

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ALAN DOS SANTOS DA SILVA

**Filmes finos transparentes, baseados em compostos naturais, como  
estratégia antifúngica aplicada a componentes ópticos**

Tese apresentada como requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor em Química

Prof. Dr. João H. Z. dos Santos  
Orientador

Prof. Dr. Augusto Schrank  
Coorientador

Porto Alegre, 30 de outubro de 2023

A presente tese foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre julho/2020 e outubro/2023, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação do Professor Doutor **João Henrique Zimnoch dos Santos** e Coorientação do Professor Doutor **Augusto Schrank**. A tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

**Comissão Examinadora:**

---

Prof. Dr. Fabiano Severo Rodembusch

---

Profa. Dra. Tania Maria Haas Costa

---

Prof. Dr. Raul de Oliveira Freitas

---

Dra. Jussânia de Almeida Gnoatto

---

Prof. Dr. João H. Zimnoch dos Santos

---

Prof. Dr. Augusto Schrank

---

Alan dos Santos da Silva

## **Agradecimentos**

Pensando nos agradecimentos para minha tese, quem imaginaria que eu viveria isso, quando o objetivo de terminar o ensino médio e trabalhar, para tentar existir de forma digna e, se possível, segura, já parecia exigir tanto. Quantas vezes, no meio de espaços acadêmicos, eu senti a confusão por não saber bem o que estava fazendo, muito menos por onde seguir. A minha linha de chegada, o meu objetivo, já tinham ficado muito para trás. Eu me sentia como alguém numa sala escura, tateando o chão, tentando sentir algum caminho possível. Nada era familiar, tampouco natural. E honestamente, até hoje não é, mas essa jornada cheia de sensações me ensinou que eu quero ajudar a tornar tudo isso mais natural para outras pessoas como eu, poder acreditar em suas ideias, incentivar seu bem-estar, instigar sua criatividade, desafiar suas competências de forma respeitosa, enfim, talvez abrir uma fresta para essa sala seja menos escura, assim como eu sinto que o prof. João tem em ensinado, a cada conversa, a cada projeto, a cada sorriso que nos motiva a avançar mais uma etapa. Na verdade, talvez essa sensação de não saber muito bem o que eu estou fazendo me acompanhe por mais tempo, porém conviver com o prof. João tem me permitido conhecer mais um caminho possível, um sul, que aponta para uma forma de ser, que com muito carinho, respeito e inteligência, ajuda outras pessoas a serem também, para além do mundo acadêmico. Eu não entendo ainda a dimensão disso tudo, mas certamente, o título de doutor é uma das grandes belas coisas que levo desta orientação. Existem tantas mais. Por tudo isso, e por tudo mais, te agradeço imensamente, prof.

Conforme vou escrevendo isso, vou me dando conta que vim somando belos momentos e belas pessoas nesse caminho, e uma delas é um ser que me recebeu em sua sala, com uma lente de câmera em uma das mãos, um caderno de ideias na outra, e nenhum conhecimento de microbiologia na cabeça. Hoje, ele assina este documento como meu co-orientador. É impossível colocar no papel o impacto que a nossa conversa teve sobre este projeto e, sobretudo, sobre mim. Um projeto, que eu havia rascunhado há alguns anos, estava sendo abraçado, e mais do que isso, impressionantemente incentivado por alguém que nem me conhecia, a não ser por um email que eu havia enviado há poucos dias, perguntando se poderíamos conversar sobre uma ideia. De lá para cá, isso se manteve, seja em conversas sobre ciência, seja sobre meus experimentos, eu tinha a sensação de receber uma recarga de vontade e paixão pelo fazer científico ao encontrar com o prof. Augusto. Mais do que isso, eu acho que nunca falei isso, mas para mim foi

especialmente importante, quando em encontros online, devido à pandemia, o prof pegava algum tempinho para saber como cada alune estava. Para mim, era mais um lembrete de que a gente não estava sozinho, mesmo que isolado. Para além dos equipamentos, dos conhecimentos e das dicas, eu agradeço ao senhor, por cada vez que ao me ver no lab, me perguntou “e aí Alan, como tá, meu filho?”.

Talvez isto já esteja bem extenso, mas o doutorado também foi, e tem muita gente envolvida. Uma delas é o meu prof. de microbiologia, William, que me ensinou desde o mais básico até o mais complexo do que sei de microbiologia. Felizmente, eu já tive a oportunidade de dizer isso, mas reforço aqui que conviver com essa pessoa foi uma experiência linda, e ainda que curta, foi o suficiente para nascer e crescer uma grande admiração pela forma como essa pessoa lidava com outras e como vivia a ciência. É muito bonito para mim, poder concluir esta etapa levando comigo mais uma referência.

Eu também quero agradecer muito às pessoas que gentilmente me acolheram e auxiliaram, ao longo do meu tempo no CBiot. São muitas pessoas, dentre ICs, mestrands, doutorands, pos-docs e profs, por isso, eu agradeço a todes em tendo como símbolos a prof. Marilene, os/as colegas Rafa, Nico, Matheus, Felipe, Val, Eryk, Júlia, Henrique e Fernanda. De verdade, muito agradecido pela paciência e pelo carinho.

Já na química, há outro mol de gente a quem eu quero agradecer muito, por tornarem o caminho mais suave. Ainda assim, há nomes que saltam à minha mente e, por isso, uso este espaço para agradecer aos/às colegas Matheus, Brenda, Juliano, Alex, Fabi e Jorge, por tantas coisas boas que pude experienciar em momentos de troca. Ainda na química, eu quero agradecer imensamente ao prof. Fabiano, que tem sido uma pessoa de grande importância para o meu desenvolvimento, para além do mundo científico. Eu fico muito feliz por encontrar mais uma pessoa à qual eu possa olhar e enxergar diferentes inspirações. É uma grande alegria conviver com uma pessoa tão bonita. Finalizando na química, eu quero agradecer ao Alex, ao Júlio e à Joyce, que possibilitaram diferentes análises junto à Central Analítica, e que através de suas competências e comprometimento, fazem com que muitas das pesquisas desenvolvidas no Instituto sejam possíveis.

Por fim, eu agradeço aos meus, àquelas pessoas que me permitem existir com ou sem diploma, com ou sem títulos, que fazem parte de quase todas as partes que me compõem. Em especial e sobretudo, este agradecimento tem destinatário a minha

família, que mesmo sem saber ao certo o que essas graduações e esses títulos significam, sempre me desejou muitas formas de “bem”, seja pela sorte, pelo sucesso, pela coragem, não importa qual face, o desejo sempre foi o meu bem. A minha família pode não receber um texto longo, com atravessamentos em momentos cruciais para o desenvolvimento do projeto, mas eu sei bem que se não fosse pela minha família, pelo amor e carinho que tem por mim, nenhuma das linhas que vieram antes existiria. Por isso, e por uma imensidão de outras coisas, à minha mãe, ao meu pai e às minhas irmãs, exponho o meu agradecimento mais profundo.

## RESUMO

Devido aos danos que alguns fungos podem causar em superfícies ópticas, há a necessidade de abordagens que inibam a interação fungo-vidro. Assim, a presente tese estabelece protocolos de funcionalização de superfícies de vidro com organosilanos, por processo sol-gel, e posterior recobrimento por composto com efeito antiadesivo para fungos. A funcionalização permite o controle de propriedades físicas e químicas do substrato, e assim, a interação com compostos químicos de interesse. Para identificá-los diferentes compostos foram investigados quanto aos seus potenciais de inibição de desenvolvimento e adesão do fungo *Aspergillus niger*, utilizado como fungo modelo. Dentre os compostos, destacaram-se eugenol e citral, pela capacidade de inibir a adesão de *A. niger*. Então deu-se início ao processo de funcionalização das superfícies de vidro. Para isso, o organosilano (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES) foi utilizado devido à possibilidade de controle da organização e espessura dos filmes produzidos, parâmetros importantes para a manutenção das características ópticas do vidro. De acordo com análises de transmitância e testes de adesão celular, os substratos de vidro funcionalizados com diferentes concentrações de APTES não apresentaram efeitos, como perda de transparência ou ação antifúngica. Então, fez-se a exposição dos substratos funcionalizado a diferentes concentrações de eugenol, para a produção do recobrimento antiadesivo. A partir dos testes de adesão celular, substratos expostos a soluções de eugenol foram capazes de inibir a adesão de *A. niger*. Ressalta-se que esse efeito foi observado para todas as concentrações de APTES, porém não houve inibição na ausência de funcionalização. Por fim, imagens adquiridas através de lentes modificadas com estes recobrimentos foram submetidas a análises de similaridade e de percepção humana, através das quais, evidenciou-se a manutenção da imagem e, desta forma, a potencialidade do recobrimento para dispositivos ópticos. Além disso, investigações sobre a síntese de nanopartículas de sílica (condições; incorporação de antifúngico; testes de ação contra *A. niger*) foram estabelecidas a fim de desenvolver as etapas iniciais para a elaboração de recobrimentos multifuncionais, baseados no ancoramento de nanopartículas.

Palavras-chave: sol-gel; superfície; antiadesão; nanopartículas; multifuncional.

## ABSTRACT

Approaches for preventing the fungi-glass interaction may be required due to the harm that fungi can cause to optical surfaces. Thus, this thesis offers protocols for anti-adhesion compounds combined with the sol-gel process to functionalize glass surfaces. This strategy allows tuning surfaces' physical and chemical properties to interact with certain compounds. Different substances, in which eugenol and citral had been highlighted, were tested to verify their potential to inhibit *Aspergillus niger* development and adhesion onto the glass surface. The glass functionalization with organosilane (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) was applied for the possibility of controlling its film thickness and structuring, which might be crucial for preserving the glass optical properties. The results of the fungus adhesion experiments and the transmittance analysis revealed that substrates modified within a range of APTES concentrations maintained their transparency without any antifungal effects. Then, the functionalized substrates were exposed to eugenol solution for producing the anti-adhesive coating and applied to *A. niger* adhesion experiments. The results showed their potential for inhibiting *A. niger* adhesion, even at different APTES concentrations. It is worth noticing that no inhibition was verified in the absence of APTES functionalization. Finally, digital images were taken through anti-adhesive modified lenses and compared to the control one by similarity analysis, using the color spaces RGB and L\*a\*b, and, moreover, by human eye perception with the help of an online self-perception form. Their results revealed the maintenance of the image characteristics, which presented high similarity with those stated as control, reinforcing the potentiality of these coatings for application on optical devices. Furthermore, some aspects of the silica nanoparticles synthesis were investigated (experimental conditions; antifungal addition; activity against *A. niger*) for providing the initial steps to elaborate multifunctional coatings based on modified nanoparticles anchoring onto glass surface.

Keywords: sol-gel; surface; antiadhesion, nanoparticles; multifunctional.

## Lista de figuras

- Figura 1.** Ilustração de processos de bioalteração de vidro envolvendo mecanismos biofísicos ou bioquímicos. À esquerda, estão exemplificados os mecanismos de ação envolvendo processos bioquímicos passivo — onde a bioalteração do vidro ocorre pelo contato com metabólitos liberados durante o ciclo de desenvolvimento do fungo — e ativo — onde há a liberação de compostos com alguma finalidade, como por exemplo, a extração de nutriente do vidro. À direita, estão exemplificados os mecanismos de ação envolvendo processos biofísicos não-específico — onde os efeitos são causados pelo desenvolvimento geral do fungo, como em casos de obstrução visual, pelo crescimento da biomassa — e específicos — onde a alteração está associada à alguma estrutura que desempenha efeitos específicos, como o caso de penetração por hifas..... 26
- Figura 2.** Micrografias obtidas por Gorbushina e Palinska <sup>28</sup> em experimentos induzindo o crescimento fúngico sobre substratos de vidro. Imagem adaptada de Gorbushina e Palinska <sup>28</sup>, sob autorização. Copyright © 1999, Kluwer Academic Publishers ..... 28
- Figura 3.** (A) Danos observados sobre a superfície de painéis de vitrais através de microscopia eletrônica de varredura, atribuídos a processos de biocorrosão. (B e C) Estruturas fúngicas desenvolvidas junto às regiões de corrosão sobre o vidro. Imagem adaptada de Carmona et al. <sup>26</sup> sob autorização. Copyright © 2006 Elsevier Ltd. .... 28
- Figura 4.** Micrografias realizadas em oculares de binóculos disponíveis em museus do Vietnã, indicando a presença de esporos (A), hifas desenvolvidas (B) e padrões de lixiviação ocasionados pelo desenvolvimento fúngico, observados após a limpeza das lentes (C). Imagem adaptada de Ngo et al. <sup>36</sup>, sob autorização. (Licenciado sob CC BY 4.0 - <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)..... 30
- Figura 5.** Micrografias de asas de diferentes espécies de cigarras, comumente estudadas quanto seus potenciais autolimpantes e antimicrobianos. Imagem adaptada de Román-Kustas e col. <sup>44</sup>, sob autorização. (Licenciado sob CC BY-NC-ND 4.0 - <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)..... 32
- Figura 6.** Efeito antimicrobiano de superfície nanoestruturada com nanopilares sobre células da bactéria *Klebsiella pneumoniae*. (A) micrografias por microscopia eletrônica de varredura, (B) micrografias por microscopia eletrônica de transmissão e (C) modelagem dos pontos de penetração da célula pelos nanopilares. Imagem adaptada de

Jenkins e col. <sup>45</sup> , sob autorização. (Licenciado sob CC BY 4.0 - <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> ) .....	32
<b>Figura 7.</b> Ilustração das diferentes etapas e abordagens elaboradas ao longo da presente tese, com o intuito de estabelecer estratégias para promover a inibição da adesão fúngica sobre o vidro. ....	41
<b>Figura 8.</b> Ilustração do porta-amostra utilizado para as medidas de fluorescência das lamínulas modificadas. ....	43
<b>Figura 9.</b> Ilustração das etapas de cultivo (1), preparo de suspensão de inóculo (2 e 3), montagem da placa de 96 poços (4), e verificação de efeitos no desenvolvimento fúngico por ação dos compostos investigados (5), do teste de sensibilidade à antifúngicos, conforme <i>Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos; Norma Aprovada</i> (Documento M38-A do NCCLS) <sup>67</sup> .....	46
<b>Figura 10.</b> Ilustração dos procedimentos executados durante o protocolo utilizado para verificação de adesão fúngica a substratos de vidro. DMSO: Dimetilsulfóxido. ....	48
<b>Figura 11.</b> Ilustração da abordagem escolhida para a análise de hifas de <i>A. niger</i> , desenvolvidas sobre substrato de ouro, utilizando a técnica de Microespectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier ( $\mu$ FTIR). Para cada região selecionada, um espectro de 4000 a 400 $\text{cm}^{-1}$ foi adquirido. O espectro final resulta da combinação de 15 outros, sendo 5 espectros por cada replicata. ....	50
<b>Figura 12.</b> Ilustração de etapas envolvidas na modificação de lamínulas de vidro com APTES. Da esquerda para a direita: i) imersão de suporte de quartzo contendo 8 lamínulas circulares, em 30 mL de tolueno seco; ii) adição do organossilano aplicado na modificação da superfície das lamínulas ao meio reacional, após equilíbrio da temperatura; iii) tratamento das lamínulas após o período de reação, para eliminar resíduos do processo através de sonicação em tolueno; iv) armazenamento das lamínulas em dessecador após processo de secagem. A manipulação dos reagentes e da reação se deu sob atmosfera de nitrogênio. ....	52
<b>Figura 13.</b> Ilustração de etapas envolvidas na estratégia de verificação do filme de APTES por sinalização com composto fluorescente: i) exposição de lamínulas modificadas com APTES à solução do composto utilizado como marcador, em tolueno, a 70 °C, sob atmosfera de nitrogênio; ii) remoção de excesso de marcador por lavagem em tolueno assistida por ultrassom; iii) estocagem em ambiente com umidade reduzida. ....	54

<b>Figura 14.</b> Ilustração das etapas desenvolvidas para síntese e purificação das partículas de sílica por Método de Stöber. A síntese envolve as etapas de: i) homogeneização do solvente, co-catalisador e catalisador; ii) equilíbrio da solução a 25 °C; iii) adição do precursor de sílica (TEOS); iv) manutenção da reação a 25 °C durante 24 horas. A purificação das partículas obtidas após 24 horas de reação envolve as etapas de: i) remoção da solução de reação por ultracentrifugação; ii) lavagem com etanol assistida por ultrassom, seguida de ultracentrifugação; iii) secagem de partículas suspensas em etanol. ....	56
<b>Figura 15.</b> Ilustração do procedimento de purificação das partículas de sílica, baseado na lavagem destas em etanol, assistido por ultrassom, e posterior secagem das mesmas suspensas em etanol, utilizando estufa a 70 °C ou evaporação a temperatura ambiente. ....	59
<b>Figura 16.</b> Ilustração do procedimento de secagem das partículas de sílica através de exposição das mesmas a altas rotações (12000 rpm) sob vácuo. Previamente ao processo de secagem, as partículas foram purificadas por meio de lavagens com água ultrapurificada, e congeladas em nitrogênio líquido. ....	60
<b>Figura 17.</b> Ilustração de procedimento de secagem das partículas de sílica através de liofilização. Previamente ao processo de secagem, as partículas foram purificadas por meio de lavagens com água ultrapurificada, e congeladas em nitrogênio líquido .....	60
<b>Figura 18.</b> Ilustração do procedimento de síntese aplicado para produção de partículas de sílica modificadas com organosilano 3-(trietoxisilil)propil isocianato.....	63
<b>Figura 19.</b> Ilustração das etapas de: (1) cultivo de <i>A. niger</i> em meio inclinado e coleta inicial de esporos; (2) preparo de suspensão estoque de esporos (solução-mãe); (3) preparo do inóculo de esporos em suspensão de partículas de sílica modificadas com eugenol-silano; (4) incubação do sistema fungo-partículas sob agitação e temperatura controlada; (5) Inoculação da suspensão de esporos e partículas de sílica à placa de Petri contendo meio sólido; (6) Cultivo e contagem das colônias desenvolvidas. Experimento realizado em quadruplicata.....	67
<b>Figura 20.</b> Ilustração do processo de preparação de lâminas de vidro utilizadas em teste de qualidade de imagem. ....	68
<b>Figura 21.</b> Ilustração das configurações utilizadas para aquisição das imagens em ambiente controlado. ....	69
<b>Figura 22.</b> Ilustração das etapas estabelecidas para a amostragem das imagens utilizadas em análises de similaridade.....	70

<b>Figura 23.</b> Indicativos experimentais de formação de estruturas possivelmente associadas à presença de biofilme, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorvância sob o comprimento de onda de 600 nm (A) e visualização através da técnica de Perfilometria Óptica (B). Replicatas N = 4 .....	74
<b>Figura 24.</b> Resultados de experimento de inibição de biofilme utilizando eugenol e citral em solução, nas concentrações equivalentes a 1 e 2 vezes os valores de MIC determinados em testes de sensibilidade, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorvância sob o comprimento de onda de 600 nm. Replicatas N = 4. Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle negativo * ( $p < 0,05$ ). Teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. ....	75
<b>Figura 25.</b> Espectros adquiridos por análises de micro-FTIR, em modo Refletância em reflexão de ponto único, realizadas em hifas de <i>A. niger</i> desenvolvidas sobre substrato de silício recoberto com filme fino de ouro. Na parte superior estão os espectros de hifas desenvolvidas na presença de eugenol, enquanto na parte inferior estão os dados referentes àquelas cultivadas na presença de citral. Condições de análise: modo reflectância; magnificação de 15 vezes; resolução de $8 \text{ cm}^{-1}$ ; 512 scans; detector MCT. Integração dos sinais para determinação da razão Amida I/Amida II, a partir de deconvolução dos sinais na faixa de $1730 \text{ cm}^{-1}$ a $1480 \text{ cm}^{-1}$ , com picos centrados em aproximadamente $1640 \text{ cm}^{-1}$ e $1540 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídos a Amida I e II, respectivamente. ....	76
<b>Figura 26.</b> Resultados de experimento de inibição de biofilme sobre lamínulas modificadas utilizando diferentes concentrações de organosilano APTES, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorvância sob o comprimento de onda de 600 nm. Replicatas N = 4. Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle positivo * ( $p < 0,05$ ) e ** ( $p < 0,001$ ). Teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.....	79
<b>Figura 27.</b> Espectros de transmitância para lamínulas não modificadas e modificadas com APTES 0,1 % e 2 % na faixa espectral de 200 a 700 nm (A). (B) amplificação do perfil de transmitância das lamínulas na faixa de 400 a 700 nm. ....	80
<b>Figura 28.</b> Medidas de molhabilidade através da técnica de ângulo de contato pelo método de gota séssil, realizadas sobre a superfície de lamínulas sem modificação e modificadas com APTES, C8 e C18. Replicatas para Branco N = 12; demais replicatas N = 4. ....	81

**Figura 29.** Ilustração de reações entre o composto utilizado com sinalizador e: (superior) uma amina primária com grupo substituinte R; (inferior) grupo amina presente na molécula do organosilano APTES, presente na superfície de lamínulas modificadas. Em ambos os cenários se almeja a formação da ligação tioureia. .... 82

**Figura 30.** Espectros de fluorescência obtidos para as amostras de lamínulas, com e sem modificação, na faixa de 400 a 700 nm. A aquisição dos sinais foi feita utilizando fendas de excitação/emissão iguais a (A) 1,5 nm / 5,0 nm e (B) 5,0 nm / 5,0nm, respectivamente. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 365 nm para ambas as configurações. As amostras foram analisadas em quadruplicata. .... 82

**Figura 31.** Inibição de formação de biofilme sobre lamínulas modificadas com filme fino a base de eugenol. (A) capacidade de inibição de biofilme pelo recobrimento utilizando diferentes concentrações de APTES; (B) indicativo de desenvolvimento de biofilme sobre lamínulas contendo apenas eugenol, sem modificação prévia com APTES, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorvância sob o comprimento de onda de 600 nm. Replicatas N = 4. Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle negativo \* (p < 0,05). Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle positivo \*\* (p < 0,05) Teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. .... 84

**Figura 32.** Resultados do teste de inibição de biofilme sobre lamínulas modificadas, utilizando metanol como solvente para reação de silanização de superfície com APTES 0,1 e 1%, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorvância sob o comprimento de onda de 600 nm. Replicatas N = 4. Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle positivo \* (p < 0,05). Teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. .... 85

**Figura 33.** Perfil das distribuições de diâmetros de partículas (A) obtidas sob diferentes concentrações de catalisador, e a relação linear existente entre estes parâmetros (B). Replicatas N = 3. .... 86

**Figura 34.** Verificação da variação de tamanho, polidispersão e massa das partículas de sílicas sintetizadas através do método de Stöber sob diferentes tempos reacionais. Replicatas N = 3. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L<sup>-1</sup>; Concentração de água: 6,0 mol L<sup>-1</sup>; Concentração de NH<sub>3</sub> (a partir de NH<sub>4</sub>OH): 0,21 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto). .... 87

**Figura 35.** (A) Monitoramento de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão e (B) curvas de distribuição de diâmetros das nanopartículas, mantidas na forma de

suspensão em água ultrapurificada, ao longo de 368 anos. Replicatas N = 3. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 1 hora. .... 89

**Figura 36.** Comparação dos diâmetros, índices de polidispersão (A) e dos perfis de distribuição de tamanho (B) das nanopartículas produzidas na condição NP10 sob tempos de síntese de 1 hora e 24 horas. Replicatas N = 3. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto..... 90

**Figura 37.** Avaliação de diâmetro, polidispersão (A) e massa (B) das partículas produzidas na condição NP10, ao longo de 24 horas. Replicatas N = 3. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto..... 91

**Figura 38.** Aplicação de diferentes métodos de secagem e seus efeitos sobre diâmetro, PDI (A) e perfil da distribuição de diâmetros (B) das nanopartículas sintetizadas na condição NP10 24 horas. Replicatas N = 3. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 24 horas..... 92

**Figura 39.** A) Ilustração dos efeitos da adição de sal, em diferentes momentos da reação, sobre a dupla camada elétrica dos núcleos e o diâmetro final das partículas. B) Verificação experimental dos efeitos da adição de KCl à síntese de partículas de sílica por método de Stöber, de acordo com o momento da adição. A amostra NP10 define a condição controle de síntese sem adição de KCl. As amostras 0h e 10h representam as partículas produzidas em condições experimentais, cuja adição de KCl se deu ao início da síntese (juntamente com os demais reagentes) e após 10 horas de incubação, respectivamente. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 24 horas. .... 94

**Figura 40.** A) Efeitos da concentração de trietanolamina, utilizada como catalisador na síntese de partículas de sílica, sobre o diâmetro e a polidispersão das mesmas. B) Distribuições de tamanhos de partículas conforme a concentração de catalisador. Síntese das partículas e respectivas medidas feitas em triplicata. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 24 horas. .... 96

<b>Figura 41.</b> Microtubos contendo partículas de sílica sintetizadas por método de Stöber sem adição de 3-(trietoxisilil)propil isocianato como agente modificador de estrutura (Br) e com adição do mesmo nas proporções organosilano:TEOS de 1:10 e 1:1, suspensas em solução de ninidrina 5g L <sup>-1</sup> . .....	97
<b>Figura 42.</b> Esquema de (1) síntese de CTESPC ((carvacrol-3-(trietoxisilil)propil)carbamato)) e (2) produção de nanopartícula de sílica híbrida. Figura reproduzida e legenda adaptada com permissão, de Sokolik e Lellouche <sup>147</sup> . (Licenciado sob CC BY 3.0 - <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/</a> ) .....	98
<b>Figura 43.</b> Mecanismos envolvendo atividade catalítica de cobre (II), segundo (A) Kurono e colaboradores <sup>153</sup> , e (B) Oda e colaboradores <sup>152</sup> . Figuras adaptadas com permissão, de Kurono e colaboradores <sup>153</sup> (Copyright © 2011, American Chemical Society), e (B) Oda e colaboradores <sup>152</sup> (Copyright © 2022, American Chemical Society). Figuras adaptadas sob autorização. ....	100
<b>Figura 44.</b> À esquerda, espectros de infravermelho em modo absorbância, obtidos pela técnica de FTIR-ATR, do produto proposto e dos reagentes utilizados. À direita, estão destacadas as regiões que contêm os sinais atribuídos a funções químicas características de cada um dos compostos. ....	102
<b>Figura 45.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (esquerda) e RMN de <sup>13</sup> C (direita) para o produto de síntese (A e B), eugenol (C e D) e 3-(trietoxisilil)propil isocianato (E e F). RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, tetrametilsilano (TMS) como referência). RMN de <sup>13</sup> C (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, tetrametilsilano (TMS) como referência). ....	103
<b>Figura 46.</b> Espectros de RMN de <sup>1</sup> H (esquerda) e RMN de <sup>13</sup> C (direita) para o produto purificado. RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> , 25 °C, tetrametilsilano (TMS) como referência). ....	105
<b>Figura 47.</b> A) Perfil massa/carga da molécula após ionização por eletrospray no modo positivo; B) Perfil isotópico relacionado ao sinal m/z 412,2150; C) Perfil isotópico relacionado ao sinal m/z 434,1970; D) Perfil isotópico relacionado ao sinal m/z 845,4046. ....	106
<b>Figura 48.</b> Resultados de experimento de inibição de biofilme utilizando lamínulas submetidas a procedimento de modificação com eugenol-silano, sob diferentes concentrações. Replicatas N = 4. ....	107
<b>Figura 49.</b> A) Efeitos da concentração de eugenol-silano, utilizado como modificador química na síntese de partículas de sílica, sobre o diâmetro e a polidispersão das	

mesmas. B) Distribuições de tamanhos de partículas conforme a concentração do modificador. Síntese das partículas e respectivas medidas feitas em triplicata..... 108

