidos, os maiores valores de rugosidade para as amostras atacadas a 60 °C podem ser devidos à ocorrência mais numerosa de pirâmides menores em relação às amostras atacadas a 70 °C durante o mesmo tempo.

Com base nos resultados de microscopia confocal, é possível observar que para os tempos de incubação de 3 e 24 h, o número de bactérias aderidas não é significativamente diferente entre todos os tratamentos empregados. Entretanto, para o tempo de 96 horas, os tratamentos podem ser agrupados em três distintos padrões: (i) Si limpo, (ii) Si 60°C 15 min e Si 70°C 15 min e (iii) Si 70°C 60 min. As amostras atacadas por 15 minutos, com valores de R_a próximos a 7 nm, apresentaram uma maior quantidade de bactérias aderidas, seguido das amostras atacadas a 70°C durante 60 minutos ($R_a \sim 170$ nm) e pelos substratos de SiO₂/Si apenas limpos ($R_a \sim 0,2$ nm).

Tabela 1 - Parâmetros de rugosidade para amostras com diferentes topografias

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

Figura 1- Micrografias obtidas por AFM. (a) Substrato de SiO₂/Si *raw*; (b) e (c) Si atacado a 60°C por 15 min; (d) Si atacado a 70°C por 15 min; (e) e (f) Si atacado a 70°C por 60 min. As micrografias representam uma área de 20 x 20 μ m.

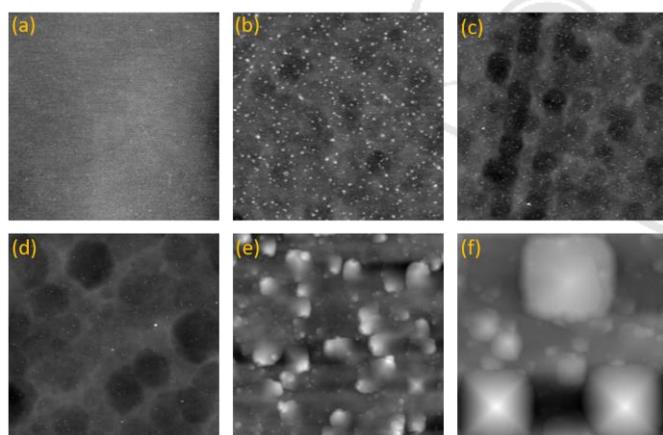
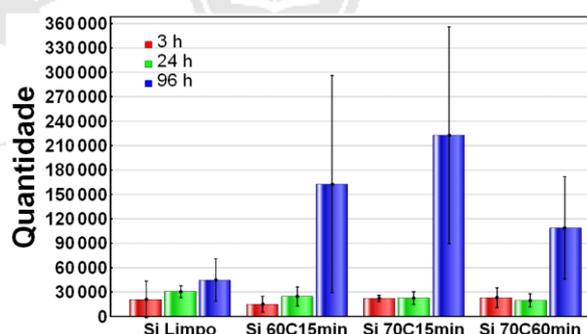


Figura 2 - Número de bactérias aderidas em função do tempo para superfícies com diferentes rugosidades.



Na literatura, é comumente proposto que a correlação entre o aumento da retenção de bactérias e o aumento da rugosidade acontece em virtude de: maior disponibilidade de área

superficial para adesão, a proteção de forças de cisalhamento e aumento do transporte de massa causados pelas características topográficas. A adesão das células microbianas sobre o relevo presente pode aumentar também a área de contato entre célula e superfície, permitindo um aumento da energia de ligação. Por outro lado, o custo à célula microbiana em termos de energia elástica ao distorcer, assim como energia térmica do ambiente, pode resultar em uma barreira energética à adesão (Anselme *et al.*, 2010). *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva que possui cerca de 1000 nm de diâmetro. Embora estas bactérias apresentem carga superficial negativa, a grande presença de ácidos teicóicos e lipoteicóicos na parede celular destas bactérias as confere um certo caráter hidrofóbico (Helbig *et al.*, 2016; Truong *et al.*, 2010). Superfícies que sofreram corrosão anisotrópica apresentam uma característica mais hidrofóbica que àquelas que não passaram por este processo. Esse aumento é decorrente da presença das estruturas piramidais presentes formadas no processo de corrosão (Xiu *et al.*, 2007). A mudança de energia da superfície provida pela formação das pirâmides pode contribuir para a adesão de *S. aureus*, em virtude das características hidrofóbicas da superfície bacteriana. O aumento da adesão e colonização das superfícies com valores de R_a próximos a 7 nm obtidos no presente trabalho pode ser decorrente da interação com estruturas extracelulares. Estruturas como flagelos, pili e fímbrias, além de proteínas e carboidratos presentes na parede celular, possivelmente, são capazes de otimizar a energia de ligação ao padrão topográfico em escala nanométrica devido suas dimensões diminutas. Alguns autores propõem que as fímbrias podem mediar a resposta bacteriana a superfícies com rugosidade na escala nanométrica. Entretanto, o estudo do papel destas estruturas na adesão a superfícies nanotopográficas ainda não foi contemplado na literatura. (Anselme *et al.*, 2010).

CONCLUSÕES

A análise de adesão e crescimento microbiano em diferentes topografias mostrou que *S. aureus* apresentou maior adesão e crescimento em superfícies de silício com R_a de cerca de 7 nm. A presença de estruturas extracelulares pode contribuir para este aumento de adesão. Entretanto, experimentos com maior espaço amostral, maior variação topográfica e a análise de adesão bacteriana em tempo real devem ser realizados para maior entendimento do processo de adesão neste tipo de superfície.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao suporte do CNPq, CAPES, FUNCAP, Central Analítica-UFC/CT-INFRA/MCTI-SISNANO/Pró-Equipamentos-CAPES e ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Embrapa Agroindústria Tropical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELME, K. *et al.* The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 10, p. 3824–3846, 2010.

CRAWFORD, R. J. *et al.* Surface topographical factors influencing bacterial attachment. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 179–182, p. 142–149, 2012.

GARRETT, T. R.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 9, p. 1049–1056, 2008.

HASAN, J.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 295–304, 2013.

HELBIG, R. *et al.* The impact of structure dimensions on initial bacterial adhesion. **Biomater. Sci.**, v. 4, n. 7, p. 1074–1078, 2016.

HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 424–434, 2010.

MEBERT, A. M. *et al.* Chapter 5 - Surface chemistry of nanobiomaterials with antimicrobial activity*. *In*: GRUMEZESCU, A. M. (Ed.). **Surface Chemistry of Nanobiomaterials**. [s.l.] William Andrew Publishing, 2016. p. 135–162.

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

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

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