**Figura 50.** (A) Termograma do eugenol-silano e (B) sua respectiva derivação do percentual de perda de massa com relação ao tempo. (C) Termogramas das partículas de sílica sintetizadas na presença de eugenol-silano, e (D) respectivas derivações dos percentuais de perdas de massa com relação ao tempo. Em (D) destaque para região atribuída à degradação de eugenol-silano presente nas partículas. (E) Destaque às variações das inclinações dos termogramas das partículas de sílica na região de 100 a 600 °C. (F) Destaque à região de 600 a 800 °C dos termogramas das partículas e sua variação de perda de massa conforme tamanho das partículas. Rampa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> até 800 °C. Gás nitrogênio sob fluxos de 40 mL min<sup>-1</sup> (balança) e 60 mL min<sup>-1</sup> (amostra). Porta amostra de platina. .... 110

**Figura 51.** Percentual de desenvolvimento de colônias de *A. niger* após exposição a suspensões de partículas de sílica modificadas com diferentes concentrações eugenol-silano..... 112

**Figura 52.** Verificação de modificações no diâmetro e na polidispersão de partículas de sílica funcionalizadas com eugenol-silano, após tratamento térmico utilizado para esterilização das mesmas. A) Distribuição de diâmetros das partículas funcionalizadas com diferentes concentrações de eugenol-silano; B) Variação de diâmetro e PDI de acordo com a formulação da partícula..... 113

**Figura 53.** Resultados das análises de componentes principais (à esquerda) e os *loadings* para cada componente (à direita). As imagens foram avaliadas de acordo com a contribuição dos canais: %r (percentual de vermelho); %g (percentual de verde); %b (percentual de azul); H (hue, matiz); S (saturação); L (luminância). .... 114

## Lista de esquemas

<b>Esquema 1.</b> Representação de mecanismo comumente atribuído ao processo de hidrólise de alcóxido de silício na presença de base como catalisador. ....	37
<b>Esquema 2.</b> Representação de mecanismo atribuído à etapa de condensação no processo sol-gel catalisado por base. ....	38
<b>Esquema 3.</b> Proposta de reagentes e produto envolvidos na reação entre eugenol e 3-(triethoxisilil)propil isocianato. ....	65
<b>Esquema 4.</b> Ilustração de proposta de ação parcial do cobre (II) na formação da ligação uretana entre as moléculas de eugenol e do organosilano contendo grupo isocianato. ....	101

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Relação de reagentes utilizados para o desenvolvimento dos experimentos apresentados na presente tese. ....	39
<b>Tabela 2.</b> Condições experimentais para avaliação da influência da concentração do catalisador sobre a síntese de partículas de sílica. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L <sup>-1</sup> ; Concentração de água: 6,0 mol L <sup>-1</sup> ; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 24 horas). ....	57
<b>Tabela 3.</b> Condições experimentais para avaliação da influência do tempo de síntese sobre as partículas. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L <sup>-1</sup> ; Concentração de água: 6,0 mol L <sup>-1</sup> ; Concentração de NH <sub>3</sub> (a partir de NH <sub>4</sub> OH): 0,21 mol L <sup>-1</sup> ; Solvente: etanol absoluto). ....	57
<b>Tabela 4.</b> Condições experimentais para avaliação da influência do catalisador sobre a síntese de partículas de sílica. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L <sup>-1</sup> ; Concentração de água: 6,0 mol L <sup>-1</sup> ; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 1 hora). ....	58
<b>Tabela 5.</b> Concentrações de trietanolamina (TEA), utilizada como catalisador e agente porogênico, na síntese de partículas de sílica por método de Stöber. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L <sup>-1</sup> ; Concentração de água: 6,0 mol L <sup>-1</sup> ; Solvente: etanol absoluto). ....	62
<b>Tabela 6.</b> Relação dos compostos utilizados durante experimentos de sensibilidade à antifúngicos e seus respectivos resultados.....	72
<b>Tabela 7.</b> Similaridades de cores determinadas através da distância Euclidiana no espaço de cores Lab. Para cada amostra observada na tabela, 5 replicatas foram investigadas para cada cor exibida. Índice de similaridade ( $\Delta E$ ) e desvio-padrão (SD) das quintuplicatas. ....	115
<b>Tabela 8.</b> Resultados coletados a partir de formulário de percepção de cores. Os dados estão organizados conforme respostas do grupo limitado (N = 33; 18-40 anos, sem especificidades de visão, respondendo por <i>smartphone</i> ).....	116
<b>Tabela 9.</b> Resultados coletados a partir de formulário de percepção de cores. Os dados estão organizados conforme respostas do grupo geral (N = 159; 18-70 anos, com e sem especificidades de visão, respondendo por diversos dispositivos).....	117

<b>1. Introdução.....</b>	<b>21</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>24</b>
2.1. Objetivos específicos.....	24
<b>3. Revisão bibliográfica.....</b>	<b>25</b>
3.1. Fungos e lentes .....	25
<b>3.2. Inibição de fungos em componentes ópticos .....</b>	<b>30</b>
3.2.1. <i>Superfícies antimicrobianas.....</i>	31
3.2.2. <i>Superfícies quimicamente ativas .....</i>	33
3.2.3. <i>Recobrimentos híbridos por nanopartículas de sílica .....</i>	34
<b>3.3. Síntese de nanopartículas de sílica por Método de Stöber .....</b>	<b>36</b>
<b>4. Materiais e métodos .....</b>	<b>39</b>
4.1. Materiais.....	39
<b>4.3. Procedimentos de caracterização .....</b>	<b>42</b>
4.3.1. <i>Determinação de diâmetro e polidispersão de partículas de sílica por espalhamento de luz dinâmico.....</i>	42
4.3.2. <i>Eficiência de encapsulamento por espectroscopia UV-Vis .....</i>	42
4.3.3. <i>Caracterização fotofísica dos recobrimentos .....</i>	42
4.3.4. <i>Caracterização de superfícies por ângulo de contato e perfilometria óptica 3D</i>	43
4.3.5. <i>Caracterização de perfis químicos por espectroscopia de absorção na região de infravermelho com Transformada de Fourier.....</i>	44
4.3.6. <i>Verificação de funcionalização de partículas por análises termogravimétricas..</i>	45
<b>4.4. Testes de sensibilidade a antifúngicos .....</b>	<b>45</b>
<b>4.5. Testes de inibição de biofilme .....</b>	<b>47</b>
4.5.1. <i>Efeitos de eugenol e citral em hifas .....</i>	48
<b>4.6. Preparo das lamínulas de vidro .....</b>	<b>50</b>
<b>4.7. Síntese de recobrimento óptico em solução.....</b>	<b>51</b>

<b>4.8. Estratégias para verificação da modificação do substrato de vidro .....</b>	<b>53</b>
4.8.1. <i>Modificação química e molhabilidade de superfície .....</i>	53
4.8.2. <i>Reação com marcador fluorescente.....</i>	53
<b>4.9. Síntese de partículas de sílica pelo método de Stöber .....</b>	<b>54</b>
4.9.1. <i>Otimização da concentração de catalisador e tempo de síntese no preparo das nanopartículas.....</i>	56
4.9.2. <i>Métodos de secagem de nanopartículas de sílica.....</i>	58
<b>4.10. Incorporação de compostos antifúngicos às partículas de sílica.....</b>	<b>61</b>
4.10.1. <i>Incorporação de eugenol por exposição durante síntese.....</i>	61
4.10.2. <i>Incorporação de eugenol por adsorção pós-síntese.....</i>	62
4.10.3. <i>Incorporação via ligação uretana.....</i>	63
4.11.1. <i>Síntese de partículas de sílica modificadas com eugenol-silano.....</i>	65
4.11.2. <i>Teste de atividade antifúngica por inibição de colônias.....</i>	65
<b>4.12. Teste de similaridades de cores em ambiente controlado .....</b>	<b>67</b>
<b>5. Resultados e discussão .....</b>	<b>72</b>
<b>5.1. Testes de sensibilidade a antifúngicos .....</b>	<b>72</b>
<b>5.2. Inibição de biofilme .....</b>	<b>73</b>
5.2.1. <i>Inibição de biofilme com antifúngicos em solução.....</i>	74
<b>5.3. Efeitos de eugenol e citral em hifas de <i>Aspergillus niger</i>.....</b>	<b>75</b>
<b>5.4. Inibição de adesão através de filme fino.....</b>	<b>78</b>
5.4.1. <i>Síntese de recobrimento em solução e atividade antibiofilme.....</i>	78
<b>5.5. Inibição de biofilme através de recobrimentos multifuncionais .....</b>	<b>86</b>
5.5.1. <i>Síntese de nanopartículas de sílica através de método de Stöber.....</i>	86
5.5.2. <i>Incorporação de eugenol às partículas de sílica.....</i>	93
<b>5.6. Elaboração do método de síntese de organosilano derivado de eugenol.....</b>	<b>97</b>
5.6.2. <i>Inibição à adesão fúngica por recobrimento baseado em eugenol-silano.....</i>	107
5.6.3. <i>Síntese de partículas de sílica modificadas com eugenol-silano.....</i>	108

<i>5.6.4. Teste de atividade antifúngica de partículas modificadas com eugenol-silano .</i>	<i>111</i>
<b>5.7. Similaridade e percepção de cores .....</b>	<b>113</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>118</b>
<b>7. Referências bibliográficas .....</b>	<b>119</b>
<b>APÊNDICE A - Aspectos experimentais do método de Stöber .....</b>	<b>125</b>
<b>APÊNDICE B – Protocolo de síntese e purificação de eugenol-silano .....</b>	<b>127</b>
<b>APÊNDICE C – Formulário sobre percepção de cores .....</b>	<b>130</b>

## 1. Introdução

Componentes ópticos tornaram-se abundantes e de grande importância em atividades rotineiras, sendo essenciais em ferramentas científicas, comerciais e sociais. Podem ser encontrados nas mais variadas formas, de acordo com a sua finalidade. Um exemplo para ilustrar essa presença é o uso de smartphones. Segundo o Fundo Monetário Internacional, em 2019 foram vendidos cerca de 1,37 bilhões de novos smartphones <sup>1</sup>, comercializados em diversas marcas e modelos, porém com uma característica comum a muitos deles: a presença de (ao menos uma) câmera embutida, composta por diversas lentes, espelhos, entre outros componentes ópticos. Cenários como este influenciaram o desenvolvimento, difusão e aplicações de sistemas ópticos. Assim, em uma sociedade capaz de filmar, fotografar transmitir em altas resoluções, na qual técnicas de imageamento ultrapassam antigos limites e estabelecem novas possibilidades, onde equipamentos são mais compactos e com maior resolução, pode-se entender o impacto do desenvolvimento, aprimoramento e manutenção de componentes ópticos.

A manutenção da qualidade de componentes ópticos tem sido um ponto de grande interesse e, dentre os diversos fatores que dificultam este processo, está a contaminação por fungos. Os primeiros estudos envolvendo fungos em componentes ópticos, sobre os quais se tem conhecimento, foram estabelecidos à luz da Guerra do Pacífico (1939 – 1945), segundo Turner e colaboradores <sup>2</sup>. Neste estudo, os autores relataram os intensos problemas causados pelo crescimento de fungos em inúmeros instrumentos das tropas aliadas, ao chegarem à Nova Guiné. Segundo Turner e col. <sup>2</sup> os problemas foram agravados devido ao clima tropical – caracterizado por temperatura moderada e alta umidade –, aliado à falta de estudos prévios sobre a infecção e deterioração de instrumentos ópticos por fungos. Além disso, tal falta de conhecimento também levou à destruição de equipamentos novos, devido ao armazenamento destes em capas de couro e em caixas de madeira, mantendo condições de umidade, temperatura, fluxo de ar, iluminação e nutrientes adequados para o desenvolvimento dos fungos. Em poucas semanas os instrumentos de guerra estavam inutilizados, devido ao rápido crescimento dos fungos sobre as superfícies ópticas, obscurecendo e corroendo lentes e prismas. Segundo os autores, os fungos isolados destes equipamentos com maior frequência foram *Penicillium spinuloeum*, *P. commune*, *P. citrinum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Mucor racemosus*, e *M. ramannianus*. A fim de evitar os

danos causados pelos microrganismos, principalmente em um cenário tão crítico quanto aquele, os pesquisadores propuseram alternativas baseadas na dessecação e esterilização de novos equipamentos enviados, garantindo principalmente um ambiente limpo e isolado do meio externo, uma vez que as células fúngicas poderiam ser carreadas livremente pelo ar ou em partículas de poeira <sup>2-6</sup>. Entretanto, o comitê das forças aliadas compreendeu as inúmeras limitações destas alternativas, pois com o manuseio dos equipamentos em campo, haveria contaminação com material orgânico (como gordura, terra, etc.) e com ela o possível crescimento de fungos. Então, pesquisadores propuseram o uso de um fungicida volátil dentro dos equipamentos, evitando assim a sobrevivência e o crescimento dos fungos. Porém, o composto deveria apresentar alguns requisitos: (i) ser ativo contra os possíveis contaminantes; (ii) possuir alta volatilidade; (iii) possuir estabilidade à umidade e temperatura (ao menos 60 °C); (iv) apresentar atividade prolongada (anos); (v) não possuir potencial corrosivo; (vi) ser atóxico para humanos; (vii) possuir potencial repelente a ácaros (potencial carreador de fungos na região); (viii) estar disponível em tempos de guerra. Os cientistas avaliaram inúmeros compostos com atividade antifúngica já conhecida, porém todos foram ineficientes frente às condições impostas.

Com a descoberta do potencial supressor de germinação, tiosalicilato de etilmercúrio sódico (MTS; conhecido atualmente como Timerosal), Turner e col. <sup>2</sup> propuseram a incorporação do fungicida à tinta de revestimento dos equipamentos. Mesmo com a baixa volatilidade na forma de pó ou quando disperso em tinta, o MTS pareceu muito promissor, uma vez que sua volatilidade aumentava expressivamente ao ter contato com vapor d'água, condição constante nos territórios de Nova Guiné. Durante os experimentos, os pesquisadores demonstraram o potencial antifúngico do MTS a curto e longo prazo, simulando as condições encontradas pelas tropas na ilha. De acordo com Trikojus <sup>7</sup> o elevado potencial do MTS poderia estar relacionado à formação de hidroxietilmercúrio. Durante a elaboração desta tese, não foram obtidas informações sobre a continuação do uso de MTS para este fim, o que pode estar relacionado aos graves danos causados pela espécie etilmercúrio e hidroxietilmercúrio a diferentes organismos <sup>8,9</sup>.

Em 1952, Teitell e Berk <sup>10</sup> divulgaram um estudo de campo, no qual inúmeros binóculos e telescópios foram expostos ao clima do Canal do Panamá, a fim de investigar o crescimento de fungos nos componentes ópticos destes instrumentos frente

a diferentes métodos de prevenção: agente desumidificante – sílica gel –, inibidor fúngico – acetato de meta-cresila, tiocianoacetato de fenchila e MTS –, material radioativo – folhas de Radio –, e radiação ultravioleta. Dentre os inibidores fúngicos apenas m-cresil acetato apresentou capacidade de inibir o crescimento fúngico nas condições investigadas, porém o alto potencial corrosivo do composto quando hidrolisado, tornou-o inviável de ser utilizado. O uso de MTS não promoveu a inibição de fungos nos equipamentos, divergindo dos resultados dispostos no estudo de Turner e col. <sup>2</sup>. O uso de sílica gel e radiação ultravioleta demonstrou ser ineficaz, devido ao curto período de ação. Em 1956, os autores publicaram os resultados sobre o uso de radiação ionizante para prevenção de crescimento fúngico <sup>11</sup>, mas o método também se mostrou ineficaz.

O impacto negativo do crescimento de fungos em equipamentos ópticos continua sendo investigado (como câmeras, microscópios, estereoscópios cirúrgicos e outros) <sup>12-16</sup> e, sobretudo, estratégias de prevenção têm sido propostas. Estas estratégias exigem condições de armazenamento ideal, feito por acondicionamento em sala constantemente refrigerada e ventilada, com baixa umidade (inferior a 65 %), e o uso de capa protetora para evitar o contato entre equipamento e poeira – potencial carreador de fungos <sup>3-6,17</sup> –, adicionando agentes dessecantes (como sílica gel) sempre que possível. Além disso, exposição periódica dos equipamentos à luz solar ou radiação ultravioleta, constante limpeza e secagem das superfícies ópticas, e verificação periódica por profissional capacitado <sup>12-16</sup>, fazem parte de protocolos recomendados. No entanto, tais condições dificilmente são alcançadas, sendo muitas vezes impraticáveis a equipamentos utilizados em atividades de campo, por exemplo.

Para os cenários nos quais condições ideais de armazenamento e manutenção são difíceis, estudos estabelecem formas de remediar o problema, ou seja, remover os fungos desenvolvidos sobre os materiais ópticos <sup>12-16</sup>. Estes métodos podem utilizar produtos químicos agressivos (fungicidas, oxidantes, entre outros), remoção mecânica por raspagem ou ultrassom, solventes orgânicos (álcoois ou acetona, esta última pode apresentar incompatibilidade com recobrimento antirreflexo), entre outras possibilidades. Todavia, todas estas abordagens necessitam que equipamento seja desmontado, gerando possíveis danos causados por este tipo de manuseio, somado aos danos inerentes aos tratamentos químicos ou físicos para a limpeza. É necessário

destacar que nenhuma destas alternativas ameniza os danos causados pelos fungos, devido ao ataque e corrosão dos componentes ópticos <sup>13</sup>.

Frente aos riscos apresentados pelas alternativas baseadas em inibição por fungicidas, a inviabilidade de armazenamento e manutenção em condições ideais e os efeitos negativos de estratégias remediativas, é possível identificar uma lacuna que precisa ser melhor investigada e preenchida, e para isto, esta tese será desenvolvida a fim de estabelecer propostas para inibir o crescimento de fungos em componentes ópticos utilizando tecnologia de filmes finos.

## **2. Objetivos**

Investigar a viabilidade de recobrimentos ópticos transparentes com atividade contra adesão fúngica, através de técnica sol-gel para funcionalização de superfícies e modificação com compostos naturais com propriedades antifúngicas.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Compreender as potencialidades e as limitações da técnica sol-gel na formação de filmes finos de organosilanos sobre superfícies ópticas;
- Investigar o potencial antiadesivo contra fungos, de filmes finos produzidos pelo ancoramento de compostos naturais sobre superfícies ópticas funcionalizadas com organosilanos;
- Avaliar a aplicabilidade dos recobrimentos em componentes ópticos, a partir de testes de similaridade e percepção de cores, utilizando câmera embutida de *smartphone*;
- Explorar a produção de nanopartículas e o encapsulamento de compostos antifúngicos naturais, assim como sua aplicabilidade na inibição de desenvolvimento fúngico;

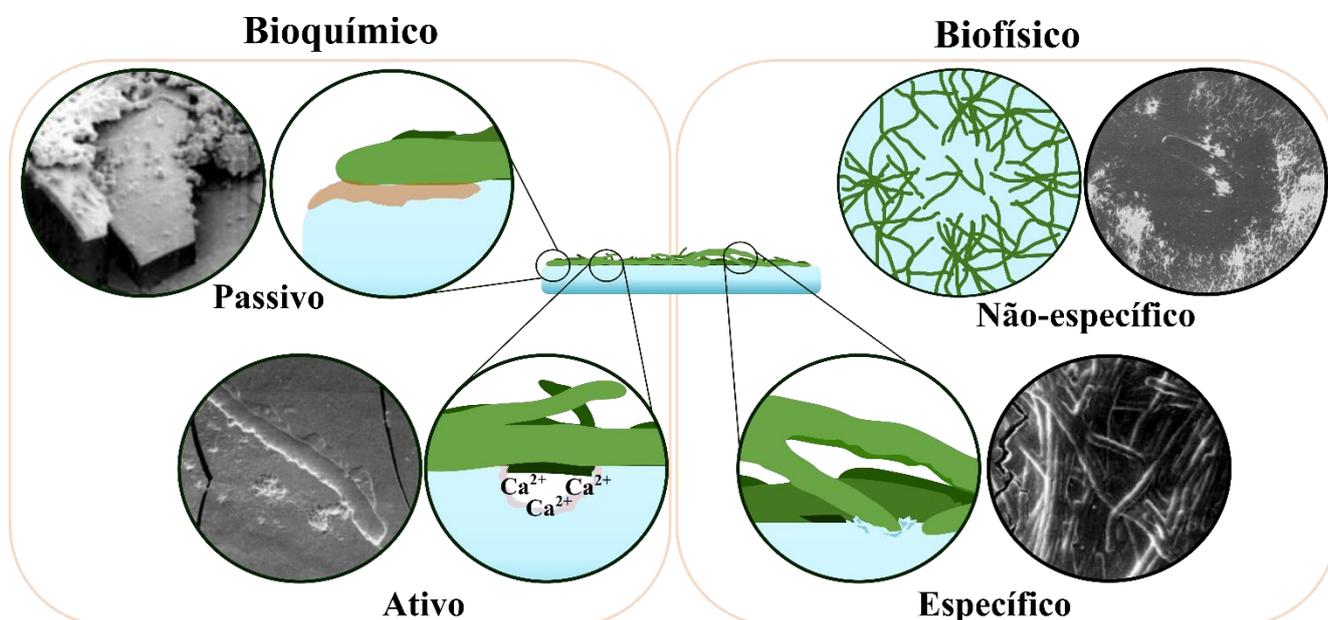
### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1. Fungos e lentes

Fungos são organismos onipresentes na natureza, onde desempenham papéis fundamentais em diversos processos como fixação e redistribuição de nutrientes, e modulação biogeoquímica de ecossistemas, entre outros <sup>18-20</sup>. O destaque de fungos como agentes biogeomoduladores pode ser atribuído à capacidade de produzirem uma ampla variedade de enzimas e metabólitos que possibilitam a degradação de diferentes matrizes, além da transformação de minerais com composições distintas <sup>18,19,21</sup>. Fungos podem estar associados a inúmeros processos de modificação geoquímica, uma vez que, devido à produção de metabólitos com capacidade mineral-transformadora, podem promover eventos decomposição, bioacumulação e biotransformação, que por sua vez, podem ser associados a mudanças ambientais locais e globais. Estas características fazem destes micro-organismos os principais agentes de biodeterioração (deterioração por ação biológica) de materiais à base de minerais <sup>18</sup>. Frente a isto e, aliado ao fato de que silicatos compõem a maior classe de minerais no planeta <sup>22,23</sup>, o potencial de fungos como agente de biodeterioração de materiais à base de sílica e/ou silicatos, como por exemplo o vidro, tem atraído a atenção de diferentes grupos de pesquisa <sup>24-29</sup>

A biodeterioração ou bioalteração do vidro, pode, para fins de racionalização, ser separada em biofísica e bioquímica, <sup>25,27</sup>, conforme ilustrado pela Figura 1. Alterações biofísicas podem ser compreendidas como efeitos decorrentes da presença do fungo sobre o material (ação não-específica), ou da presença de determinada estrutura celular, que por sua vez desempenha alguma função específica (ação específica). Conforme esquematizado por Weaver et al. <sup>25</sup>, este tipo de bioalteração pode ser organizado como geral, devido ao desenvolvimento regular da massa fúngica, e induzida, onde estruturas específicas produzem modificações no material. A classificação bioquímica pode ser caracterizada por modificações causadas por interações ativas ou passivas. No caso de interações ativas, o fungo produz algum metabólito para acessar determinado componente/nutriente da matriz. Por outro lado, em interações passivas, os danos causados ao substrato são decorrentes de compostos liberados como parte do ciclo de vida do organismo. Dentre os processos de

bioalteração em vidro, estão o *biopitting* (corrosão por pite<sup>1</sup> induzida por microorganismos), a biomineração (produção de gravuras sobre o vidro por solubilização da matriz), microfissurações, alterações de coloração, opacidade, entre outros.

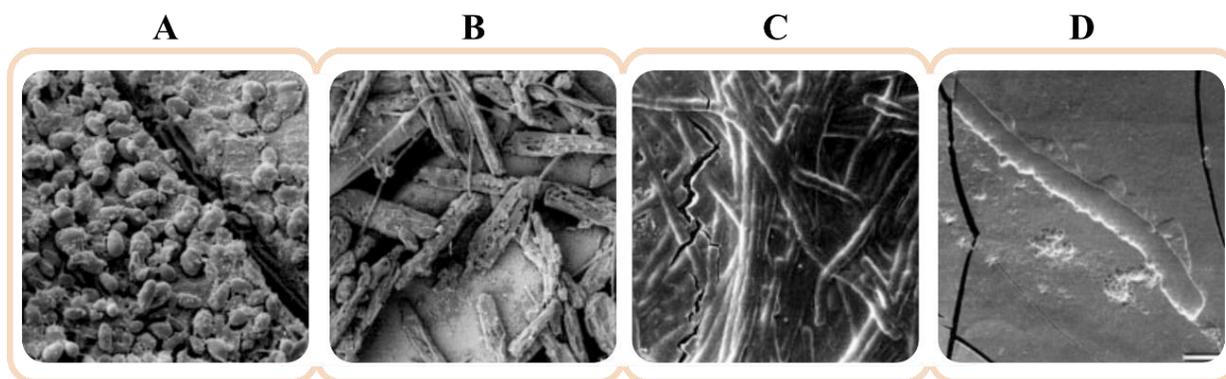


**Figura 1. Ilustração de processos de bioalteração de vidro envolvendo mecanismos biofísicos ou bioquímicos. À esquerda, estão exemplificados os mecanismos de ação envolvendo processos bioquímicos passivo — onde a bioalteração do vidro ocorre pelo contato com metabólitos liberados durante o ciclo de desenvolvimento do fungo — e ativo — onde há a liberação de compostos com alguma finalidade, como por exemplo, a extração de nutriente do vidro. À direita, estão exemplificados os mecanismos de ação envolvendo processos biofísicos não-específico — onde os efeitos são causados pelo desenvolvimento geral do fungo, como em casos de obstrução visual, pelo crescimento da biomassa — e específicos — onde a alteração está associada à alguma estrutura que desempenha efeitos específicos, como o caso de penetração por hifas.**

Segundo Vicklund <sup>31</sup>, estes tipos de efeitos decorrentes do crescimento de fungos em lentes e outros componentes ópticos foram compreendidos como um dos principais fatores associados à inviabilização de equipamentos ópticos utilizados durante a Guerra do Pacífico. Esta observação foi ratificada por outras investigações

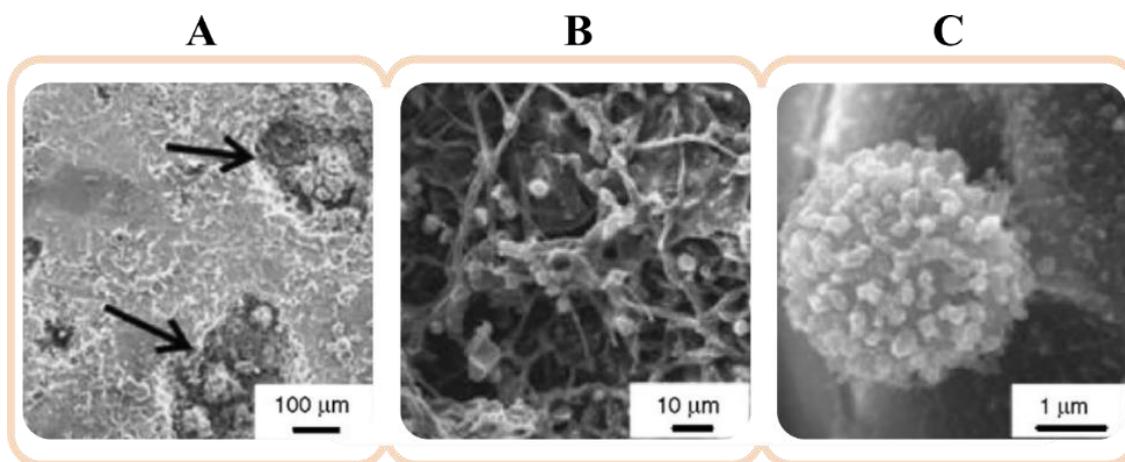
<sup>1</sup> Corrosão por pite é um tipo de corrosão de caráter local, na qual uma pequena região, em geral circular, é afetada, enquanto grande parte da superfície se mantém intacta. Comumente é observada na forma de pequenos pontos, nos quais a profundidade do dano é muito maior do que o diâmetro observado na superfície <sup>30</sup>

<sup>2,10,32</sup>, onde foi relatada a recorrência de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, em instrumentos ópticos. Estes micro-organismos estariam associados a diferentes danos aos equipamentos, como a diminuição de luz transmitida, perda de definição, e até obstrução completa da imagem <sup>2,31</sup>. Segundo Turner et al. <sup>2</sup>, após alguns meses em contato, à superfície do vidro poderia apresentar gravuras com formato similar às estruturas fúngicas, gerando danos permanentes ao componente óptico. Contextualizado aos estudos que investigam os efeitos da interação fungo-vidro <sup>24,26-28</sup>, as observações feitas por Turner et al. <sup>2</sup> à época, podem ser atribuídas a processos de biocorrosão da superfície devido a secreção de ácidos orgânicos e/ou agentes quelantes pelo fungo. Gorbushina e Palinska <sup>28</sup> investigaram a capacidade de desenvolvimento de fungos sobre superfície de vidro na ausência de nutrientes essenciais como fontes de nitrogênio e fósforo. Para isso, as autoras avaliaram a interação de fungos recorrentemente isolados de vitrais de um antigo mosteiro de Haina (Hesse, Alemanha). De acordo com as pesquisadoras, diferentes estruturas fúngicas foram identificadas de acordo com a região e o tipo de dano sobre a superfície de vidro <sup>28</sup>. Segundo o estudo, os fungos apresentaram estruturas bem desenvolvidas (hifas, micélio e biofilme) mesmo na ausência de nutrientes essenciais (Figura 2A), indicando a possibilidade de extração/lixiviação destes a partir do vidro, pela liberação de metabólitos, o que também pode estar associado à formação de cristais ao longo da estrutura (superfície e interior), levando a regiões de maior tensão e, em alguns casos, fissuras, conforme Figura 2B e 2C. Outro aspecto importante verificado pelas autoras é a possibilidade de o fungo produzir padrões de corrosão (biocorrosão) sobre a superfície do vidro, devido à solubilização da estrutura induzida por ácidos orgânicos e/ou agentes quelantes secretados (Figura 2D).



**Figura 2. Micrografias obtidas por Gorbushina e Palinska <sup>28</sup> em experimentos induzindo o crescimento fúngico sobre substratos de vidro. Imagem adaptada de Gorbushina e Palinska <sup>28</sup>, sob autorização. Copyright © 1999, Kluwer Academic Publishers**

Carmona et al. <sup>26</sup> observaram processos de biodeterioração similares, em painéis de vitrais da Cartuja de Miraflores (Espanha). De acordo com o grupo, as superfícies dos vitrais apresentaram diversas regiões de corrosão por pite, nas quais, em geral, estruturas fúngicas puderam ser identificadas, conforme Figura 3. Além disso, efeitos como alteração de cor e microfissuras foram observados.



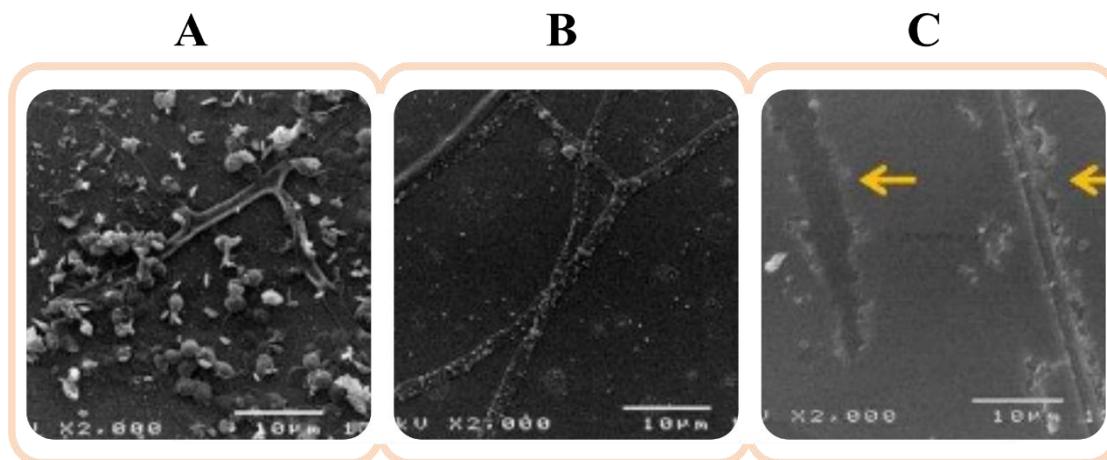
**Figura 3. (A) Danos observados sobre a superfície de painéis de vitrais através de microscopia eletrônica de varredura, atribuídos a processos de biocorrosão. (B e C) Estruturas fúngicas desenvolvidas junto às regiões de corrosão sobre o vidro. Imagem adaptada de Carmona et al. <sup>26</sup> sob autorização. Copyright © 2006 Elsevier Ltd.**

Vicklund <sup>31</sup> e Turner et al. <sup>2</sup> propuseram que o desenvolvimento dos fungos se daria a partir da germinação de esporos sobre partículas de poeira, resíduos orgânicos,

ceras, etc., depositados sobre o vidro, seguido pelo espalhamento dos corpos filamentosos pela superfície do material. Estas hipóteses estão em acordo com os experimentos de indução de contaminação de superfícies de vidro, realizados por Richards <sup>32</sup>, nos quais a exposição de lentes, devidamente limpas e esterilizadas, a esporos e, até mesmo a pequenos pedaços de micélio, não apresentaram desenvolvimento do fungo. De fato, a possibilidade de que partículas de poeira atuem como carreadores e fonte de nutrientes para o desenvolvimento de fungos tem atraído a atenção de diferentes grupos de pesquisa <sup>3-5,33,34</sup>. Segundo estes estudos, esporos de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* estão recorrentemente associados a partículas de poeira suspensas na atmosfera, em ambientes urbanos e rurais <sup>4,20,21</sup>. Segundo Dannemiller et al. <sup>3</sup>, as quantidades de carbono orgânico e outros nutrientes (nitrato, fosfato e sulfato) disponíveis em partículas de poeira podem ser superiores às necessárias para o crescimento biológico. No entanto, Parkinson et al. <sup>35</sup> identificaram, através de estudo voltado ao desenvolvimento de fungos em sílica gel, que fungos como *Aspergillus niger* podem apresentar crescimento sobre o material mesmo na ausência de fontes (adicionadas) de nitrogênio e carbono, corroborando com os resultados do estudo elaborado por Gorbushina e Palinska <sup>28</sup>, que propuseram a possibilidade de alguns fungos utilizarem compostos secretados para a solubilização de nutrientes essenciais presentes na estrutura do vidro, levando a bioalterações por processos bioquímicos ativos.

Em 2021, Ngo et al. <sup>36</sup> investigaram o desenvolvimento de fungos sob componentes ópticos de binóculos expostos em museus do Vietnã. De acordo com o grupo, fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram predominantes, presentes em 43,8 % e 31,3 % das amostras investigadas. Em experimentos de simulação de biodeterioração do vidro, após 28 dias de incubação de fungos como *Aspergillus niger* e *Penicillium ramusculum*, o material apresentou diminuição de 40 a 50 % da luz transmitida (faixa de observação: 400 a 800 nm). Além disso, mesmo após procedimentos de limpeza para eliminação dos fungos desenvolvidos sobre as superfícies, foram observadas reduções no percentual de luz transmitida, quando comparado aos controles (vidros sem exposição a fungos). Conforme Figura 4, os autores atribuíram estes efeitos ao desenvolvimento de estruturas fúngicas aderidas ao vidro, assim como aos danos permanentes causados por processos de biocorrosão,

evidenciando, desta forma a atualidade do tema e o impacto que o mesmo detém sobre itens utilizados em diferentes áreas.



**Figura 4.** Micrografias realizadas em oculares de binóculos disponíveis em museus do Vietnã, indicando a presença de esporos (A), hifas desenvolvidas (B) e padrões de lixiviação ocasionados pelo desenvolvimento fúngico, observados após a limpeza das lentes (C). Imagem adaptada de Ngo et al. <sup>36</sup>, sob autorização. (Licenciado sob CC BY 4.0 - <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Neste contexto, a existência de agentes — com propagação facilitada pelo ar, capacidade de sobrevivência e desenvolvimento em condições mínimas de nutrientes, além de considerável potencial de biodeterioração — expõe a necessidade de desenvolver estratégias preventivas, a fim de garantir a manutenção de equipamentos ópticos.

### 3.2. Inibição de fungos em componentes ópticos

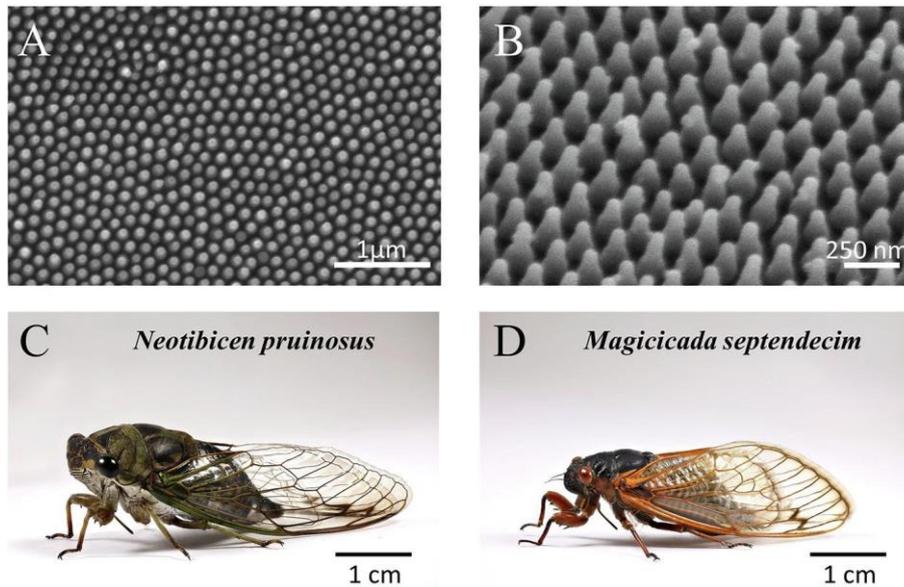
Estratégias baseadas em minimização de exposição dos componentes ópticos ao ambiente, manutenção dos mesmos em condições ideais, e procedimentos para a remediação da contaminação <sup>12-14</sup> têm sido valiosas ferramentas na preservação dos materiais. Porém, estas condições de armazenamento se mostram impraticáveis em diversas situações e, mesmo em condições próximas das ideais, a propagação facilitada de fungos por diferentes “veículos” torna altamente complexo o controle da contaminação. Além disso, as abordagens para remediação da contaminação envolvem procedimentos complexos como a desmontagem do sistema e a exposição dos componentes ópticos a procedimentos químicos e/ou mecânicos de limpeza <sup>2,13,14</sup>.

Frente a isso, abordagens desenvolvidas para minimizar/inibir a interação fungo-substrato, como por exemplo, superfícies antimicrobianas, cujas características físicas e/ou químicas podem proporcionar alguma interferência no processo de adesão celular, apresentam-se com potenciais ferramentas na manutenção de componentes ópticos.

### 3.2.1. Superfícies antimicrobianas

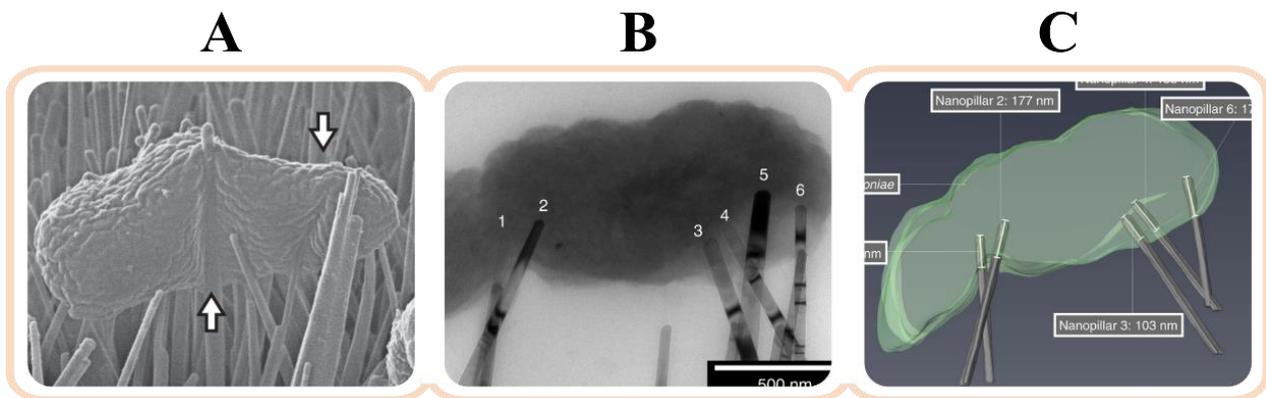
Superfícies antimicrobianas podem ser compreendidas como superfícies capazes de inibir a contaminação por fungos e bactérias, através de inibição no processo de adesão celular ou por danificação direta ou indireta de estruturas celulares <sup>37</sup>. Estas propriedades podem ser decorrentes de estruturas físicas específicas e/ou da composição química da superfície <sup>38</sup>.

Superfícies com estruturas físicas específicas ou nanoestruturadas são aquelas nas quais há a ocorrência de padrões físicos com dimensões nano e micrométricas <sup>37-39</sup>. A ocorrência natural dessas estruturas, que se dá em algumas plantas e insetos, permite investigações quanto às suas funções, mas também possibilita a elaboração de processos sintéticos que mimetizem esses padrões em diversos materiais. Lepore et al. <sup>40</sup> investigaram a ocorrência de superfícies nanoestruturadas em folhas de couve (*Brassica oleracea*) e associaram a elas a alta capacidade de repelir água. Além disso, o grupo mimetizou estruturas semelhantes, à base de nanotubos de carbono, e as comparou com as de ocorrência natural através de medidas de ângulo de contato estático e dinâmico (espalhamento e escorregamento de gota, respectivamente). Segundo os resultados, ambos os materiais apresentam comportamento altamente hidrofóbico (ângulo de contato ~ 140 °). Ensikat et al. <sup>41</sup> investigou as superfícies da folhas Flor de Lotus, a fim de entender a influência da disposição de papilas, de dimensões micro- e nanométricas, sobre a superhidrofobicidade das folhas, uma vez que este tipo de planta se tornou símbolo de superfícies superhidrofóbicas e auto-limpantes <sup>42</sup>. Outra ocorrência natural de superfícies nanoestruturadas, que vem despertando interesse em diferentes grupos de pesquisa, pode ser observada nas asas de cigarras. As asas de algumas cigarras apresentam estruturas organizadas na forma de pilares nanométricos <sup>43</sup> (Figura 5).



**Figura 5.** Micrografias de asas de diferentes espécies de cigarras, comumente estudadas quanto seus potenciais autolimpantes e antimicrobianos. Imagem adaptada de Román-Kustas e col. <sup>44</sup>, sob autorização. (Licenciado sob CC BY-NC-ND 4.0 - <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>)

A mimetização desse tipo de estrutura tem possibilitado o desenvolvimento de superfícies capazes de induzir danos por penetração, em fungos e bactérias <sup>38,43,45,46</sup> (Figura 6).



**Figura 6.** Efeito antimicrobiano de superfície nanoestruturada com nanopilares sobre células da bactéria *Klebsiella pneumoniae*. (A) micrografias por microscopia eletrônica de varredura, (B) micrografias por microscopia eletrônica de transmissão e (C) modelagem dos pontos de penetração da célula pelos nanopilares. Imagem adaptada de Jenkins e col. <sup>45</sup>, sob autorização. (Licenciado sob CC BY 4.0 - <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

No entanto, materiais antimicrobianos também podem ser desenvolvidos através de abordagens químicas, envolvendo processos de funcionalização e/ou recobrimento de superfície.

### 3.2.2. Superfícies quimicamente ativas

Superfícies com propriedades inibitórias e/ou antifúngicas podem ser produzidas a partir de processos de modificação envolvendo a fixação de substâncias ativas, de formas covalente (funcionalização) e/ou não-covalente (recobrimento) <sup>38,39,47</sup>. O tipo de abordagem utilizado pode estar relacionado com a natureza do material, ou seja, com a possibilidade de modificação em sua estrutura e/ou superfície, mas também com outros aspectos associados às aplicações, como compatibilidade e durabilidade.

Uma abordagem bastante utilizada na modificação de superfícies é a funcionalização com organossilanos <sup>48</sup>, devido à capacidade destes compostos se ligarem, de forma covalente, a diferentes materiais. Apenas essa característica já os tornaria ferramentas importantes no desenvolvimento de novos materiais, pois, de acordo com suas estruturas químicas, propriedades específicas relacionadas podem ser atribuídas ao material modificado. Entretanto, há outras características que ampliam ainda mais as potencialidades desses compostos. A disponibilidade de organossilanos com diferentes grupos funcionais permite a elaboração de materiais com propriedades e reatividades químicas ajustáveis de acordo com a utilização, sendo possível que atuem como agentes de ancoramento/contato para inúmeros outros compostos. Aliado a isso, as suas utilizações para modificação de superfícies permitem a construção de filmes cujas espessuras podem variar desde monocamadas até centenas de micrometros, através da manipulação de condições reacionais, como concentração, temperatura, solvente e tempo. Combinadas, essas características expõem a capacidade de desenvolver interfaces com propriedades químicas criteriosamente controladas. A exemplo disso, o organossilano (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES) tem sido amplamente utilizado na modificação em superfícies por formar estruturas bem-organizadas, com espessura ajustável, e pela manutenção da reatividade dos grupos amino <sup>49-53</sup>.

Ainda que as superfícies antimicrobianas possam ser separadas quanto a propriedades físicas e químicas, ao observar, novamente, exemplos com ocorrência

natural, é possível identificar que ambas podem atuar em conjunto. Segundo Ensikat e col. <sup>41</sup>, as papilas presentes nas folhas da Flor de Lotus apresentam recobrimento de cristais de ceras constituídos por compostos orgânicos de longas cadeias alifáticas, o que, aliado à densidade de papilas com dimensões micro e submicrométricas, confere às mesmas suas propriedades superhidrofóbicas. Observação semelhante foi feita por Lepore e col. <sup>40</sup> acerca das propriedades exibidas pelas patas de insetos da família *Gerridae*, nas quais a combinação de nano-, micropadrões e o recobrimento por ceras confere a alta capacidade de repelir água, permitindo, inclusive, que estes insetos se mantenham e se desloquem sobre a água. Esta combinação entre os efeitos de padrões nanoestruturados e de recobrimentos/funcionalizações químicos tem atraído a atenção de diferentes grupos de pesquisa que intencionam desenvolver superfícies híbridas com propriedades específicas. Dentre as abordagens investigadas estão os recobrimentos à base de nanopartículas de sílica.

### 3.2.3. *Recobrimentos híbridos por nanopartículas de sílica*

Nanopartículas de sílica têm sido aplicadas como alternativa de recobrimentos para diferentes finalidades. Isso se dá, pois a possibilidade de modificação e, desta forma, controle de suas propriedades químicas e físicas, confere compatibilidade com diferentes materiais. Aliado a isso, a produção deste tipo de recobrimento pode ser realizada por abordagens distintas, de acordo com as especificidades dos materiais envolvidos, e com a tecnologia disponível, sendo possível a sua produção inclusive a partir de abordagens mais simplificadas, como a dispersão das partículas em estado sólido utilizando o movimento e pressão dos dedos, conforme detalhado por Iler <sup>54</sup>, ampliando as possibilidades deste tipo de estratégia de modificação de superfícies.

Hwang e Ahn <sup>55</sup> utilizaram a deposição de nanopartículas de sílica modificadas com APTES e cloreto de palmitoila para modificação de substratos de vidro, promovendo superhidrofobicidade. Segundo seus resultados, o ângulo de contato apresentou aumento de 49° para 159,5° para substratos brutos e recobertos, respectivamente. Tais resultados foram obtidos após tratamento simples dos substratos por *dip-coating* em suspensão das nanopartículas modificadas. Sriramulu e col. <sup>56</sup> descrevem a produção de recobrimentos à base de nanopartículas de sílica multifuncionais, modificadas com organosilano C18 em combinação com organosilano

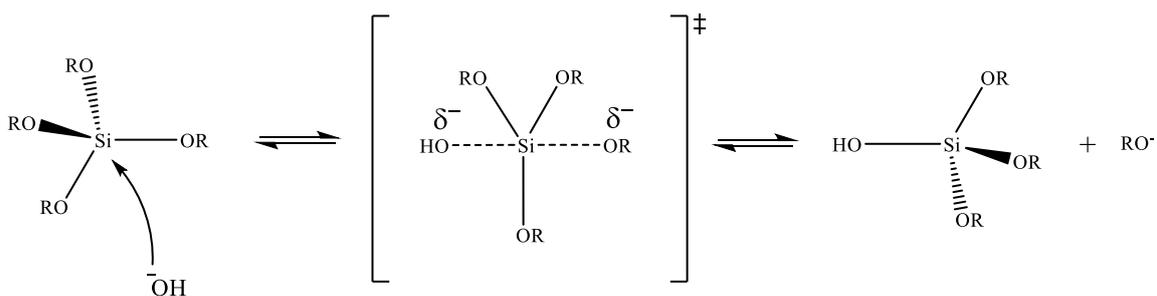
contendo centro perileno diimida. Segundo os autores, lâminas de vidro recobertas por essas partículas apresentaram superhidrofobicidade (ângulo de contato,  $AC = 156^\circ$ ), além de elevada reflectância para radiação na região do infravermelho próximo (800 – 2200 nm), alcançando valores superiores a 60 %. No entanto, esses tipos de recobrimentos também podem ser ajustados para produção de materiais com alta transmitância de luz. Park e col.<sup>57</sup> utilizaram esta abordagem para produzir filmes baseados em nanopartículas de sílica modificadas com polidimetilsiloxano, conferindo ao substrato de vidro superhidrofobicidade ( $AC = 160^\circ$ ), além de manter a transparência do mesmo. Chi e col.<sup>58</sup> identificaram a possibilidade de utilizar esse tipo de abordagem para produzir recobrimentos ópticos com espessura índice de refração altamente controlados. Segundos os autores, a partir da deposição de camadas de nanopartículas de sílica modificadas com polivinilpirrolidona, transmitâncias de até 99,9% puderam ser obtidas, representando um aumento de aproximadamente 10 % com relação ao substrato bruto.

Além de propriedades autolimpantes (superhidrofobicidade) e ópticas, recobrimentos à base de nanopartículas de sílica também atraem a atenção para controle microbiológico em superfícies. Knowles e col.<sup>59</sup> depositaram nanopartículas de sílica modificadas com o surfactante zwitteriônico sulfobetaina sobre substrato de ouro, utilizando a técnica de *spin-coating* e investigaram o seu potencial de inibição de adesão da bactéria *Escherichia coli* e de esporos do fungo *Epicoccum nigrum*. De acordo com seus resultados, mesmo após 24 horas de incubação, foram verificadas reduções de 96% e 87 % na adesão bacteriana e fúngica sobre o substrato modificado, respectivamente. Tamanna e col.<sup>60</sup> investigaram o potencial de recobrimento de nanopartículas de sílica contendo gentamicina, depositadas sobre lâminas de quartzo, através da técnica de deposição *layer-by-layer*, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. O recobrimento apresentou capacidade de inibir o desenvolvimento de ambas bactérias, mantando atividade contra *S. aureus* durante 103 dias, evidenciando o efeito de ação prolongada do recobrimento. Kanugala e col.<sup>61</sup> desenvolveram um recobrimento para cateteres uretral com atividade contra *S. aureus* e o fungo dimórfico *Candida albicans*, utilizando partículas de sílica funcionalizadas com fenazina-1-carboxamida. O recobrimento dos cateteres foi feito por imersão em suspensão das partículas durante 24 horas. Essa abordagem apresentou capacidade de inibir o crescimento de biofilme polimicrobiano em até 90 % sobre as superfícies dos cateteres.

Assim, recobrimentos baseados em filmes de nanopartículas de sílica, cujas propriedades podem permitir aplicações ópticas e de controle microbiológico, podem se tornar potenciais ferramentas na inibição de células fúngicas sobre superfícies de componentes ópticos. Porém, conforme evidenciado nos estudos elencados anteriormente, em geral, na base do desenvolvimento desses recobrimentos está a capacidade de sintetizar-se nanopartículas de sílica com propriedades físicas e química controladas, conforme a aplicação desejada e, para isso, há destaque ao procedimento de síntese amplamente conhecido como Método de Stöber<sup>62</sup>.

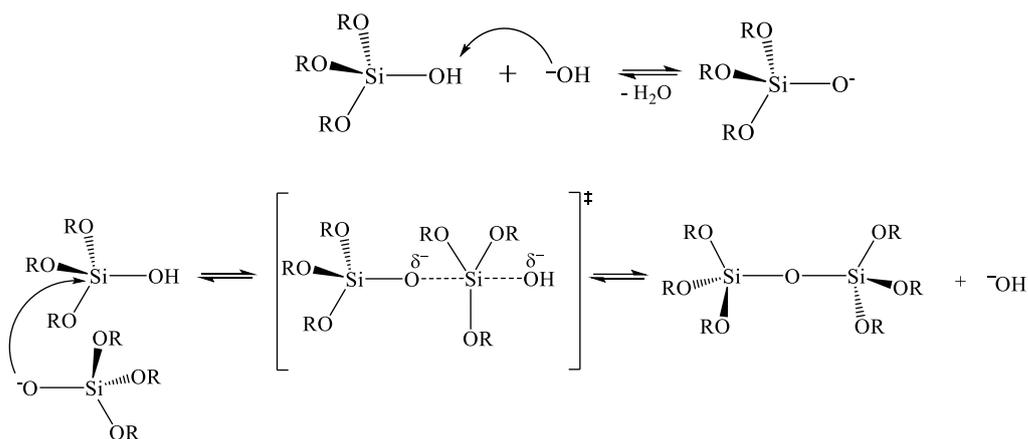
### 3.3. Síntese de nanopartículas de sílica por Método de Stöber

O Método de Stöber é amplamente utilizado para síntese de partículas de sílica com diâmetros que variam de dezenas de nanômetros até centenas de micrômetros, se destacando pelas condições brandas de reação, assim como pela facilidade de controle e ajuste das propriedades das partículas a partir de modificações nas condições reacionais<sup>62</sup>. Porém, para a compreensão inicial deste método é necessário lembrar de alguns pontos do processo sol-gel catalisado por base. Neste tipo de rota sol-gel, o precursor de silício (comumente tetraetil ortosilicato, TEOS) sofre processos de hidrólise mediados por um catalisador básico (e também devido à água desta solução, que atua como co-catalisador), conforme Esquema 1.



**Esquema 1.** Representação de mecanismo comumente atribuído ao processo de hidrólise de alcóxido de silício na presença de base como catalisador.

Durante o processo de hidrólise, os grupos OR são substituídos por grupos OH, gerando as espécies ativas chamada de monômeros hidrolisados. Este nome é dado, pois estas espécies serão consumidas na segunda etapa que compõe o processo sol-gel, a etapa de condensação (ou polimerização), conforme Esquema 2.



**Esquema 2.** Representação de mecanismo atribuído à etapa de condensação no processo sol-gel catalisado por base.

Durante as reações de condensação, o monômero, no caso do Esquema 2 representado como mono-hidrolisado (apenas um grupo OH), sofre desprotonação pela base e, então, atua como nucleófilo ao atacar o átomo de Si de outra molécula de monômero, formando assim a ligação siloxano (Si-O-Si) e dando origem ao a cadeia polimérica da sílica. Porém, ainda que as etapas sejam demonstradas de forma isoladas, a partir da formação das espécies hidrolisadas, reações de hidrólise e condensação passam a ocorrer simultaneamente, sendo possível favorecer uma ou outra de acordo com as condições reacionais. Inicialmente a hidrólise do precursor é desfavorecida, devido à diminuição do caráter eletropositivo do átomo de Si pela eletrodoação dos grupos OR, devido ao efeito indutivo, diminuindo sua susceptibilidade ao ataque do nucleófilo. Porém, à cada substituição, a presença de grupos OH acentua o caráter eletropositivo do Si, através do efeito eletroretirador. Isso faz com que a taxa de hidrólise aumente, facilitando a produção de monômero completamente hidrolisados, isto é, com quatro grupos OH. Devido à simetria dos sítios reativos, as reações de condensação/polimerização ocorrem sem alguma direção preferencial, levando à produção de materiais com aspecto semelhante a esferas “empacotadas” em uma estrutura maior. No Método de Stöber, as condições reacionais são ajustadas para favorecer a produção de esferas idealmente afastadas, garantindo a estabilidade destas em suspensão, ou seja, sem este “empacotamento”. De forma bastante simplificada, esse método pode ser compreendido pela perspectiva de um processo sol-gel catalisado por base e idealmente diluído. Ainda que existam diversas variações e adaptações do Método de Stöber, o protocolo original, assim como muitos outros trabalhos que buscam reproduzi-lo, são baseados na hidrólise e condensação de TEOS (precursor de

Si) na presença de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (catalisador), água (co-catalisador) e etanol (solvente). De acordo com diferentes grupos de pesquisa, o ajuste desses componentes, assim como a temperatura e o tempo de reação, permite o controle de propriedades importantes das partículas, como diâmetro e polidispersão. Revisões detalhadas, tratando das especificidades do método, assim como suas distintas aplicações, estão disponíveis em literatura científica <sup>63-65</sup>. Ainda que seja considerado um método simples, há diferentes cuidados que devem ser observados quando se deseja trabalhar com o método de Stöber, desde a qualidade do solvente, até a perda de catalisador por evaporação. Mais detalhes sobre estes aspectos do método estão disponíveis no APÊNDICE A.

O Método de Stöber se torna uma ferramenta ainda mais potente ao combinar a síntese de estruturas nano e micrométricas às diferentes possibilidades de funcionalização, características de processos sol-gel. De fato, assim como ocorre nas rotas tradicionais do processo sol-gel, durante a síntese de partículas de sílica por esse método, é possível estabelecer propriedades físicas e químicas através da incorporação de organosilanos. Esse tipo de abordagem permite o uso de partículas de sílica em inúmeras aplicações de acordo com os protocolos de síntese e funcionalização.

Considerando as diferentes abordagens elaboradas para inibir a adesão e o desenvolvimento de microrganismos em determinados substratos, seria possível estabelecer estratégias para inibir/minimizar a interação fungo-vidro? Além disso, considerando as propriedades do processo sol-gel, como controle de espessura, composição química, e outros aspectos, seria possível utilizá-lo como base para desenvolvimento de recobrimento antiadesão aplicado a componentes ópticos? Esse recobrimento poderia ser constituído por compostos naturais com atividade antifúngica? Por fim, considerando que a combinação de propriedades físicas e químicas, verificada em superfícies recobertas por nanopartículas de sílica, amplie capacidade de inibir a interação microrganismo-substrato, seria possível desenvolver partículas de sílica com atividade antifúngica, como a etapa base para o desenvolvimento do recobrimento multifuncional? Frente a esses questionamentos, se estabelece a hipótese da presente tese: a partir da combinação de processo sol-gel de superfície e compostos naturais com propriedades antifúngicas, é possível produzir recobrimentos transparentes com potencial contra adesão fúngica.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Materiais

A Tabela 1 a seguir, apresenta os reagentes utilizados em diferentes experimentos desenvolvidos na presente tese, como o cultivo do fungo modelo *Aspergillus niger* (ATCC 10535), a modificação de substratos de vidro, a síntese de nanopartículas de sílica, entre outros.

**Tabela 1.** Relação de reagentes utilizados para o desenvolvimento dos experimentos apresentados na presente tese.

Reagente	Fórmula	Nº CAS	Fornecedor
Agar	-	9002-18-0	Kasvi
Benzofenona, 95%	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> CO	119-61-9	Vetec
Citral, 99 %	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	5392-40-5	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glicose monohidratada	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> · H <sub>2</sub> O	14431-43-7	Fluka
Eucaliptol, 99 %	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	470-82-6	Sigma-Aldrich
Eugenol, 99 %	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	97-53-0	Sigma-Aldrich
Peptona bacteriológica	-	91079-38-8	Kasvi
RPMI-1640	-	-	Merck
Cloreto de potássio	KCl	7447-40-7	Acros
Cloreto de sódio	NaCl	7647-14-5	Merck
Fosfato de potássio monobásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7778-77-0	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7558-79-4	Sigma-Aldrich
Acetona P.A.	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	67-64-1	Nuclear
Dimetilsulfóxido, 99 %	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS	67-68-5	Acros
Etanol absoluto, EMSURE®	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	64-17-5	Merck
Metanol, HPLC/Espectroscopia	CH <sub>3</sub> OH	67-56-1	Tedia
Tolueno, P.A.	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>3</sub>	108-88-3	Synth
Ácido sulfúrico, 98 %	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7664-93-9	Nuclear
Hidróxido de amônio, 28 – 30 %	NH <sub>4</sub> OH	1336-21-6	Nuclear
Peróxido de Hidrogênio 30 %, EMSURE®	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7722-84-1	Merck
(3-aminopropil)trietoxissilano (APTES), 99%	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub> Si	919-30-2	Sigma-Aldrich
3-(trietoxissilil)propil isocianato, 95%	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>3</sub> Si(NCO)	24801-88-5	Sigma-Aldrich
Cloro(dimetil)octadecilsilano, 95%	C <sub>20</sub> H <sub>43</sub> ClSi	18643-08-8	Sigma-Aldrich
Octiltrietoxissilano, 96%	C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub> Si	3069-40-7	Sigma-Aldrich
Tetraetil ortossilicato, ≥ 99 %	SiC <sub>8</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	78-10-4	Sigma-Aldrich

## 4.2. Organização experimental

O desenvolvimento experimental desta tese foi baseado em duas abordagens a fim de investigar a produção recobrimentos e estudar suas capacidades de inibir a adesão fúngica sobre substratos de vidro. Em um primeiro momento, diferentes compostos foram investigados quanto suas capacidades de inibir o desenvolvimento e a adesão celular do fungo *A. niger*. Então, fez-se uso do processo sol-gel para funcionalização de substratos de vidro e, a retenção de compostos antifúngicos identificados, a fim de investigar a aplicabilidade deste recobrimento na inibição da adesão celular. Em paralelo, a síntese de partículas de sílica pelo método de Stöber foi investigada, com o intuito de produzir estruturas nanométricas modificadas com os antifúngicos investigados. Diferentes abordagens focadas no isolamento e na funcionalização destas partículas foram investigadas. Essas abordagens serão detalhadas ao longo desta tese, porém uma visão geral pode ser observada na Figura 7.

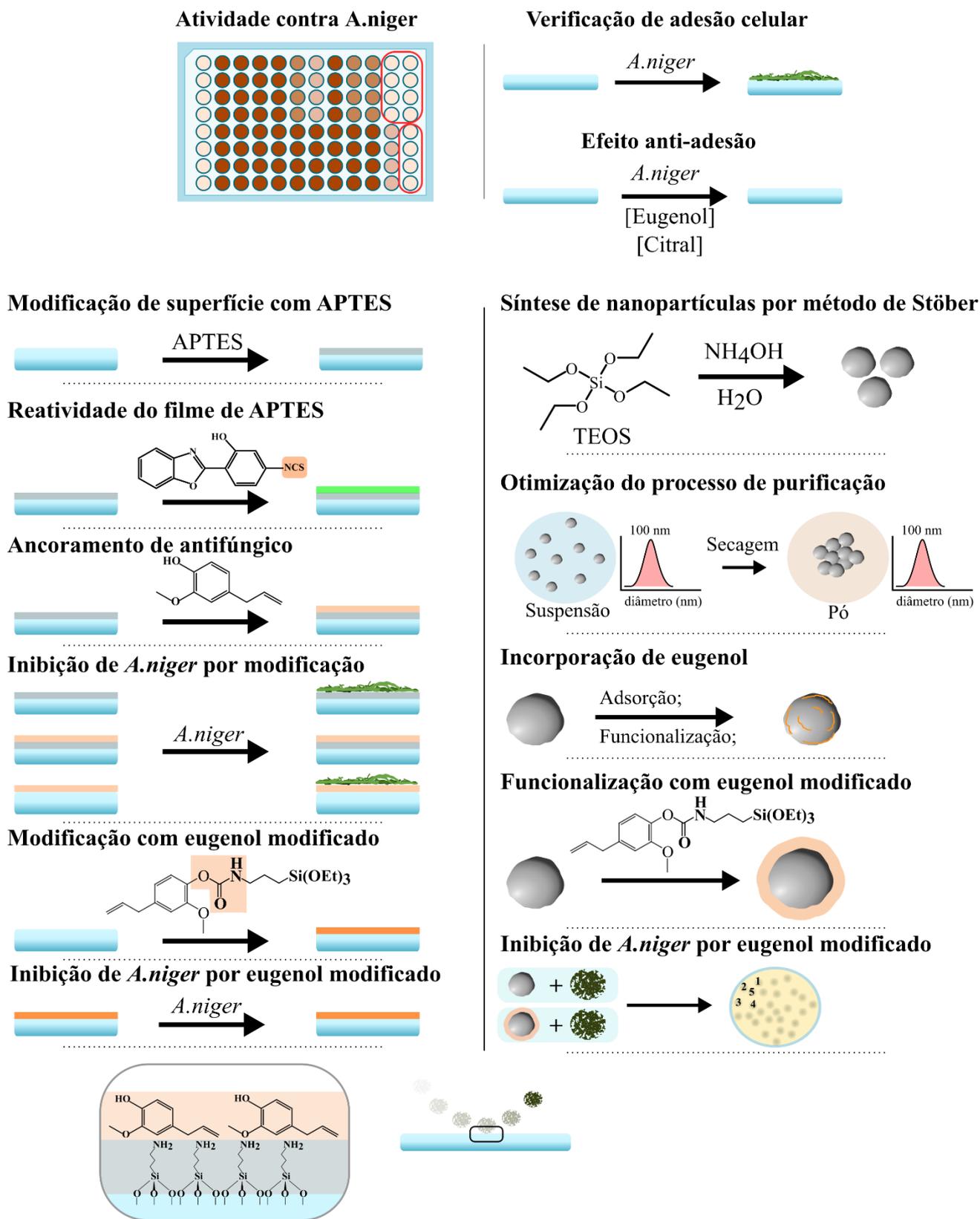


Figura 7. Ilustração das diferentes etapas e abordagens elaboradas ao longo da presente tese, com o intuito de estabelecer estratégias para promover a inibição da adesão fúngica sobre o vidro.

### **4.3. Procedimentos de caracterização**

#### *4.3.1. Determinação de diâmetro e polidispersão de partículas de sílica por espalhamento de luz dinâmico*

As determinações de valores de diâmetro hidrodinâmico (chamado neste trabalho, de forma simplificada, de diâmetro) e índice de polidispersão das partículas de sílica, foram realizadas através de medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS), utilizando o equipamento ZetaSizer Nano S90 (Malvern Instruments), com o detector fixo a 90° do feixe incidente. Cada medida foi realizada em triplicata instrumental, sendo cada replicata composta por, ao menos, 10 leituras. Para determinação da concentração ideal das suspensões, cerca de 2 mg foram suspensas em 1 mL de água ultrapurificada e a mistura sonicada por 2 horas em banho de ultrassom. Então, diferentes volumes desta suspensão foram diluídos a 1,2 mL até se obter sinal na faixa de 150 – 250 kcps. As medidas foram realizadas em água ultrapurificada, a 25 °C (viscosidade 0,8872 cP; Índice de refração: 1,330).

#### *4.3.2. Eficiência de encapsulamento por espectroscopia UV-Vis*

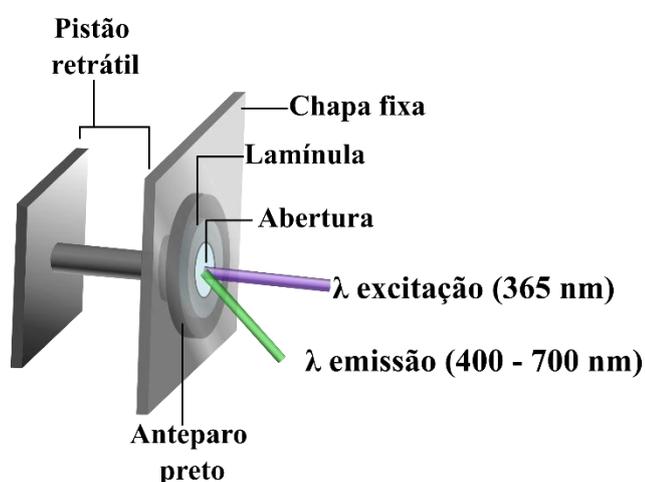
A concentração de eugenol nas soluções de síntese foi determinada através de medidas no comprimento de onda de 280 nm, utilizando o espectrofotômetro BioMate 3S (Thermo Scientific Para tanto, imediatamente após cada centrifugação, as amostras de solução reacional foram diluídas 50 vezes e imediatamente analisadas por UV-Vis, a fim de evitar interferências devido ao crescimento de novas nanopartículas. Para a análise quantitativa, uma curva de calibração foi estabelecida com sete soluções-padrão de eugenol, preparados nas mesmas concentrações de etanol, água e amônia que as amostras (considerando a diluição de 50 vezes). As leituras foram executadas em triplicata para cada replicata das amostras.

#### *4.3.3. Caracterização fotofísica dos recobrimentos*

As lamínulas estudadas foram submetidas às análises de reflectância difusa UV-Vis (DRUV) e transmitância, na faixa de 220 a 700 nm, utilizando espectrofotômetro

UV-Vis (UV-2450, Shimadzu), equipado com esfera integradora ISR-2200, na presença de BaSO<sub>4</sub> (Wako Pure Chemical Industries, Ltda) como referência.

Lamínulas modificadas e marcadas com sinalizador fluorescente foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em estado estacionário em espectrofluorímetro equipado com lâmpada de xenônio (RF-5301PC, Shimadzu), sob comprimento de onda de excitação de 365 nm. O porta-amostra utilizado é elaborado para possibilitar que a amostra (lamínula) seja centralizada ao orifício no qual o feixe de incidência é focalizado, conforme ilustrado pela Figura 8. A angulação do porta-amostra permite que a amostra irradiada a 45°, limitando a reflexão do feixe de excitação ao sistema de detecção. As medidas foram realizadas a 25 °C.



**Figura 8. Ilustração do porta-amostra utilizado para as medidas de fluorescência das lamínulas modificadas.**

#### 4.3.4. Caracterização de superfícies por ângulo de contato e perfilometria óptica 3D

Ambas as técnicas foram executadas através da estrutura do Laboratório Multiusuário de Análise de Superfícies (LAMAS), localizado no Instituto de Química (UFRGS). Para a determinação das variações da hidrofobicidade das superfícies modificadas, as amostras foram analisadas no equipamento DSA100 (KRUSS), utilizando o método de gota sésil, com volume médio de gota igual a 5 µL. As amostras foram analisadas em três regiões distintas (com exceção daquelas onde  $\theta < 10^\circ$ ). Cada amostra foi produzida em quintuplicata (amostras em branco, ou seja, sem modificação, foram analisadas em 12 replicatas).

As medidas de topografia foram feitas através do perfilômetro óptico CONTOUR-GT (BRUKER), utilizando objetivo com magnificação de 5 vezes e luz monocromática (verde). A manipulação das imagens foi feita através do software Vision64 Map™ (BRUKER). As imagens foram feitas em 4 regiões distintas para cada lamínula. Cada amostra foi preparada e analisada em quadruplicata.

#### 4.3.5. Caracterização de perfis químicos por espectroscopia de absorção na região de infravermelho com Transformada de Fourier

As medidas de micro-FTIR em modo reflectância foram realizadas em microscópio de imageamento por infravermelho, modelo Cary 620 (Agilent Technologies), utilizando um bastão de carbeto de silício como fonte de radiação infravermelho (fonte global). Nesta configuração, após passar pelo interferômetro de Michelson, a radiação emitida pela fonte térmica é direcionada ao microscópio, onde é focalizada sobre a superfície da amostra (neste caso, depositada em substrato de silício recoberto com ouro) através de lentes objetivas, que coletam a radiação refletida e a enviam ao detector de trabalho. Nestes experimentos, foram utilizadas lente objetiva com magnificação de 15 vezes, e detector Mercúrio-Cadmio-Telúrio (MCT), constantemente refrigerado sob nitrogênio líquido. A aquisição dos espectros foi feita com 512 scans, à resolução espectral de  $8\text{ cm}^{-1}$ , sobre a área de  $700 \times 700\ \mu\text{m}$ .

As medidas de FTIR em modo Reflexão Total Atenuada (ATR) foram realizadas em espectrômetro Nicolet 6700 (Thermo Scientific), utilizando amostrador OMNI. Nesta configuração, medidas de FTIR-ATR são realizadas em reflexão única (*single point*) utilizando cristal de germânio com angulação de  $45^\circ$  a diâmetro de amostragem de 2 mm. A aquisição dos espectros se deu a 64 scans, com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

As medidas de FTIR na configuração de transmissão foram realizadas em espectrômetro IRPrestige 21 (Shimadzu), utilizando método de pastilha de KBr. Para o preparo das pastilhas, amostras e KBr (previamente seco em estufa a  $120^\circ\text{C}$  por 72 horas) foram moídos separadamente em almofariz de ágata e, então, misturados em microtubos de 2 mL nas quantidades de 2 mg de amostra e 400 mg de KBr. Após homogeneização da mistura, esta foi transferida para porta amostra adequado à confecção de pastilhas, e submetida 5 vezes à pressão de 5 bar durante 10 segundos. As

pastilhas de KBr foram mantidas em dessecador até a execução das análises. A aquisição dos espectros se deu a 128 scans, com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.3.6. Verificação de funcionalização de partículas por análises termogravimétricas

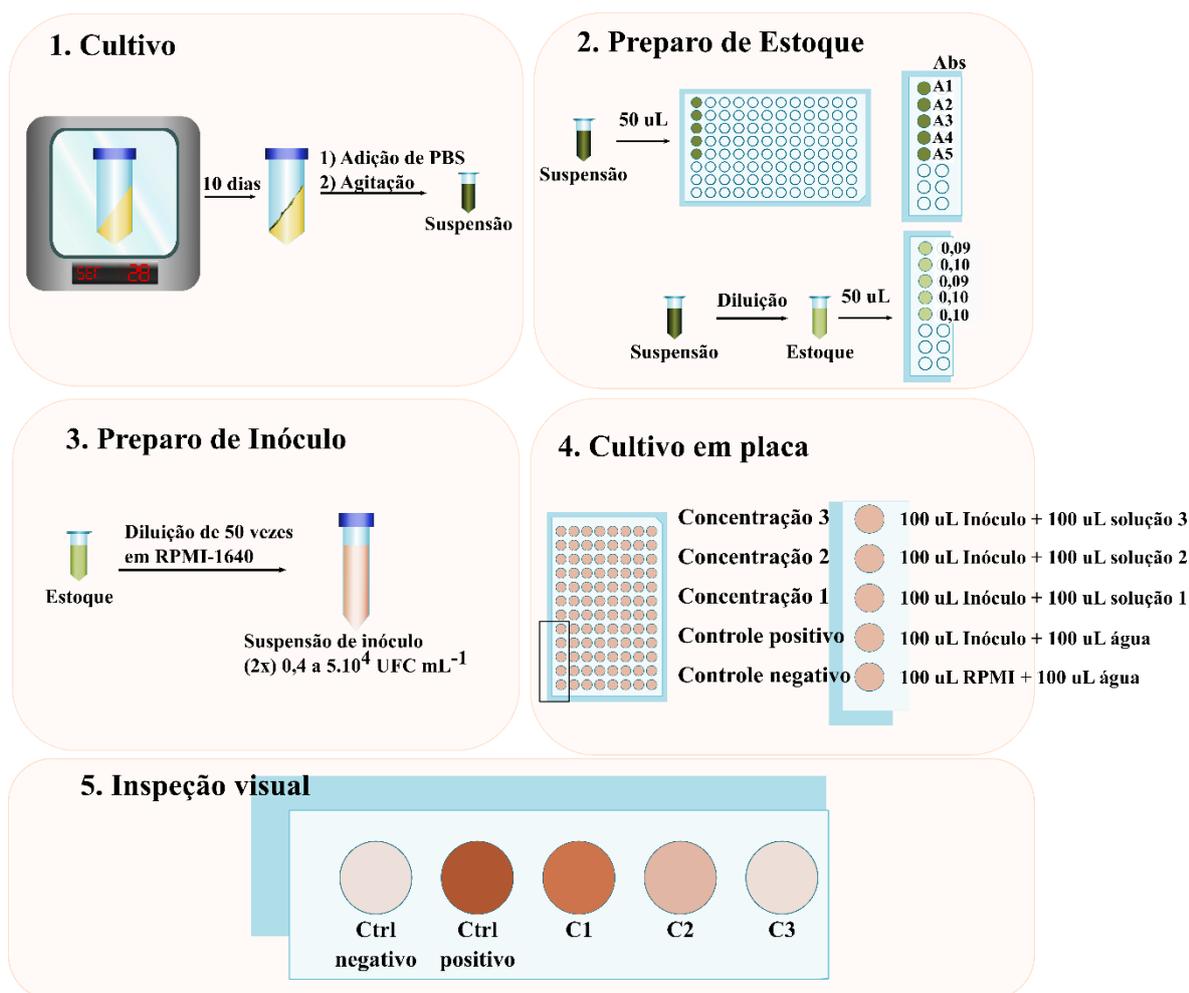
As medidas de termogravimetria foram realizadas no equipamento Q50 (TA Instruments). Para isso, cerca de 12 mg de amostra foram adicionados ao cadinho de platina, e submetidos a aquecimento de 25 a  $800\text{ °C}$ , a uma taxa de  $10\text{ °C min}^{-1}$ , sob fluxo nitrogênio de  $40\text{ mL min}^{-1}$ .

#### 4.4. Testes de sensibilidade a antifúngicos

O fungo *A. niger* foi estabelecido como fungo-modelo, na presente tese, devido sua recorrência em substratos de vidro, sendo associado a diversas alterações verificadas nestes materiais <sup>2,15,27,28,31,66</sup>, assim como pela sua presença em particulados suspensos em regiões urbanas e rurais <sup>3-6,33,34</sup>, que torna sua propagação e, conseqüentemente, seu potencial de contaminação elevados.

Os testes foram executados conforme *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos; Norma Aprovada (Documento M38-A do NCCLS)* <sup>67</sup>. Em resumo, o fungo foi cultivado durante o período de 7-10 dias em meio de cultura inclinado, sob temperatura controlada. Após o período, em capela de fluxo laminar, 2 mL de tampão PBS (pH 7,0) foram adicionados, e a mistura foi agitada suavemente, a fim de produzir a suspensão de esporos inicial. Então, a suspensão foi transferida para microtubo estéril (a necessidade de centrifugação e/ou filtração em lâ de vidro estéril foi avaliada conforme a observação de micélio), cinco alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  foram transferidas para placa de 96 poços e cada uma destas foi submetida à determinação dos valores de absorbância a 600 nm, através do equipamento SpectraMax (Molecular Devices). A suspensão foi diluída a fim de obter uma mistura com absorbância de 0,09 - 0,11. Esta suspensão foi diluída 50 vezes em meio RPMI-1640 (2 vezes concentrado, com MOPS) a fim de produzir uma suspensão de inóculo com a concentração de  $(2\times) 0,4$  a  $5 \times 10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , aproximadamente. Para a verificação da sensibilidade aos compostos testados, a cada poço foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de inóculo e 100  $\mu\text{L}$  da

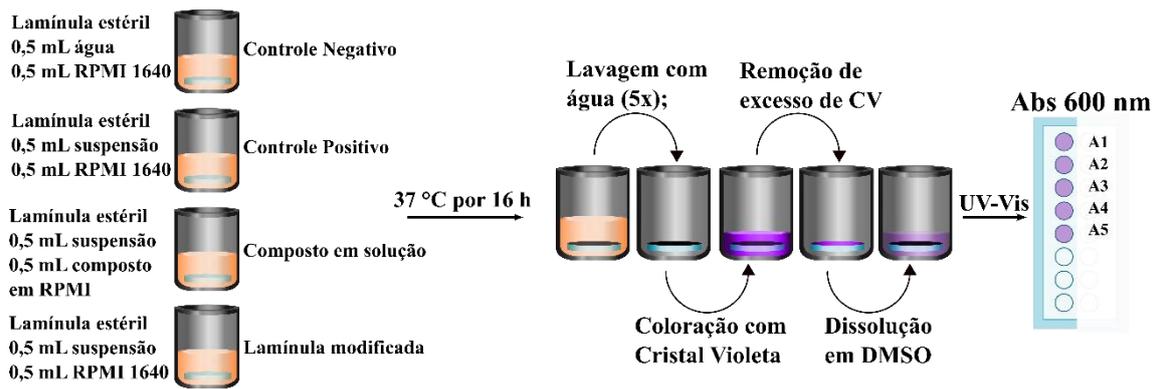
solução do composto investigado diluído em água ultrapurificada ou em água ultrapurificada e DMSO 1%. Para cada teste, 5 a 10 concentrações de cada composto sob estudo foram utilizadas em, pelo menos, quadruplicata. O mesmo protocolo foi aplicado aos controles negativo e positivo. Após esta etapa, a placa foi incubada a 35 °C durante 46 – 50 horas. Por fim, a verificação da concentração mínima inibitória (MIC) foi feita por inspeção visual. As etapas deste protocolo estão ilustradas na Figura 9.



**Figura 9.** Ilustração das etapas de cultivo (1), preparo de suspensão de inóculo (2 e 3), montagem da placa de 96 poços (4), e verificação de efeitos no desenvolvimento fúngico por ação dos compostos investigados (5), do teste de sensibilidade à antifúngicos, conforme *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos; Norma Aprovada (Documento M38-A do NCCLS)* <sup>67</sup>.

#### 4.5. Testes de inibição de biofilme

Para investigar a capacidade de inibição de biofilme, utilizou-se protocolo previamente estabelecido em literatura <sup>68</sup> com algumas alterações. O cultivo dos fungos se deu seguindo o protocolo da Seção 4.4. Após o tempo de cultivo, a suspensão de esporos de *A. niger* (com absorvância de 0,09 – 0,11) foi diluída duas vezes em tampão fosfato (PBS), produzindo a suspensão de inóculo com concentração de  $(2 \times) 1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  esporos mL<sup>-1</sup>. Desta suspensão, alíquotas de 500 µL foram transferidas para posições em placas de 24 poços, contendo lamínulas modificadas ou não, previamente limpas e esterilizadas, conforme protocolo apresentado na Seção 4.6. A cada poço foram adicionados 500 µL de água ultrapurificada. Aos poços de controle negativo foram adicionados 500 µL de RPMI-1640 (2 vezes concentrado, com MOPS) e 500 µL de tampão fosfato. Em experimentos utilizando lamínulas não modificadas foram adicionados 500 µL das soluções de compostos investigados, preparados em meio RPMI-1640 (2 vezes concentrado, com MOPS). Para experimentos com lamínulas modificadas, apenas 500 µL de RPMI-1640 (2 vezes concentrado, com MOPS) foram adicionados à suspensão de inoculação. Então, as placas permaneceram em incubação a 37 °C, durante 16 – 20 horas. Após este período, o líquido de cada poço foi descartado e a respectiva lamínula foi lavada 5 vezes com 1 mL de água ultrapurificada. Após as lavagens, as lamínulas foram transferidas para uma nova placa e deixadas em estufa durante 1 hora (37 °C), para fixação da biomassa. A biomassa foi corada adicionando 500 µL de cristal violeta, e mantendo sob leve agitação durante 15 minutos. O excesso de corante foi removido, e as lamínulas foram lavadas 10 vezes, com 1 mL de água ultrapurificada e, então, transferidas para nova placa de 24 poços, onde foram adicionados 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). O sistema foi mantido sob leve agitação por 15 minutos, a fim de solubilizar o corante adsorvido à biomassa. Por fim, alíquotas de 100 µL de cada poço foram pipetadas a uma placa de 96 poços, para a determinação dos valores de absorvância a 600 nm. Para cada posição na placa de 24 poços, foram realizadas 5 alíquotas para determinação do valor médio de absorvância. As etapas deste protocolo estão ilustradas na Figura 10.



**Figura 10. Ilustração dos procedimentos executados durante o protocolo utilizado para verificação de adesão fúngica a substratos de vidro. DMSO: Dimetilsulfóxido.**

#### 4.5.1. Efeitos de eugenol e citral em hifas

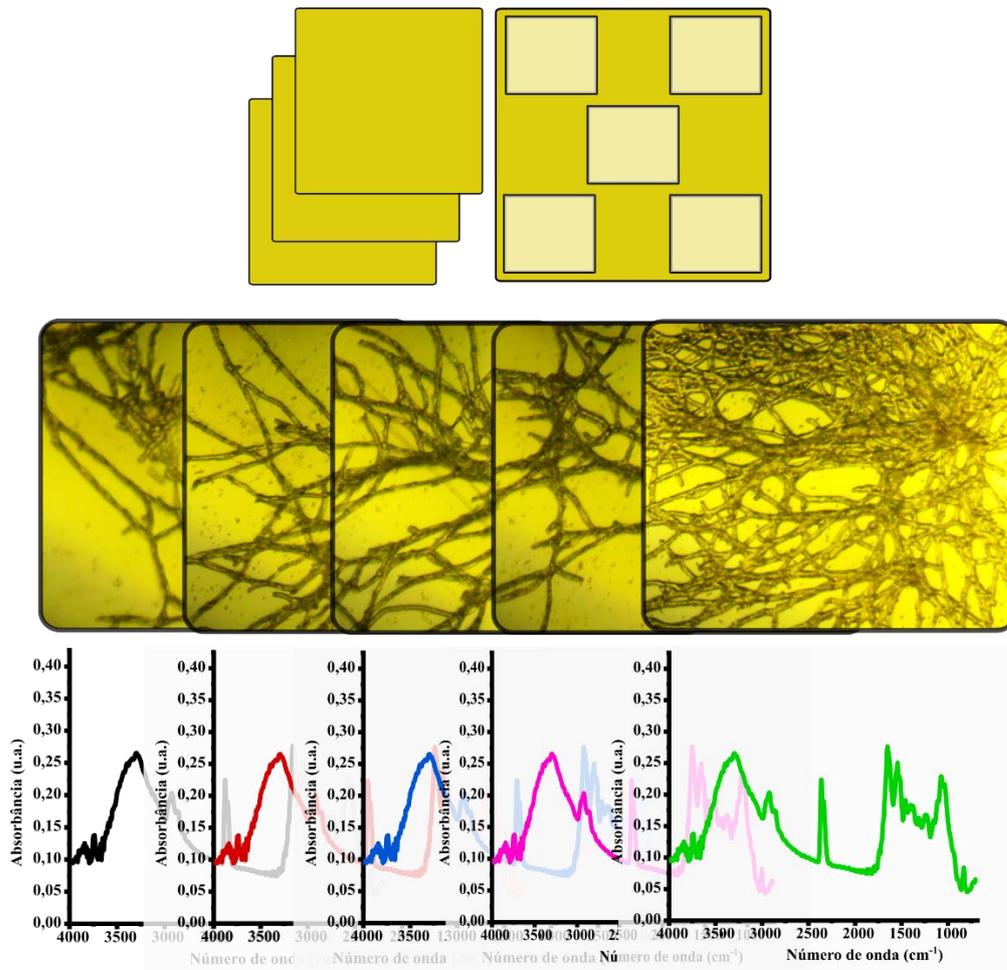
O objetivo deste experimento foi mapear hifas, e outras estruturas, desenvolvidas sobre determinada superfície, através da técnica de Microespectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier ( $\mu$ FTIR), para investigar possíveis perfis químicos associados a danos causados ao fungo pela exposição a eugenol e citral. Considerando o interesse em investigar hifas aderidas à superfície, um primeiro aspecto relevante ao experimento foi a utilização de um substrato adequado à técnica de  $\mu$ FTIR no modo Refletância, ou seja, com alta refletividade de radiação infravermelho e baixa rugosidade. Para isso, substratos de silício recobertos com ouro (5 mm x 5 mm) foram fornecidos pela equipe da linha Imbuia (Sirius-CNPEM). Os substratos de ouro foram submetidos ao protocolo de limpeza das lâminulas de vidro (Seção 4.6) e, então, ao experimento de adesão. Este experimento foi executado de forma similar ao experimento de inibição de biofilme (Seção 4.5). Os substratos foram distribuídos a poços de placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 100  $\mu$ L de suspensão ( $2 \times 10^4$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , e 100  $\mu$ L das soluções de compostos investigados, preparados em meio RPMI-1640 (2 vezes concentrado, com MOPS). As placas permaneceram em incubação a 37 °C, durante 16 – 20 horas. Após este período, solução de cada poço foi descartada e cada substrato foi lavado 5 vezes com 1 mL de água ultrapurificada aquecida a 37 °C. Após as lavagens, os substratos foram transferidos para uma nova placa e deixadas em estufa (37 °C) durante 72 horas para fixação e secagem da biomassa. Nesta abordagem de preparo das amostras, a lavagem com água a 37 °C teve como objetivo evitar estresse das células por variação brusca de temperatura, enquanto o uso de água ultrapurificada

invés de solução tampão buscou minimizar a presença de sais após o processo de secagem. É importante observar que este tipo de abordagem de preparo de amostra não se atenta à manutenção da morfologia das células, mas sim a minimização de perdas/alterações na composição química das mesmas, ou seja, para análises morfológicas, como microscopia eletrônica de varredura ou microscopia de força atômica, um preparo de amostra envolvendo desidratação celular por troca com solvente, e secagem supercrítica, poderia ser mais adequado.

As amostras foram submetidas a análises de  $\mu$ FTIR na linha Imbuia (Sírius-CNPEM).

Originalmente, o protocolo de adesão fúngica e crescimento de hifas sobre o substrato de ouro foi otimizado para obtenção de regiões com hifas isoladas, para permitir a análise química ao longo das mesmas, através de aquisição de imagens hiperespectrais, utilizando a configuração instrumental com o detetor FPA (*Focal Plane Array*). Porém, este tipo de abordagem demandaria o uso de radiação IR gerada no anel e armazenamento síncrotron Sirius, devido a sua intensidade. No momento, esta configuração estava sob implementação, portanto, a radiação de corpo negro produzida por fonte térmica do espectrômetro foi utilizada. Sendo assim, as análises mantiveram maior foco na configuração Refletância, utilizando detetor MCT (Mercúrio-Cádmio-Telúrio), que possibilitou a aquisição de dados em regiões com dimensão de 700 x 700  $\mu\text{m}$ , porém sem a possibilidade de mapeamento químico pixel a pixel.

A aquisição dos espectros foi feita em cinco regiões de cada amostra, na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , nas seguintes configurações: (i) modo refletância; (ii) magnificação de 15 vezes; (iii) resolução de 8  $\text{cm}^{-1}$ ; (iv) 512 scans. Cada amostra foi preparada e analisada em triplicata. A Figura 11 ilustra a forma de amostragem definida para análises de  $\mu$ FTIR utilizando detetor MCT.



**Figura 11.** Ilustração da abordagem escolhida para a análise de hifas de *A. niger*, desenvolvidas sobre substrato de ouro, utilizando a técnica de Microespectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier ( $\mu$ FTIR). Para cada região selecionada, um espectro de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$  foi adquirido. O espectro final resulta da combinação de 15 outros, sendo 5 espectros por cada replicata.

#### 4.6. Preparo das lamínulas de vidro

Antes da utilização das lamínulas de vidro para realização de qualquer experimento, estas foram submetidas a um processo de limpeza e, quando aplicável, de ativação de superfície. Em resumo, cada lamínula foi lavada com detergente neutro e água corrente, então submetida a aquecimento em solução de detergente neutro até fervura, durante 1 hora. Após, as lamínulas foram enxaguadas com água ultrapurificada e sonicadas durante 30 minutos em água ultrapurificada, etanol, acetona e água ultrapurificada novamente. Por fim, estas foram secas sob fluxo de gás nitrogênio 5.0 e

acondicionadas em placas de 24 poços, em dessecador, até o uso (não excedendo 24 horas). Para experimentos de modificação de superfície, cada lamínula foi submetida à imersão, durante 1 hora, em solução piranha ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  50% v/v :  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % v/v na proporção 3:1), preparada imediatamente antes do uso. Então, as lamínulas foram enxaguadas com água ultrapurificada em abundância, secas sob fluxo de gás nitrogênio 5.0 e acondicionadas em placas de 24 poços, em dessecador, até o momento do uso. Para os experimentos biológicos, cada lamínula foi esterilizada por radiação UV durante 30 minutos (cada lado). O manuseio das mesmas se deu com pinças previamente flambadas, em ambiente estéril.

#### **4.7. Síntese de recobrimento óptico em solução**

Após o procedimento de limpeza e ativação de superfícies, as lamínulas foram imersas em aproximadamente 30 mL de tolueno seco (destilado na presença de sódio metálico e benzofenona) sob atmosfera inerte, suspensas em suporte de vidro, conforme representado na Figura 12. Devido à variação das propriedades físicas de filmes finos formados por organossilanos de acordo com a temperatura <sup>69</sup>, o sistema foi mantido a 70 °C durante 1 hora previamente à adição do organossilano (3-aminopropil)triétoxissilano (APTES). Após, diferentes quantidades do organossilano foram adicionadas, sob atmosfera inerte. A reação foi mantida a 70 °C durante 24 horas, sob agitação branda. Os parâmetros de concentração, temperatura, tempo e solvente foram selecionados com base em investigações sobre a qualidade, espessura, reatividade e resistência dos filmes de APTES produzidos <sup>69-72</sup>. Após 24 horas, as lamínulas foram transferidas imediatamente para tubos de ensaio contendo 3 mL de tolueno destilado e, então, sonicadas durante 5 minutos, a fim de remover o excesso de APTES e/ou moléculas fracamente interagentes à superfície. Para cada processo de modificação, 8 – 10 lamínulas foram utilizadas. Por fim, as lamínulas foram enxaguadas com tolueno destilado, secas sob fluxo de gás nitrogênio 5.0 e acondicionadas em placas de 24 poços, em dessecador, até o uso. O protocolo utilizado nesta etapa está ilustrado pela Figura 12.



**Figura 12. Ilustração de etapas envolvidas na modificação de lamínulas de vidro com APTES. Da esquerda para a direita: i) imersão de suporte de quartzo contendo 8 lamínulas circulares, em 30 mL de tolueno seco; ii) adição do organosilano aplicado na modificação da superfície das lamínulas ao meio reacional, após equilíbrio da temperatura; iii) tratamento das lamínulas após o período de reação, para eliminar resíduos do processo através de sonicação em tolueno; iv) armazenamento das lamínulas em dessecador após processo de secagem. A manipulação dos reagentes e da reação se deu sob atmosfera de nitrogênio.**

Alguns pontos referentes às escolhas deste protocolo cabem serem discutidos, entre eles o uso de solvente seco e a temperatura de reação. A presença de água se faz necessária para a promoção da hidrólise do organosilano, porém o uso de solventes comuns pode acarretar em altas taxas de hidrólise e polimerização, levando a filmes pouco resistente, mais espessos e pouco reativos. Em geral, tratando-se da superfície utilizada neste trabalho, mesmo com o processo de secagem sob fluxo de nitrogênio e armazenamento em atmosfera com umidade reduzida, há a presença de água fisissorvida à superfície<sup>69,73</sup>, mas em concentrações muito menores aos percentuais encontrados em solventes comuns, o que auxilia na hidrólise do organosilano e formação do filme fino, porém em taxa mais brandas e controladas, levando a filmes mais reativos, menos espessos e mais resistentes<sup>69,74</sup>. Quanto à temperatura, as taxas de hidrólise e condensação variam conforme a temperatura do meio<sup>69</sup>, logo, a adição do organosilano à reação, cuja temperatura ainda não esteja estabilizada, pode acarretar em diferentes condições reacionais e, portanto, filmes mais heterogêneos.

Uma vez preparadas, as lamínulas modificadas com APTES foram utilizadas para a modificação com eugenol. Para tanto, metade das lamínulas foi reservada e a

outra metade submetida à reação com o composto de interesse. Basicamente, quatro lamínulas foram submetidas ao procedimento descrito para modificação com APTES, porém a 25 °C. Após a estabilização térmica, o volume determinado do antifúngico foi adicionado. A reação foi mantida sob atmosfera inerte e a 25 °C durante 4 horas. Após, as lamínulas foram lavadas e secas conforme descrito anteriormente. Após secagem, as lamínulas foram imediatamente utilizadas nos experimentos de inibição de biofilme. Lamínulas sem a modificação com APTES também foram submetidas a reação com eugenol para investigar a possibilidade de interação apenas com os grupos silanois do vidro.

#### **4.8. Estratégias para verificação da modificação do substrato de vidro**

Devido à indisponibilidade de acesso a técnicas de caracterização de filmes de recobrimento, tais como espectroscopia de infravermelho em ângulo rasante, microscopia de força atômica, e elipsometria, estratégias alternativas foram elaboradas para investigar, indiretamente, a formação dos filmes finos de APTES.

##### *4.8.1. Modificação química e molhabilidade de superfície*

A técnica de Molhabilidade ou Ângulo de Contato foi aplicada para investigar variações na hidrofobicidade das lamínulas, como indicativo à formação da camada de organosilano. Para isso, três organosilanos foram utilizados como agentes modificantes, seguindo o protocolo descrito na Seção 4.7. Neste experimento, os organosilanos (3-aminopropil)trietoxissilano (APTES), Octiltrietoxissilano (C8) e Cloro(dimetil)octadecilsilano (Cl•C18), foram utilizados. Para cada organosilano, 8 lamínulas foram utilizadas, enquanto 16 lamínulas foram submetidas ao mesmo procedimento, na ausência de qualquer silano. Destas 16 lamínulas, 10 foram utilizadas como substrato controle durante medidas de molhabilidade.

##### *4.8.2. Reação com marcador fluorescente*

A fim de identificar a presença e reatividade dos grupos amino, provenientes do organosilano APTES sobre as lamínulas de vidro, buscou-se reação com um marcador

fluorescente contendo o grupo isotiocianato (NCS), comumente encontrado em marcadores utilizados para marcação de proteínas, devido a sua alta reatividade com aminas primárias <sup>75</sup>. A molécula utilizada como marcador fluorescente — 2-(4'-isotiocianato-2'-hidroxifenil)benzoxazol — foi sintetizada por Rodembusch e col. <sup>76</sup> e fornecida pelo grupo de pesquisa.

Após modificação das superfícies das lamínulas com APTES (conforme Seção 4.7), estas foram submersas em solução de marcador em tolueno ( $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), previamente aquecida a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ . A reação foi mantida por 24 horas. Após, cada lamínula foi removida e lavada com o mesmo solvente. Por fim, estas foram secas sob fluxo de nitrogênio. Estes procedimentos estão ilustrados na Figura 13. A determinação de fluorescência foi efetuada conforme Seção 4.3.3.



**Figura 13. Ilustração de etapas envolvidas na estratégia de verificação do filme de APTES por sinalização com composto fluorescente: i) exposição de lamínulas modificadas com APTES à solução do composto utilizado como marcador, em tolueno, a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob atmosfera de nitrogênio; ii) remoção de excesso de marcador por lavagem em tolueno assistida por ultrassom; iii) estocagem em ambiente com umidade reduzida.**

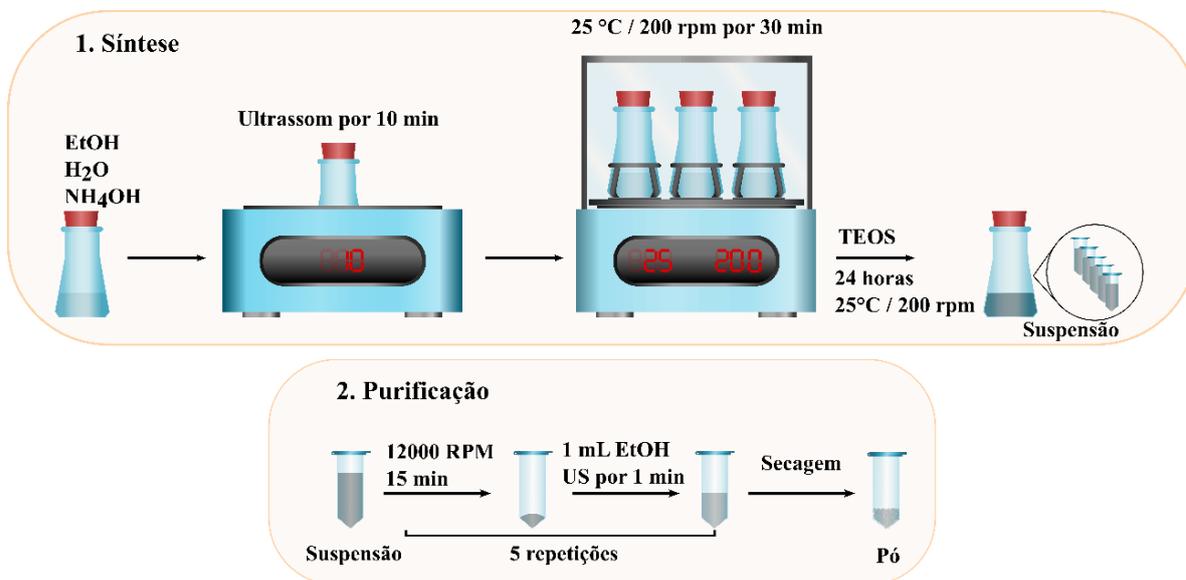
#### 4.9. Síntese de partículas de sílica pelo método de Stöber

As sínteses de partículas foram estabelecidas através do método sol-gel básico idealmente diluído, comumente conhecido como Método de Stöber <sup>62</sup>. Através desta abordagem, efeitos do catalisador utilizado ( $\text{NH}_3$ , a partir de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) e do tempo de síntese foram avaliados quanto ao tamanho e polidispersão das partículas.

Para as sínteses de partículas de sílica pelo método de Stöber, o volume de reação foi fixado em 10 mL, para facilitar o processo de purificação, que demanda etapas de ultracentrifugação para separação das partículas. Neste volume de reação, as quantidades de TEOS e água (ultrapurificada) foram fixados em 0,625 e 1,0 mL, para estabelecer as concentrações de 0,28 e 6,0 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os volumes de catalisador (hidróxido de amônio, trietilamina ou trietanolamina) foram estabelecidos conforme as concentrações almejadas, de acordo com a finalidade do experimento. Em todos os protocolos de síntese, etanol absoluto foi utilizado como solvente de reação, e adicionado conforme volume necessário para completar 10 mL. De forma geral, para estas sínteses, os volumes de etanol, água e catalisador foram adicionados a frascos Erlenmeyer (50 mL). Os frascos foram fechados com septos de borracha e submetidos a banho de ultrassom durante 10 minutos. Após, os frascos foram mantidos em *shaker* orbital a 200 rpm e 25 °C, durante 30 minutos. Então, a cada frasco foram adicionados 625 µL de TEOS (concentração final 0,28 mol L<sup>-1</sup>), e o sistema foi mantido sob agitação e temperatura constantes, por 24 horas ou o tempo necessário para o experimento proposto.

Após o período de síntese, as soluções apresentaram aspectos que variavam de levemente azulado a leitoso, dependendo das condições de síntese. Para a obtenção das partículas, cada reação foi fracionada em cinco microtubos de 2 mL, e centrifugadas a 12000 rpm durante 15 min, sob temperatura controlada (T = 25 °C). Esta primeira etapa de centrifugação é necessária para a separação das partículas do meio reacional. Após esta etapa, 1 mL de etanol absoluto foram adicionados a cada microtubo. Após ressuspensão em banho ultrassom, os microtubos foram submetidos à nova centrifugação, sob as mesmas condições. Este procedimento foi repetido cinco vezes. Estas etapas são necessárias para a eliminação de reagentes residuais, principalmente amônia, pois podem induzir reações do tipo interpartículas. As etapas de síntese e purificação estão representadas na Figura 14. Por fim, as partículas foram ressuspensas em água ultrapurificada e/ou etanol absoluto, de acordo com as necessidades do experimento, mas em geral, a ressuspensão se deu em etanol para posterior processo de secagem, realizado em estufa (70 °C, durante 20 – 24 horas). Para os procedimentos de secagem, foram evitadas as suspensões em água, pois devido à pressão capilar do solvente e possíveis interações de superfície devido à hidratação, o sistema se torna

mais susceptível a processos de agregação e aglomeração <sup>77</sup>. Mais detalhes sobre métodos de secagem serão discutidos a seguir.



**Figura 14.** Ilustração das etapas desenvolvidas para síntese e purificação das partículas de sílica por Método de Stöber. A síntese envolve as etapas de: i) homogeneização do solvente, co-catalisador e catalisador; ii) equilíbrio da solução a  $25^\circ\text{C}$ ; iii) adição do precursor de sílica ( $\text{TEOS}$ ); iv) manutenção da reação a  $25^\circ\text{C}$  durante 24 horas. A purificação das partículas obtidas após 24 horas de reação envolve as etapas de: i) remoção da solução de reação por ultracentrifugação; ii) lavagem com etanol assistida por ultrassom, seguida de ultracentrifugação; iii) secagem de partículas suspensas em etanol.

#### 4.9.1. Otimização da concentração de catalisador e tempo de síntese no preparo das nanopartículas

Para a verificação dos efeitos do catalisador sobre a síntese, as concentrações dos demais componentes foram fixadas ( $\text{TEOS}$ , água ultrapurificada e etanol), enquanto a de  $\text{NH}_3$  (a partir de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) foi variada de  $0,2 - 0,8 \text{ mol L}^{-1}$ , conforme Tabela 2 a seguir.

**Tabela 2.** Condições experimentais para avaliação da influência da concentração do catalisador sobre a síntese de partículas de sílica. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L<sup>-1</sup>; Concentração de água: 6,0 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 24 horas).

<b>CÓDIGO</b>	<b>NH<sub>3</sub> [mol L<sup>-1</sup>] (a partir de NH<sub>4</sub>OH)</b>
NP 1	0,21
NP 2	0,38
NP 3	0,58
NP 4	0,77

Após a investigação da influência do catalisador sobre as partículas, a condição que produziu menor tamanho de partícula foi selecionada e, nesta condição, o tempo de síntese, no intervalo de 1 a 24 horas, foi avaliado.

**Tabela 3.** Condições experimentais para avaliação da influência do tempo de síntese sobre as partículas. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L<sup>-1</sup>; Concentração de água: 6,0 mol L<sup>-1</sup>; Concentração de NH<sub>3</sub> (a partir de NH<sub>4</sub>OH): 0,21 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto).

<b>CÓDIGO</b>	<b>Tempo [h]</b>
NP 1 1h	1
NP 1 2h	2
NP 1 4h	4
NP 1 8h	8
NP 1 10h	10
NP 1 24h	24

Uma vez determinado, o tempo de síntese no qual foram obtidas as partículas com menor diâmetro foi estabelecido como padrão para avaliar condições reacionais pobres em catalisador, com o intuito de obter partículas na faixa de 100 nm, então, conceitualmente definidas como nanopartículas. Para isso, o intervalo de concentração de catalisador investigado foi de 0,02 – 0,16 mol L<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.** Condições experimentais para avaliação da influência do catalisador sobre a síntese de partículas de sílica. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L<sup>-1</sup>; Concentração de água: 6,0 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 1 hora).

<b>CÓDIGO</b>	<b>NH<sub>3</sub> [mol L<sup>-1</sup>] (a partir de NH<sub>4</sub>OH)</b>
NP 5	0,002
NP 6	0,01
NP 7	0,02
NP 8	0,04
NP 9	0,08
NP 10	0,16

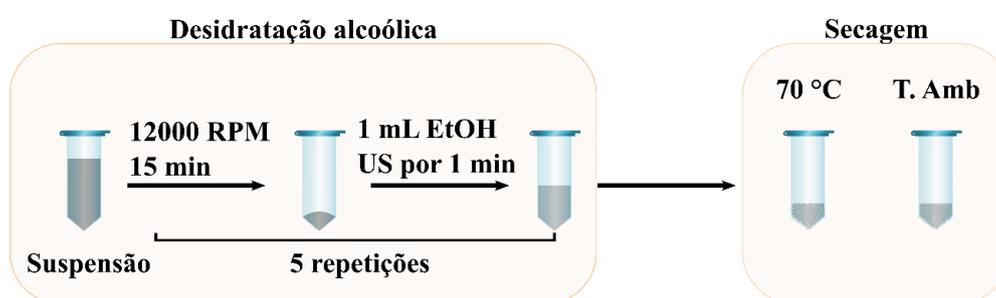
De acordo com os protocolos executados, foi observado que apenas a condição NP 10 possibilitou a obtenção de nanopartículas após 1 hora de síntese (nas demais condições não houve formação de partículas, mesmo após 120 horas). Ainda, nesta condição buscou-se avaliar dois pontos: (i) a estabilidade das partículas mantidas em suspensão; (ii) a possibilidade de aumentar a massa de produto, sem modificações significativas nas propriedades das partículas (diâmetro e polidispersão). Para o monitoramento da estabilidade das NP 10, o diâmetro e o índice de polidispersão das partículas suspensas em água ultrapurificada foram monitorados ao longo de um ano. Enquanto que para aprimorar a produção de material, a síntese na condição NP 10 foi executada ampliando o tempo de síntese de 1 hora para 24 horas. Por fim, a mesma condição foi avaliada durante diferentes tempos de síntese (1 – 24 horas) a fim de verificar possíveis alterações de massa, diâmetro e polidispersão de forma mais detalhada.

#### 4.9.2. Métodos de secagem de nanopartículas de sílica

Para as aplicações-alvo desta tese, partículas em pó eram necessárias, porém este é um grande problema, pois métodos de secagem, em geral, podem acarretar em modificações e até mesmo perdas das propriedades das partículas. Um fenômeno recorrente é a agregação/aglomeração das partículas durante processo de secagem, o que dificulta a ressuspensão das mesmas. Ainda que tenha sido verificado que as partículas apresentam grande estabilidade em suspensão, era preciso encontrar alguma metodologia para obtê-las em fase sólida, mas conservando suas propriedades nanométricas. Para isto, diferentes métodos de secagem foram testados, utilizando como

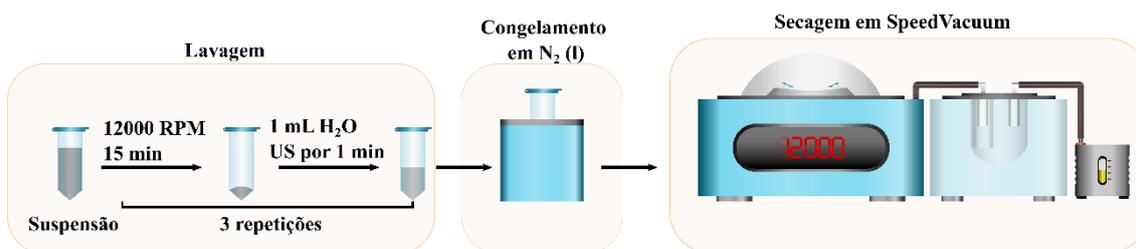
condição reacional a NP 10 24 horas. São eles: (i) desidratação alcóolica seguida de secagem em estufa a 70 °C — DA 70 °C; (ii) desidratação alcóolica seguida de secagem à temperatura ambiente — DA amb; (iii) secagem a vácuo — SpeedVaccum; (iv) liofilização.

Na abordagem por desidratação alcóolica (DA) as partículas presentes em cada microtubo foram submetidas a 5 lavagens e ressuspensões em etanol absoluto e, por fim, mantidas em 1 mL de etanol absoluto, e submetidas à secagem em estufa à 70 °C<sup>77</sup> e à temperatura ambiente para comparação de possíveis efeitos decorrentes da temperatura de secagem (Figura 15).



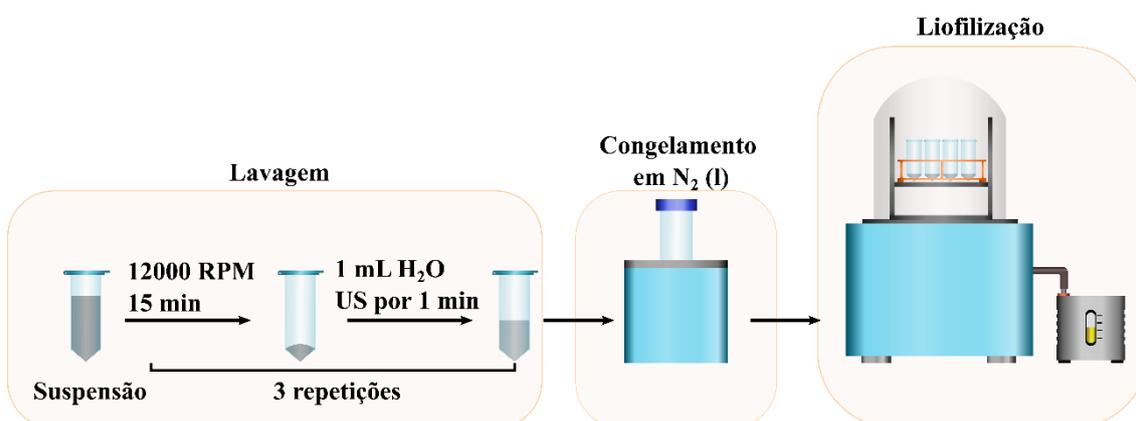
**Figura 15.** Ilustração do procedimento de purificação das partículas de sílica, baseado na lavagem destas em etanol, assistido por ultrassom, e posterior secagem das mesmas suspensas em etanol, utilizando estufa a 70 °C ou evaporação a temperatura ambiente.

Na abordagem de secagem a vácuo (SpeedVacuum), cada microtubo contendo partículas suspensas em 1 mL de água ultrapurificada foi congelado por imersão em nitrogênio líquido, durante 1 minuto, para então serem alocados no equipamento. Este equipamento é um evaporador de amostra que combina altas rotações, através do concentrador de amostras (*Centrivap Concentrator* - LABCONCO) a um alto vácuo, estabelecido pelo acoplamento a um sistema de condensação e bomba de vácuo (*Centrivap Cold Trap* – LABCONCO), permitindo que o solvente seja eliminado. Um ponto importante a ser considerado são as interferências sobre as propriedades de partículas, causadas pelo aquecimento na presença de água<sup>77</sup>, o que ocorre neste equipamento devido às altas rotações. Por isso, fez-se uso de congelamento em nitrogênio líquido, como forma de minimizar possíveis alterações nas propriedades do produto (Figura 16). O tempo necessário para secagem do produto foi de 4 horas.



**Figura 16.** Ilustração do procedimento de secagem das partículas de sílica através de exposição das mesmas a altas rotações (12000 rpm) sob vácuo. Previamente ao processo de secagem, as partículas foram purificadas por meio de lavagens com água ultrapurificada, e congeladas em nitrogênio líquido.

Na abordagem baseada na liofilização, alíquotas de 1 mL da suspensão de partículas em água foram transferidas para vials de 50 mL, e deixadas em processo de liofilização até secagem (Figura 17). O procedimento foi concluído após 8 horas.



**Figura 17.** Ilustração de procedimento de secagem das partículas de sílica através de liofilização. Previamente ao processo de secagem, as partículas foram purificadas por meio de lavagens com água ultrapurificada, e congeladas em nitrogênio líquido

Para todas as abordagens, o produto foi moído em moinho de ágata e cerca de 1 mg foi utilizado para ressuspensão em água ultrapura, através de banho de ultrassom (25 Hz) durante 2 horas. Após suspensão, 10 – 100  $\mu$ L foram diluídos a 1,5 mL para determinação de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão, através da técnica de espalhamento dinâmico de luz. Partículas mantidas em suspensão (não submetidas a processos de secagem) foram utilizadas como controle de diâmetro e polidispersão.

#### **4.10. Incorporação de compostos antifúngicos às partículas de sílica**

Uma vez estabelecidas as condições experimentais para produção das partículas de sílica, diferentes abordagens foram aplicadas a fim de proporcionar a incorporação do antifúngico eugenol às partículas e, assim, desenvolver a base para um filme fino nanoestruturado e com propriedades antiadesivas.

##### *4.10.1. Incorporação de eugenol por exposição durante síntese*

Nesta abordagem, eugenol foi adicionado durante a formação das partículas produzidas por método de Stöber. Devido às características de estabilidade coloidal do sistema, que pode ser facilmente afetada pela adição de outros compostos, levando a modificações nas propriedades das partículas, investigou-se qual seria o momento mais adequado para a adição do eugenol no meio reacional. Sabe-se que os primeiros momentos da reação (período de nucleação) são altamente sensíveis a força iônica do meio <sup>78-81</sup>, portanto a adição de determinado composto pode ser uma interferência. Considerando isso, investigou-se a adição de eugenol em diferentes tempos de síntese (2 e 12 horas). Estes tempos foram selecionados, pois: (i) após 1 hora é possível verificar visualmente a formação de partículas em suspensão, indicando possível fim do período crítico (período de nucleação); (ii) ao analisar os valores de diâmetro e polidispersão das partículas ao longo de 24 horas, nota-se que não há variações expressivas a partir de 2 h, indicando o alcance de estabilidade pelo sistema.

Em resumo, o procedimento de síntese foi o mesmo descrito na Seção 4.9, sob a condição NP10 24h. Após 2 e 12 horas de síntese, eugenol foi adicionado, em volumes adequados para a obtenção da concentração equivalente a 2 vezes a necessária para inibição de biofilme. Após as 24 horas de síntese, as partículas foram isoladas e lavadas, conforme protocolo descrito na Seção 4.9, porém a solução reacional (após centrifugação inicial) e as de lavagens foram reservadas para a realização de análises por UV-Vis, a fim de determinar a eficiência de encapsulamento de eugenol. Um ponto bastante relevante é a necessidade de diluir, imediatamente, a solução reacional, pois a concentração residual de TEOS, catalisador e água (além das partículas não removidas durante centrifugação, que podem atuar como sementes) possibilitam a produção/crescimento de novas partículas, o que se torna uma interferência durante as análises por UV-Vis. Por outro lado, esta observação é interessante sob a perspectiva de

aumento de rendimento, pois pode ser um indicativo de que mais material pode ser produzido se o tempo de reação for prolongado.

As sínteses foram realizadas em triplicata, incluindo a reação controle (sem adição de eugenol).

#### 4.10.2. Incorporação de eugenol por adsorção pós-síntese

Nesta abordagem, partículas de sílica foram sintetizadas pelo Método de Stöber, utilizando trietanolamina como catalisador, ao invés de hidróxido de amônio, a fim de produzir diferentes propriedades texturais, tais como área específica, volume e diâmetro de poros. Esta estratégia teve como objetivo a produção de partículas com maior porosidade, visto que o método de Stöber pode estar associado à produção de partículas não porosas ou microporosas <sup>82-84</sup>.

Para investigar a formação de partículas de sílica com trietanolamina como catalisador, diferentes concentrações do reagente foram aplicadas, conforme Tabela 5 a seguir. O protocolo de síntese foi semelhante ao descrito na Seção 4.9. Devido à viscosidade do reagente, o mesmo foi pesado por diferença, conforme as concentrações almeçadas, apresentadas na Tabela 5, a seguir.

**Tabela 5.** Concentrações de trietanolamina (TEA), utilizada como catalisador e agente porogênico, na síntese de partículas de sílica por método de Stöber. (Concentração de TEOS: 0,28 mol L<sup>-1</sup>; Concentração de água: 6,0 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto).

<b>CÓDIGO</b>	<b>TEA [mol L<sup>-1</sup>]</b>
TEA 1	0,3
TEA 2	0,4
TEA 3	0,6
TEA 4	0,8
TEA 5	1,0

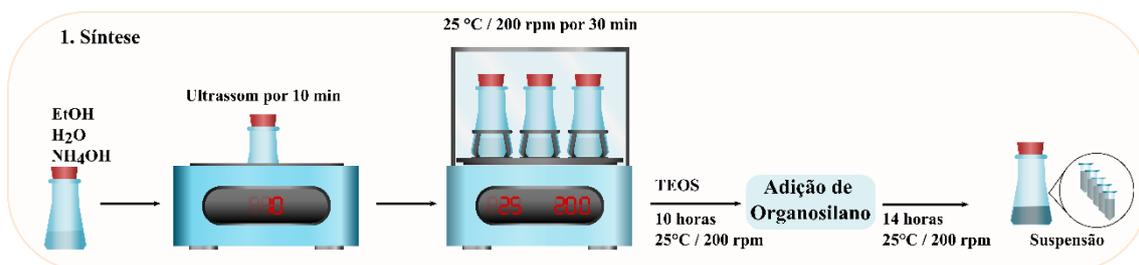
As partículas produzidas através deste protocolo foram utilizadas como adsorventes de eugenol em solução etanólica. Para isso, 50 mg de partículas (secas e/ou calcinadas a 550 °C por 2 horas) foram ressuspensos em 9 mL de etanol, com auxílio de banho ultrassônico durante 2 horas, a fim de garantir melhor dispersão das nanopartículas. Após, a suspensão foi mantida sob agitação vigorosa, a 30 °C durante 1

hora. Então, 1 mL de solução de eugenol em etanol foi adicionado à suspensão (produzindo mistura com concentração final equivalente a 1 ou 2 vezes a necessária para inibição de biofilme). A mistura foi mantida sob agitação, a 30 °C, durante 24 horas. Após o período de contato, as partículas foram removidas por ultracentrifugação (12.000 rpm, por 15 minutos), e a fase de solvente foi transferida para novos microtubos de 2 mL. Este procedimento foi repetido três vezes para minimizar interferências causadas por partículas que possam não ter sido sedimentadas durante etapa de centrifugação. Por fim, a fase líquida foi analisada por UV-Vis sob comprimento de onda de 282 nm.

Os experimentos foram feitos, em triplicata, incluindo suspensões de partículas sem adição de eugenol, analisadas com o intuito de verificar alguma interferência espectral causada por partículas que possam não ter sido sedimentadas durante etapa de centrifugação.

#### 4.10.3. Incorporação via ligação uretana

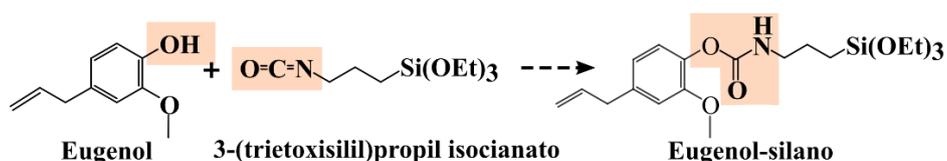
Nesta abordagem, as partículas de sílica funcionalizadas com grupo isocianato foram sintetizadas com a adição do organosilano 3-(trietoxisilil)propil isocianato após 10 horas de síntese, nas proporções (mol:mol, silano:TEOS) de 1:10 e 1:1, conforme Figura 18. A purificação das partículas foi feita conforme protocolo de desidratação alcoólica, descrito na Seção 4.9.2 Então, estas partículas foram utilizadas como adsorventes de eugenol em solução etanólica, conforme detalhado na seção anterior.



**Figura 18.** Ilustração do procedimento de síntese aplicado para produção de partículas de sílica modificadas com organosilano 3-(trietoxisilil)propil isocianato.

#### 4.11. Síntese de organosilano modificado com eugenol

Devido à dificuldade em incorporar eugenol à estrutura das partículas, mesmo utilizando partículas modificadas como suporte, uma nova abordagem foi proposta. Para isso, seria necessário produzir um organosilano modificado com eugenol. Esta abordagem seguiu a mesma racionalização proposta para incorporação de eugenol em partículas modificadas com o organosilano contendo o grupo isocianato (R-NCO), ou seja, promover a interação entre eugenol e silano pela formação da ligação uretana, conforme Esquema 3.



**Esquema 3.** Proposta de reagentes e produto envolvidos na reação entre eugenol e 3-(triethoxisilil)propil isocianato.

A reação foi executada seguindo o protocolo detalhado no APÊNDICE B. Brevemente, 10 mmol de eugenol foram dissolvidos em 8 mL de tolueno seco, sob atmosfera de nitrogênio. Então, foram adicionados 2 mL de solução de cloreto de cobre (II) em acetonitrila seca. A mistura foi mantida a 30 °C por 30 minutos e, então, 15 mmol do organosilano foram adicionados. A reação foi mantida a 30 °C durante 24 horas, sob atmosfera de nitrogênio. Após, o solvente foi removido em sistema de vácuo e o material bruto foi analisado por espectroscopia de infravermelho com Transformada de Fourier em modo ATR (FTIR-ATR). Por fim, o material bruto foi submetido a processos de purificação através de cromatografia em coluna utilizando sílica gel como fase estacionária (tamanho de partícula: 220 – 400 mesh; 35 – 75 μm), e diferentes misturas de hexano:acetato de etila como eluente. Os protocolos de preparo da coluna cromatográfica e das etapas de eluição, estão detalhados no APÊNDICE B.

Após a purificação do produto de reação, o mesmo foi submetido às análises de FTIR-ATR, RMN de <sup>1</sup>H, RMN de <sup>13</sup>C, e espectrometria de massas de alta resolução, utilizando a técnica QToF-MS.

#### 4.11.1. Síntese de partículas de sílica modificadas com eugenol-silano

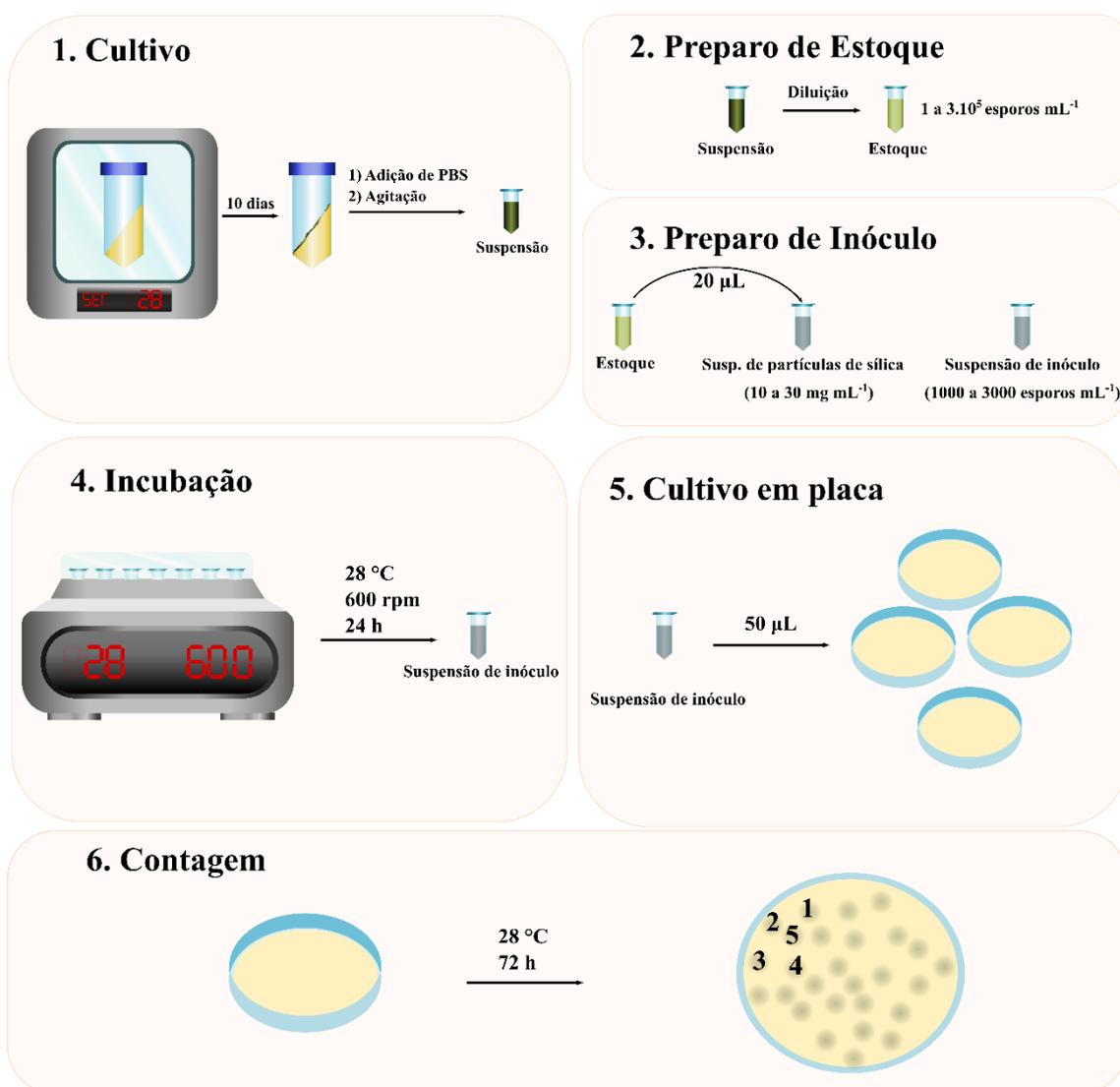
A produção das partículas de sílicas foi feita através do método de Stöber <sup>62</sup>, conforme protocolo previamente descrito na Seção 4.9. Para a incorporação de eugenol-silano nas partículas, o mesmo foi adicionado nas razões molares (mol/mol%, TEOS:eugenol-silano) de 1,0%, 5,0%, 10% e 20%. A fim de minimizar efeitos sobre as reações de hidrólise e condensação durante a formação dos núcleos, o silano foi adicionado após 10 horas de síntese, sendo necessário a solubilização da respectiva massa em 1 mL de etanol absoluto e, então, a adição desta solução ao meio reacional. O mesmo foi feito para a síntese sem silano (branco), na qual após 10 horas de síntese, apenas 1 mL de etanol absoluto foi adicionado. As reações permaneceram a 200 rpm e 25 °C até completar o período de 24 h. Após, foram purificadas e secas conforme protocolo descrito na Seção 4.9.2. As partículas foram analisadas por espalhamento de luz dinâmico, sob as condições detalhadas na Seção 4.3.1. As partículas também foram investigadas por análise termogravimétrica, sob condições descritas na Seção 4.3.6.

#### 4.11.2. Teste de atividade antifúngica por inibição de colônias

O teste comumente utilizado, nesta tese, para verificar atividade antifúngica em solução é o *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos; Norma Aprovada* (Documento M38-A do NCCLS) <sup>67</sup>, porém, ele é mais adequado para sistemas homogêneos (soluções), o que o torna menos aplicável a este caso, no qual suspensões de partículas de sílica são utilizadas como agentes antifúngicos. Dois pontos que demonstram a menor adequação são: (i) utilização de um meio de cultivo complexo (RPMI-1640), que pode afetar a estabilidade das partículas devido aos componentes do meio; (ii) por ser pensado para sistemas homogêneos, o cultivo é feito em modo estático, o que pode facilitar a decantação das partículas (principalmente em um meio complexo), minimizando o contato com os esporos.

Para verificar atividade das partículas, suspensões de 10, 20 e 30 mg mL<sup>-1</sup> foram preparadas em água ultrapurificada. As suspensões foram sonicadas em banho ultrassônico (25 Hz) durante 2 horas, e então foram submetidas à esterilização por autoclavagem.

Após o cultivo do fungo *A. niger*, conforme Seção 4.4, 2 mL de água ultrapurificada (estéril) foram adicionados ao tubo contendo o meio de cultivo inclinado, e este foi agitado suavemente, a fim produzir a suspensão de esporos, que foi transferida para microtubo estéril. A concentração de esporos nesta suspensão foi determinada através de múltiplas contagens em câmara de Neubauer (ou hemocitômetro). Então, a suspensão foi diluída com água ultrapurificada (estéril) para obter a concentração de  $1,5 \cdot 10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Após, 20  $\mu\text{L}$  desta suspensão foram adicionados a um novo microtubo (estéril) contendo 980  $\mu\text{L}$  de suspensão de partícula de sílica em água ultrapurificada (estéril), resultando na suspensão de inóculo, com concentração de  $3 \cdot 10^3$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ . Esta suspensão de inóculo foi mantida a 28 °C, durante 24 horas, sob agitação a 600 rpm, a fim de garantir a manutenção das partículas em suspensão e, conseqüentemente o contato entre partículas e esporos. Após o período de incubação, 50  $\mu\text{L}$  de cada suspensão foi transferido para placas de Petri contendo meio de cultivo constituído de glicose (10 g  $\text{L}^{-1}$ ), L-Arginina HCl (2,1 g  $\text{L}^{-1}$ ) e Select ágar (15 g  $\text{L}^{-1}$ ), e o inóculo foi espalhando utilizando esferas de vidro estéreis. As placas foram incubadas durante 72 horas a 28 °C. Após o período de incubação, o número de colônias foi contado. Este protocolo está ilustrado na Figura 19. O procedimento foi executado em quadruplicata.

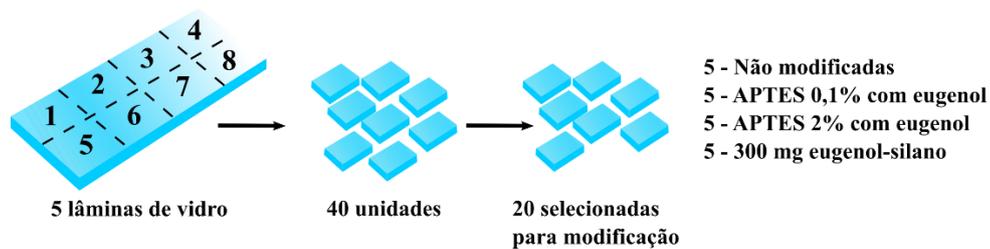


**Figura 19.** Ilustração das etapas de: (1) cultivo de *A. niger* em meio inclinado e coleta inicial de esporos; (2) preparo de suspensão estoque de esporos (solução-mãe); (3) preparo do inóculo de esporos em suspensão de partículas de sílica modificadas com eugenol-silano; (4) incubação do sistema fungo-partículas sob agitação e temperatura controlada; (5) Inoculação da suspensão de esporos e partículas de sílica à placa de Petri contendo meio sólido; (6) Cultivo e contagem das colônias desenvolvidas. Experimento realizado em quadruplicata.

#### 4.12. Teste de similaridades de cores em ambiente controlado

A fim de investigar possíveis efeitos visuais sobre a qualidade de imagens obtidas utilizando sistemas submetidos aos processos de modificação, propostos na presente tese, amostras modificadas foram anexadas à câmera embutida de um

*smartphone*, e utilizadas para fotografia em ambiente de luz controlada. Pelo fato de as lamínulas utilizadas como modelo neste estudo serem bastante frágeis, lâminas de vidro (comumente utilizadas para microscopia óptica) foram cortadas e submetidas aos processos de limpeza e ativação (Seção 4.6), e de modificação de superfície (Seção 4.7). Conforme Figura 20, 5 lâminas foram cortadas em 8 unidades cada uma, totalizando 40 unidades menores. Destas 40 unidades, 20 foram selecionadas para os processos limpeza, ativação e modificação.

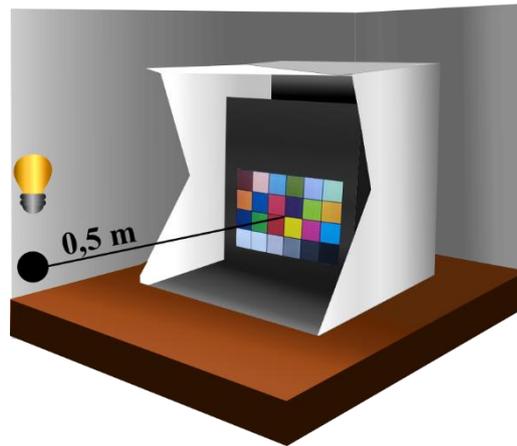


**Figura 20. Ilustração do processo de preparação de lâminas de vidro utilizadas em teste de qualidade de imagem.**

Após a finalização dos tratamentos das lâminas, estas foram utilizadas para aquisição de imagens em ambiente controlado. Para isso, uma fonte de iluminação com intensidade controlada foi utilizada. Além disso, as fotografias foram registradas utilizando *smartphone* equipado com aplicativo para controle de parâmetros fotográficos como ISO, tempo de exposição, balanço de branco, distância focal, entre outros. As especificações utilizadas estão dispostas a seguir:

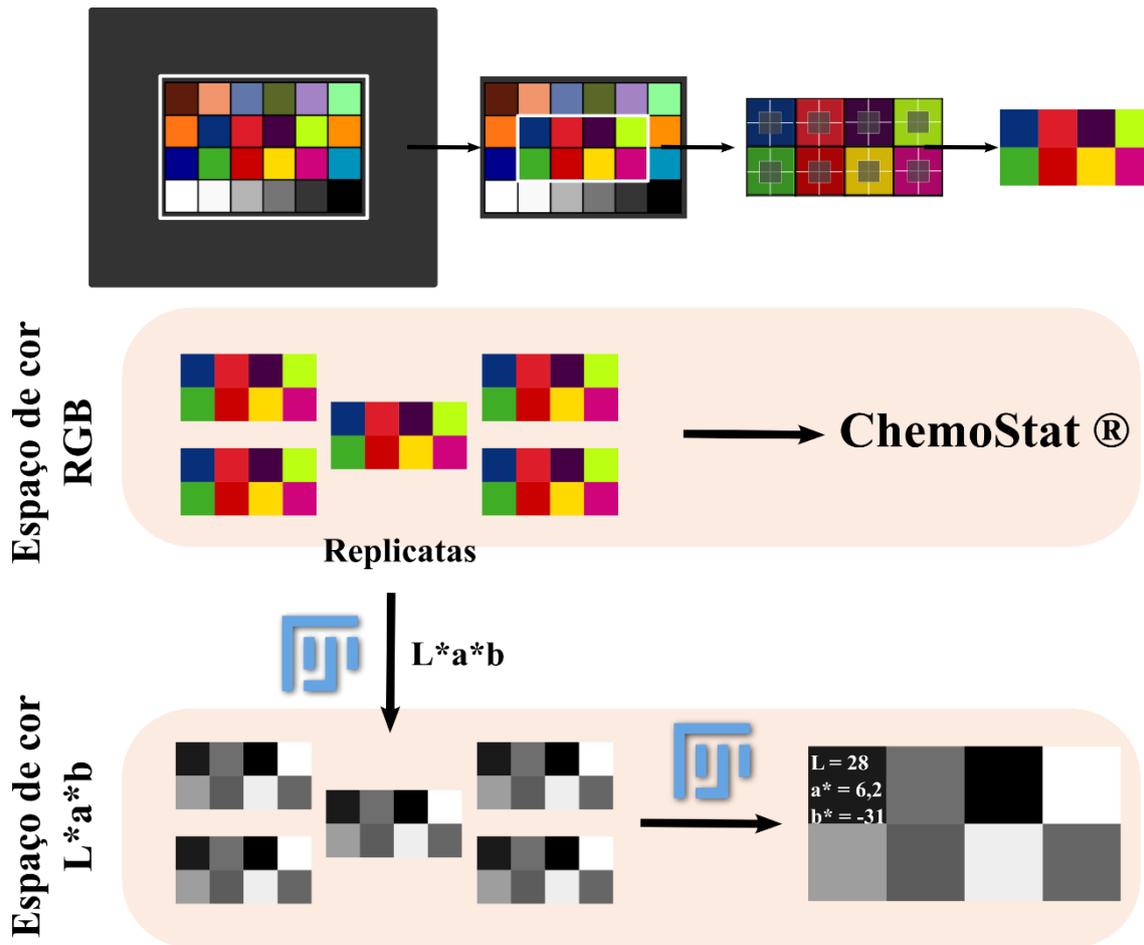
- i. Fonte de iluminação: VL49 RGB-Ulanzi (800 Lux/0,5 m; 6 W; ângulo de iluminação de 120 °) utilizada na temperatura de cor de 6500 K, simulando a cor média da luz do dia. A intensidade de brilho utilizada foi de 100 %;
- ii. Câmera: câmera embutida (48 MP) de *smartphone* Redmi Note 8 (Xiaomi);
- iii. Aplicativo de aquisição de imagem: Open Camera (PlayStore);
- iv. Parâmetros de aquisição de imagem: ISO 200, velocidade de obturador 1/200 s, distância focal de 0,5 m;

As imagens foram obtidas utilizando mini estúdio, em ambiente sem iluminação secundária, conforme ilustrado pela Figura 21.



**Figura 21. Ilustração das configurações utilizadas para aquisição das imagens em ambiente controlado.**

Desta forma, ao final do processo de aquisição de imagens, para cada grupo de lâmina (sem tratamento, com APTES 0,1 %, com APTES 2,0 %, e com 300 mg de eugenol-silano) 10 fotografias foram registradas. A fim de investigar variações na qualidade das imagens adquirida, a abordagem ilustrada na Figura 22 foi aplicada.



**Figura 22.** Ilustração das etapas estabelecidas para a amostragem das imagens utilizadas em análises de similaridade.

As imagens foram analisadas utilizando dois espaços de cor, RGB e Lab. O espaço de cor RGB opera em um sistema tridimensional composto pelos canais de cores vermelho (R, *red*), verde (G, *green*) e azul (B, *blue*). O espaço de cor Lab também utiliza três componentes para exprimir a mesma informação, porém utilizando os canais de luminância (L, *lightness*) e dois canais de cor, a\* e b\*, representando vermelho-verde e azul-amarelo, respectivamente.

Na abordagem utilizando o espaço de cor RGB as amostras foram submetidas à deconvolução dos canais RGB e HSL (hue, saturação e luminância), e à investigação das contribuições de cada componente no agrupamento ou separação das amostras, utilizando método de Análise de Componentes Principais (PCA), através do software ChemoStat ®. Em paralelo, as imagens RGB foram convertidas para o espaço de cor Lab, utilizando o software FIJI, onde foram submetidas à medição dos valores das componentes L, a\* e b\* (para cada região originalmente colorida), conforme Figura 22.

As análises no espaço de cor Lab foram feitas para investigar, por meio de uma segunda abordagem, a variabilidade das percepções de cor, conforme o tratamento na lâmina de vidro. Este parâmetro de variabilidade (ou similaridade) é descrito como  $\Delta E$ , e pode ser determinado através de Equação (1), a seguir.

$$\Delta E = \sqrt{(L_1 - L_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2} \quad (1),$$

ou seja,  $\Delta E$  representa a distância Euclidiana entre duas cores pertencentes ao espaço Lab, cujas posições neste espaço são determinadas pelos valores dos componentes **L**, **a\*** e **b\***. A partir de  $\Delta E$  os seguintes intervalos de percepção de cores são estabelecidos:

- $\Delta E < 1,0$  – Não é possível observar diferença entre as cores;
- $1,0 < \Delta E < 2,0$  – Com muita atenção é possível notar alguma diferença entre as cores;
- $2,0 < \Delta E < 3,5$  – Olhando rapidamente já é possível notar diferença entre as cores;
- $3,5 < \Delta E < 5,0$  – É possível notar uma grande diferença entre as cores;
- $\Delta E > 5,0$  – São cores totalmente diferentes

Por fim, a similaridade de cores foi investigada através de formulário de percepção, utilizando perguntas fechadas, realizado de forma online (Formulário em anexo; APÊNDICE C). O formulário foi dividido em duas seções: i) informações sobre características de quem está realizando o teste, e qual o dispositivo utilizado para isso; ii) 16 duplas de cores exibidas para análise. O formulário foi disponibilizado à comunidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através de secretarias de graduação e pós-graduação. A pesquisa obteve 159 respostas. Para seleção dos grupos avaliados, o formulário foi tratado através do software NVivo 14, para seleção de grupos com características de interesse. Inicialmente, o seguinte grupo (N = 33) de perfil foi selecionado: 18 a 40 anos; nenhuma especificidade visual; formulário respondido em *smartphone*. Após a seleção do grupo, as 33 respostas para cada par de imagens foram avaliadas.

## 5. Resultados e discussão

### 5.1. Testes de sensibilidade a antifúngicos

Conforme demonstrado na Tabela 6 a seguir, dentre os compostos investigados, eugenol, citral e extrato de plumieridina apresentaram atividade antifúngica, nas condições investigadas, frente ao fungo *A. niger*.

**Tabela 6.** Relação dos compostos utilizados durante experimentos de sensibilidade à antifúngicos e seus respectivos resultados.

Composto	CAA [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] <sup>a</sup>	Fator de inibição <sup>b</sup>	MIC [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] <sup>c</sup>
Ácido Láurico	N.O. <sup>d</sup>	0	N.O.
Ácido Octanóico	N.O.	0	N.O.
Catequina	N.O.	0	N.O.
Citral - Emulsão	-	-	625
Citral DMSO 1%	N.O.	0	N.O.
Clorimuron Etilico	N.O.	0	N.O.
Curcumina	12.5	3	N.O.
Eucaliptol - Emulsão	N.O.	0	N.O.
Eucaliptol DMSO 1%	N.O.	0	N.O.
Eugenol - Emulsão	-	-	312.5
Eugenol DMSO 1%	250	1	N.O.
Extrato de Plumieridina	-	-	2500
Nerolidol	N.O.	0	N.O.
Quitosana	N.O.	0	N.O.
<i>Trans</i> -cariofileno	N.O.	0	N.O.
$\beta$ - Cariofileno	N.O.	0	N.O.

a Concentração com Atividade Antifúngica;

b Fator de inibição de desenvolvimento fúngico – 0: sem inibição; 1: 25 % de inibição; 2: 50 % de inibição; 3: 75 % de inibição; 4: 100 % de inibição. Replicatas n = 4

c Concentração mínima inibitória (inibição completa)

d Não observado.

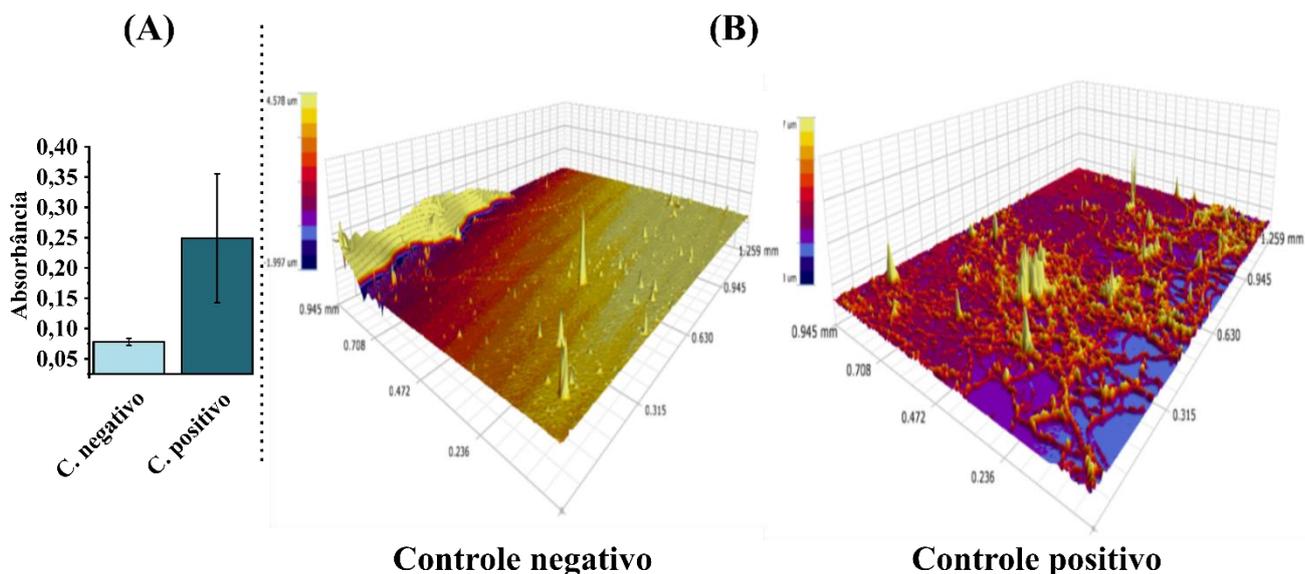
Dentre os compostos investigados houve aqueles que não apresentaram concentração mínima inibitória (MIC), porém apresentaram inibição parcial quando utilizados em uma concentração específica, aqui denominada de concentração mínima para atividade antifúngica (CAA), na qual não houve inibição total do desenvolvimento, porém houve alguma inibição, como o caso da curcumina, cuja atividade promoveu uma redução de 75 % no desenvolvimento do fungo. Todavia, por enquanto, apenas aqueles

compostos que apresentaram MIC foram selecionados para investigação em experimentos de inibição de formação de biofilme.

Dentre os compostos com atividade antifúngica estão eugenol e citral. De acordo com a literatura, o óleo essencial de cravo-da-índia, que contém elevada concentração de eugenol, tem efeito antifúngico em *A. niger* devido à possibilidade de interação com bicamada fosfolipídica, e conseqüente alterações na membrana citoplasmática, como aumento da permeabilidade, levando ao extravasamento do conteúdo celular <sup>85</sup>. O mesmo mecanismo tem sido associado à ação antifúngica de eugenol contra *Botrytis cinerea* <sup>86</sup>. A possibilidade de alterações na membrana celular fúngica também tem sido proposta como mecanismo de ação contra *Trichophyton rubrum* em estudo que apresenta o potencial inibitório da biossíntese de ergosterol, constituinte importante das membranas celulares <sup>87</sup>, devido à exposição a eugenol. Em *Candida albicans*, o efeito antifúngico de eugenol vem sendo associado à sua conversão à derivados de quinona mediada pelo citocromo P-450, devido sua interferência nos níveis intracelulares de glutathiona e outras características citotóxicas <sup>88</sup>. Tratando-se do citral, uma das propostas de mecanismo de ação contra *A. niger* é baseada na oxidação induzida por espécies radicalares, promovendo a peroxidação dos lipídios que constituem a membrana celular <sup>89</sup>. Além disso, seu mecanismo de ação contra *Zygisaccharomyces rouxii* <sup>90</sup> também tem sido associado a danos na membrana celular, acarretando no extravasamento do conteúdo intracelular.

## **5.2. Inibição de biofilme**

Como primeiro passo, para garantir a continuidade dos experimentos, a aplicabilidade do protocolo de formação de biofilme foi investigada, a fim de verificar a capacidade de *A. niger* produzir tal estrutura sob as condições de trabalho. A Figura 23 apresenta resultados de duas abordagens empregadas para verificar a aplicabilidade do protocolo proposto: (A) coloração de biomassa fúngica desenvolvida sobre lamínulas de vidro; (B) mapeamento topográfico de tais estruturas pela técnica de perfilometria óptica 3D.

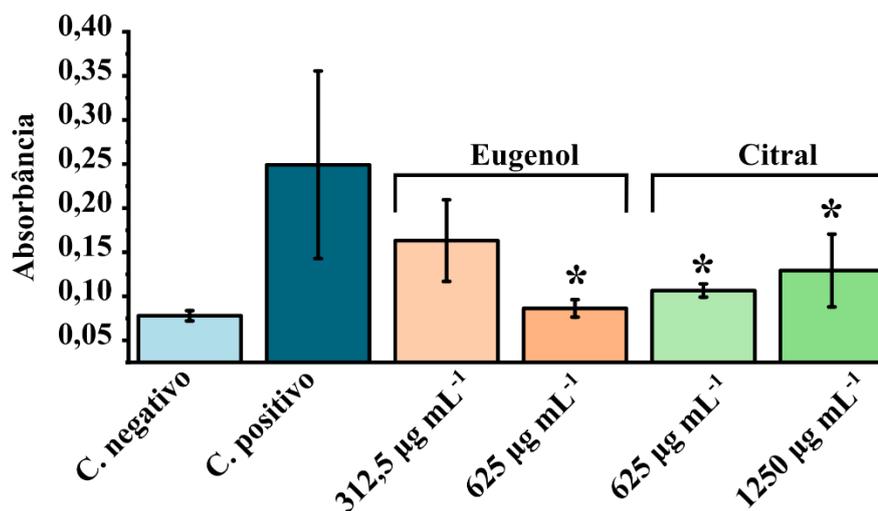


**Figura 23. Indicativos experimentais de formação de estruturas possivelmente associadas à presença de biofilme, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorbância sob o comprimento de onda de 600 nm (A) e visualização através da técnica de Perfilometria Óptica (B). Replicatas N = 4**

Através das técnicas empregadas, foi possível verificar a existência de estruturas possivelmente relacionadas a biofilme. Frente aos indícios de formação de biofilme aliados aos conhecimentos pré-estabelecidos em literatura <sup>68</sup>, este protocolo foi escolhido para executar os experimentos de inibição de biofilme. Para tal, os experimentos foram desenvolvidos conforme protocolo detalhado na Seção 4.5.

### 5.2.1. Inibição de biofilme com antifúngicos em solução

A partir dos testes de sensibilidade, os compostos capazes de inibir completamente o desenvolvimento do fungo modelo foram selecionados, e submetidos aos experimentos de inibição de formação de biofilme, conforme protocolos descritos na Seção 4.5. A Figura 24, representa os resultados dos experimentos realizados para verificar a capacidade dos compostos eugenol e citral em inibir a formação de biofilme de *A. niger*.



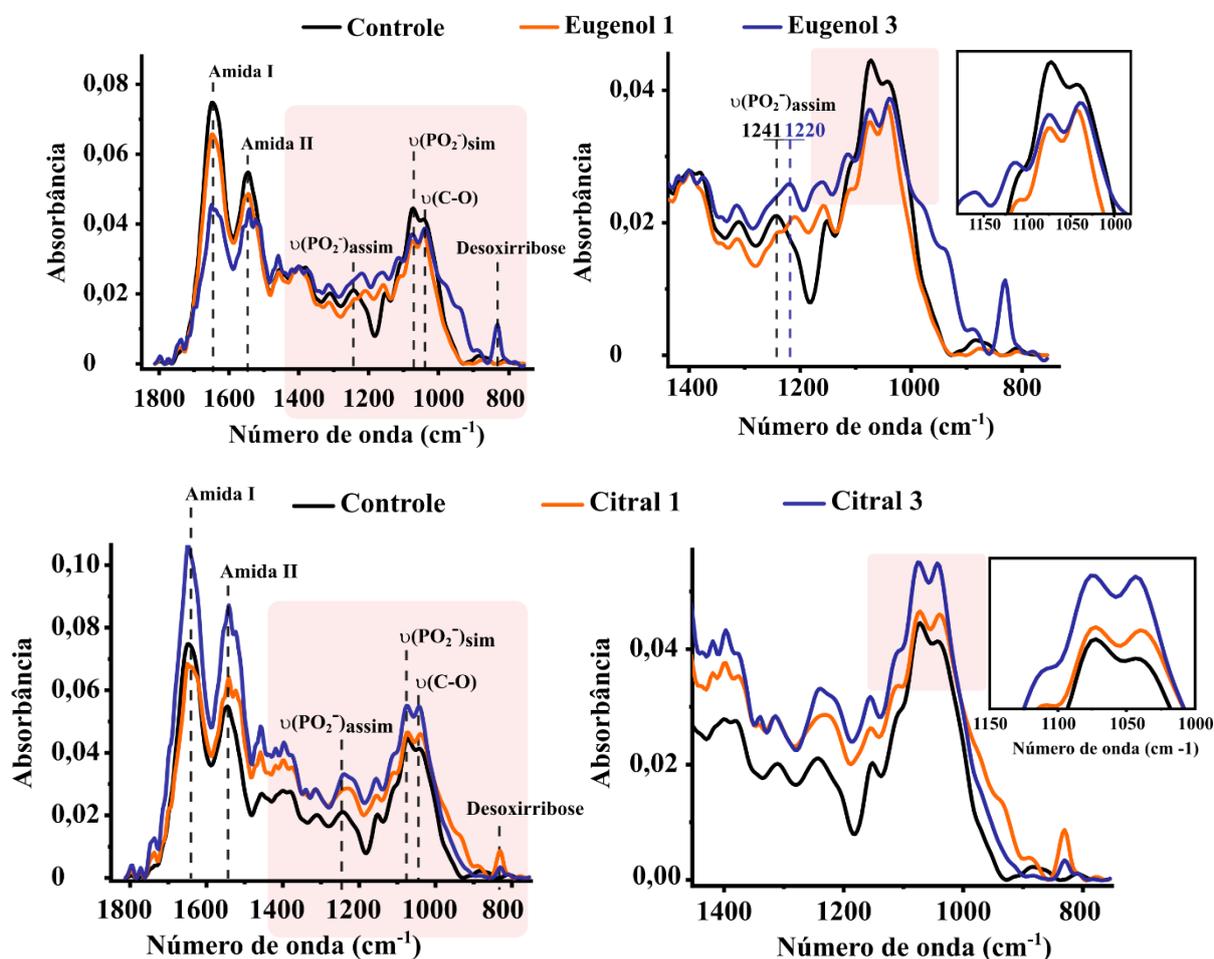
**Figura 24.** Resultados de experimento de inibição de biofilme utilizando eugenol e citral em solução, nas concentrações equivalentes a 1 e 2 vezes os valores de MIC determinados em testes de sensibilidade, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorbância sob o comprimento de onda de 600 nm. Replicatas N = 4. Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle negativo \* (p < 0,05). Teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Dentre os compostos selecionados, apenas o extrato de plumieridina não pode ser testado, porém os demais (eugenol e citral) apresentaram potencial à inibição de formação de biofilme quando utilizados em solução. Um ponto bastante interessante para considerar é o fato de que não houve crescimento de biomassa sobre as lamínulas, porém houve intenso desenvolvimento do fungo em suspensão, indicando que, nas condições investigadas, possivelmente os compostos apresentem efeito antiadesivo, mas não fungicida. Esta ação pode estar associada à capacidade de inibição da germinação dos conídios<sup>87</sup>.

### 5.3. Efeitos de eugenol e citral em hifas de *Aspergillus niger*

Cada uma das três replicatas de amostra de hifas do fungo *A. niger*, desenvolvidas sobre substrato de silício recoberto com ouro, foi analisada por microespectroscopia de absorção na região do infravermelho, em cinco regiões distintas, gerando para cada amostra 15 espectros na faixa de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Estes espectros foram combinados, gerando um espectro resultante. Este procedimento foi realizado

para as amostras Controle, Eugenol 1 (exposição a  $19,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Eugenol 3 (exposição a  $78 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Citral 1 (exposição a  $39 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e Citral 3 (exposição a  $156 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os espectros estão representados na Figura 25.



**Figura 25.** Espectros adquiridos por análises de micro-FTIR, em modo Refletância em reflexão de ponto único, realizadas em hifas de *A. niger* desenvolvidas sobre substrato de silício recoberto com filme fino de ouro. Na parte superior estão os espectros de hifas desenvolvidas na presença de eugenol, enquanto na parte inferior estão os dados referentes àquelas cultivadas na presença de citral. Condições de análise: modo reflectância; magnificação de 15 vezes; resolução de  $8 \text{ cm}^{-1}$ ; 512 scans; detector MCT. Integração dos sinais para determinação da razão Amida I/Amida II, a partir de deconvolução dos sinais na faixa de  $1730 \text{ cm}^{-1}$  a  $1480 \text{ cm}^{-1}$ , com picos centrados em aproximadamente  $1640 \text{ cm}^{-1}$  e  $1540 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídos a Amida I e II, respectivamente.

Através do espectro de infravermelho na região de  $1850\text{-}750 \text{ cm}^{-1}$ , é possível identificar a presença de alguns sinais usualmente investigados em sistemas biológicos.

Entre 1800 e 1450  $\text{cm}^{-1}$  é possível verificar dois sinais de maior intensidade, definidos como Amida I e Amida II <sup>91</sup>. Estes sinais possibilitam a investigação de estruturas secundárias de proteínas, e polipeptídeos <sup>92</sup>. A banda Amida I pode ser atribuída ao estiramento C=O dos grupos amida, enquanto Amida II à combinação do estiramento C-N (do esqueleto peptídico) e da deformação angular da ligação (C)-N-H (dos grupos peptídicos) <sup>93,94</sup>. Através de análises sobre o comportamento destes sinais, podem-se obter informações sobre mudanças conformacionais das proteínas <sup>94-97</sup>. Entre as possibilidades de análise, está a razão entre os sinais, cuja modificação após interação com algum agente externo, pode indicar mudanças conformacionais do conteúdo proteico <sup>91,97</sup>. Na região compreendida entre 1450 e 750  $\text{cm}^{-1}$  é possível obter informações sobre a organização das estruturas de cadeia do DNA <sup>94</sup>.

Através da Figura 25 é possível verificar os perfis de absorção associados ao fungo *A. niger* cultivado na ausência (controle) e na presença de eugenol (superior) e citral (inferior). Na Figura 25 é possível identificar a diminuição da razão Amida I/Amida II, revelando mudanças conformacionais causadas pela exposição do microrganismo a eugenol. A partir da deconvolução das bandas, na faixa de 1730  $\text{cm}^{-1}$  a 1480  $\text{cm}^{-1}$ , com picos centrados em aproximadamente 1640  $\text{cm}^{-1}$  e 1540  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos a Amida I e II, respectivamente, é possível verificar a diminuição da razão Amida I/Amida II, que varia de  $1,9 \pm 0,1$  (unidade de área) para o controle positivo, a  $1,4 \pm 0,2$  (unidade de área) para as amostras expostas a 156  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de eugenol. Além disso, o deslocamento do sinal atribuído ao estiramento assimétrico de grupos fosfatos ( $\nu_{\text{assim.}}(\text{PO}_2^-)$ ) de 1241 para 1220  $\text{cm}^{-1}$  (considerando resolução espectral igual a 8  $\text{cm}^{-1}$ ), ratifica a presença de mudanças conformacionais no DNA (A-DNA para B-DNA) <sup>94,98-101</sup>. A inversão das intensidades relativas aos sinais em 1072 e 1043  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídos ao estiramento simétrico O-P-(O) ( $\nu_{\text{sim.}}(\text{PO}_2^-)$ ) e ao estiramento C-O ( $\nu(\text{C-O})$ ), respectivamente, pode indicar danos na estrutura do DNA <sup>94,96,102</sup>. Por fim, o surgimento do pico a 830  $\text{cm}^{-1}$  pode estar associado à transição para conformação B-DNA <sup>103</sup>. Além disso, na Figura 25 é possível verificar alterações similares às aquelas ocorridas frente ao tratamento com eugenol, porém, a exposição ao citral, a princípio, ocasiona mudanças conformacionais mais brandas, ainda que de mesma natureza. Isto se torna mais evidente ao observar o menor deslocamento do sinal atribuído ao estiramento assimétrico de grupos fosfatos (1241  $\text{cm}^{-1}$ ), assim como a existência da alteração nas

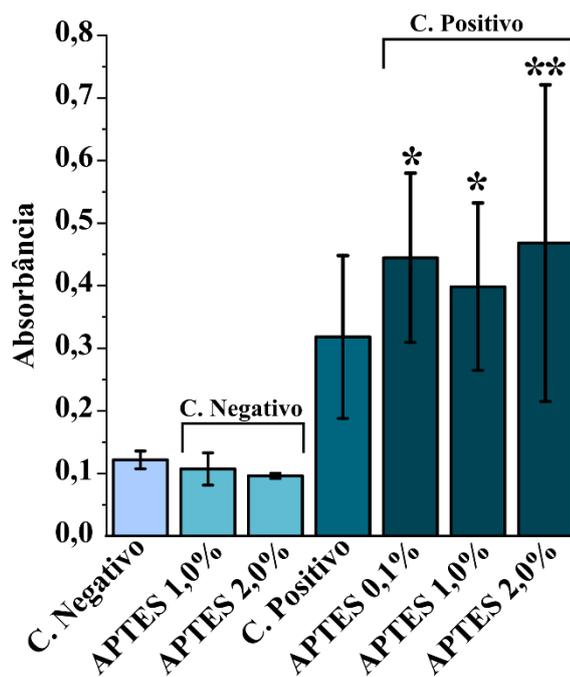
intensidades relativas aos sinais em 1072 e 1043  $\text{cm}^{-1}$ , embora não haja inversão das mesmas, como observado para eugenol.

Estas observações estão em acordo com estudos sobre mecanismos de ação de citral, eugenol e derivados, em sistemas biológicos, nos quais a indução de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) <sup>104-106</sup> estaria relacionada a diferentes danos celulares, incluindo fragmentações do DNA <sup>107,108</sup>

## **5.4. Inibição de adesão através de filme fino**

### *5.4.1. Síntese de recobrimento em solução e atividade antibiofilme*

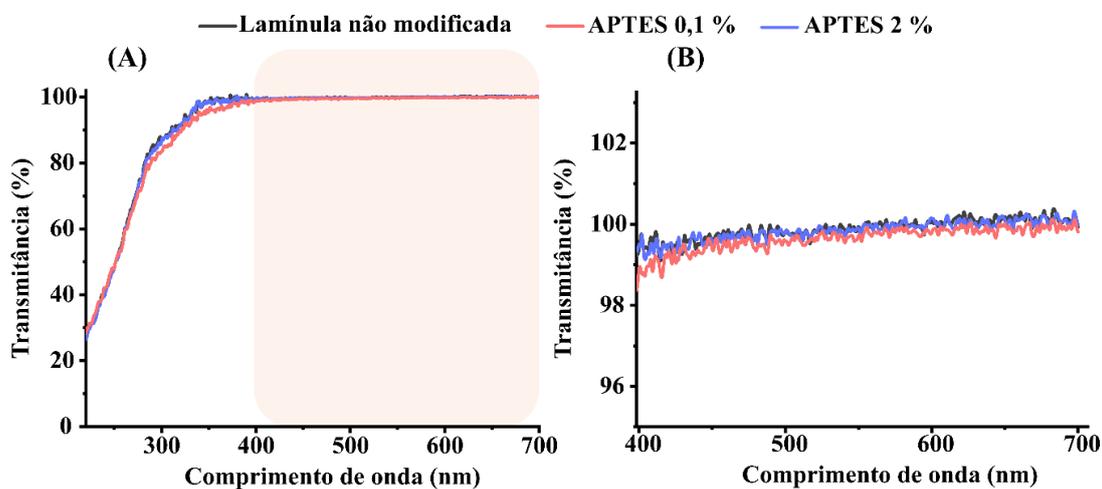
Conforme detalhado na Seção 4.7, a modificação das superfícies das lamínulas, para síntese de filmes finos com propriedade antibiofilme, tem como ponto inicial a formação de um recobrimento reativo, baseado em APTES, sobre as lamínulas. Porém, devido à espessura deste filme que, pode variar de estruturas monolamelar a estruturas com poucas dezenas de nanômetros, técnicas químicas de análise direta, como por exemplo espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, não apresentam sensibilidade para a detecção dos compostos envolvidos. Pensando nisso, buscaram-se abordagens distintas para investigar a presença dos filmes finos propostos. Como primeira abordagem, as lamínulas contendo o suposto filme de APTES foram submetidas aos experimentos de crescimento de biofilme, para verificar se haveria efeito inibitório sobre o desenvolvimento do fungo. Os resultados observados nessa abordagem estão dispostos na Figura 26.



**Figura 26.** Resultados de experimento de inibição de biofilme sobre lamínulas modificadas utilizando diferentes concentrações de organosilano APTES, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorbância sob o comprimento de onda de 600 nm. Replicatas N = 4. Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle positivo \* ( $p < 0,05$ ) e \*\* ( $p < 0,001$ ). Teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

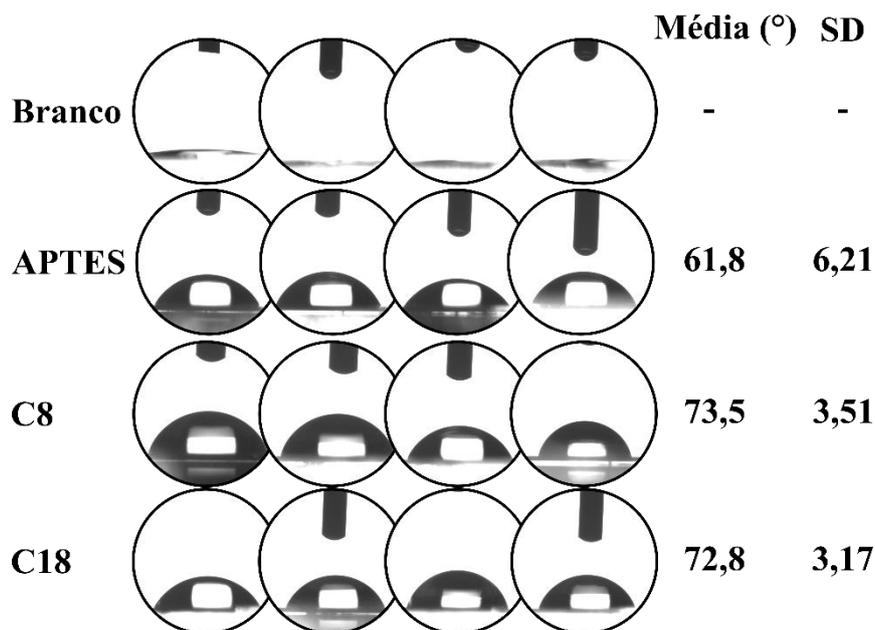
Conforme Figura 26, não foi identificada inibição no desenvolvimento do biofilme sobre lamínulas modificadas com diferentes concentrações de APTES. É importante salientar que a concentração de APTES aplicada como padrão nos protocolos de modificação das lamínulas foi de 0,1 % (v/v), porém concentrações maiores (10 e 20 vezes) foram utilizadas para verificar algum efeito inibitório. No entanto, a partir da concentração de APTES igual a 1,0 % (v/v) foi observada a formação (ao que tudo indica) de estruturas aglomeradas, com crescimento desordenado, sobre as superfícies das lamínulas, o que pode ser identificado na forma de manchas esbranquiçadas ao longo do vidro. Esta observação pode ser relacionada a polimerizações horizontais e não-orientadas, levando ao crescimento de estruturas tridimensionais sobre as lamínulas, devido ao excesso de organosilano, promovendo estruturas muito maiores e mais espessas do que o filme monocamada inicialmente proposto <sup>72</sup>. Este problema pode ser minimizado, porém não evitado, ao submeter as lamínulas a banho ultrassom (usando tolueno ou etanol como solvente de imersão) por alguns minutos. De acordo com as análises de transmitância realizadas por

espectroscopia UV-Vis (Figura 27), a modificação das lamínulas com diferentes concentrações de APTES não promoveu perdas na transparência do material quando comparadas com lamínulas não modificadas, na faixa de 400 a 700 nm.



**Figura 27. Espectros de transmitância para lamínulas não modificadas e modificadas com APTES 0,1 % e 2 % na faixa espectral de 200 a 700 nm (A). (B) amplificação do perfil de transmitância das lamínulas na faixa de 400 a 700 nm.**

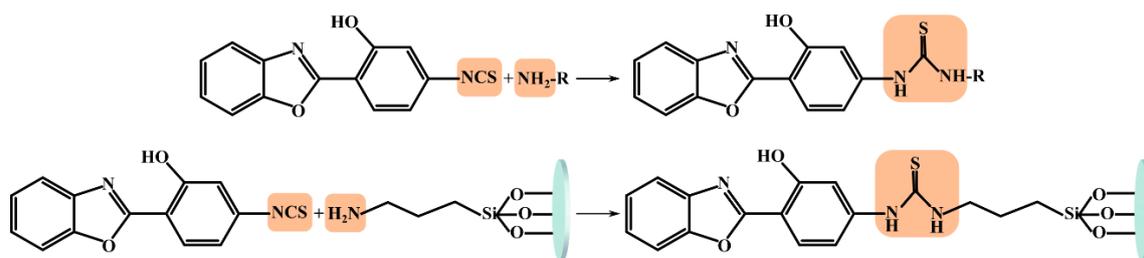
Outra abordagem pensada para verificar a ocorrência da modificação foi a medida de hidrofobicidade através da técnica de ângulo de contato pelo método de gota sésil. Inicialmente seria feita apenas a comparação entre lamínulas não modificadas e aquelas modificadas com APTES, porém devido à possibilidade de que as medidas fossem similares, pela característica de fraca hidrofobicidade de ambos os materiais, mesmo protocolo de modificação foi aplicado para organosilanos com características mais hidrofóbicas, como C8 e C18. Os resultados das medidas e dos ângulos estão representados na Figura 28.



**Figura 28.** Medidas de molhabilidade através da técnica de ângulo de contato pelo método de gota séssil, realizadas sobre a superfície de lamínulas sem modificação e modificadas com APTES, C8 e C18. Replicatas para Branco N = 12; demais replicatas N = 4.

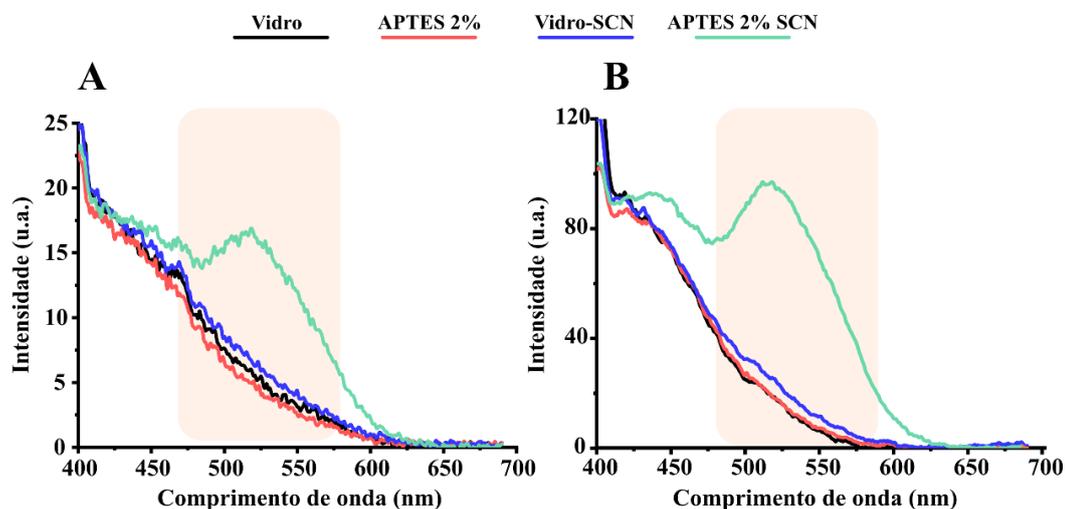
A partir das medidas de molhabilidade é possível inferir que através do protocolo de modificação superfície houve mudanças na superfície das lamínulas a ponto de detectar variações em suas hidrofobicidades, porém como a técnica não apresenta resolução química, não há como garantir a presença dos filmes finos propostos. Todavia, é interessante avaliar que a hidrofobicidade aumenta conforme o aumento da cadeia alifática do organosilano empregado, ainda que não haja diferença expressiva entre as medidas para C8 e C18, o que pode estar associado à degradação do organosilano C18, visto sua alta reatividade por ser um organosilano halogenado modificado com um grupo cloro.

Pensando na falta de resolução química da abordagem anterior, ainda que altamente sensível a mudanças na superfície, decidiu-se investigar a presença e a reatividade dos grupos APTES através de sinalização com marcador fluorescente. Para isso, a molécula 2-(4'-isotiocianato-2'-hidroxifenil)benzoxazol foi utilizada como sinalizador, conforme protocolo detalhado na Seção 4.8.2, devido à presença do grupo funcional isotiocianato, recorrente em marcadores de proteínas, pela facilidade em reagir com aminas primárias (R-NH<sub>2</sub>)<sup>75,76</sup>, conforme Figura 27.



**Figura 29.** Ilustração de reações entre o composto utilizado com sinalizador e: (superior) uma amina primária com grupo substituinte R; (inferior) grupo amina presente na molécula do organosilano APTES, presente na superfície de lamínulas modificadas. Em ambos os cenários se almeja a formação da ligação tioureia.

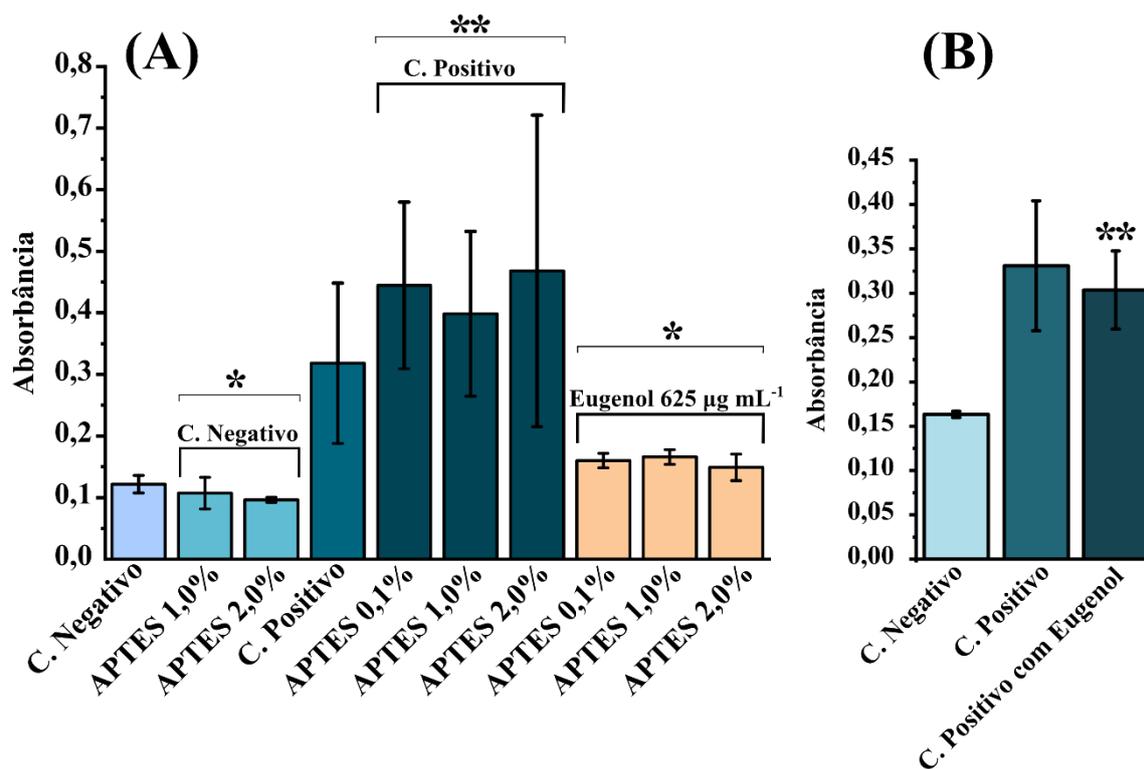
Conforme Figura 29, a verificação de fluorescência estaria condicionada à existência do filme de APTES sobre a lamínula, devido ao fato deste ser o responsável pela distribuição de grupos amino. Porém, a fim de verificar se interações vidro-sinalizador seriam suficientes para a retenção do composto junto à superfície da lamínula, estas foram limpas, ativadas e expostas ao marcador. Além disso, lamínulas sem nenhuma modificação química, e outras contendo apenas a modificação com APTES 2%, foram submetidas às medidas de fluorescência. Os resultados destas medidas estão representados pela Figura 30.



**Figura 30.** Espectros de fluorescência obtidos para as amostras de lamínulas, com e sem modificação, na faixa de 400 a 700 nm. A aquisição dos sinais foi feita utilizando fendas de excitação/emissão iguais a (A) 1,5 nm / 5,0 nm e (B) 5,0 nm / 5,0nm, respectivamente. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 365 nm para ambas as configurações. As amostras foram analisadas em quadruplicata.

Através das investigações por espectroscopia de fluorescência em estado sólido (Figura 30), é possível verificar o perfil de emissão, com máximo em 526 nm, atribuído ao composto utilizado como sinalizador, em lamínulas modificadas com APTES 2%, expostas à solução do marcador. Para as demais amostras não se observa este sinal, mesmo para lamínulas sem modificação com APTES expostas ao marcador, indicando que, possivelmente, apenas grupos funcionais presentes no vidro, como silanóis (Si-OH), não são suficientes para o ancoramento do sinalizador. Desta forma, é possível inferir sobre a necessidade do filme de APTES para a fixação do sinalizador e, conseqüentemente, sobre a existência do mesmo. Além disso, outro aspecto importante identificado através destes resultados é a grande separação entre o máximo de absorção (365 nm) e o máximo de emissão (526 nm) para o composto utilizado como sinalizador, denominada de deslocamento Stokes <sup>109</sup>. Este comportamento se mostra coerente à natureza da molécula utilizada como sinalizadora, uma vez que a mesma apresenta processos de relaxação envolvendo transferência protônica intramolecular em estado excitado (*ESIPT*) <sup>76,110,111</sup>.

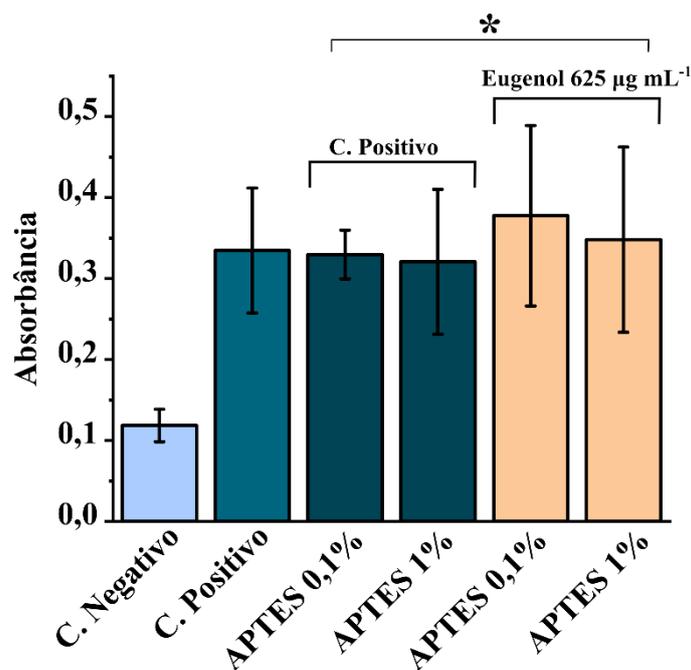
Outro indicativo de que a síntese do recobrimento ocorreu é exatamente sua aplicabilidade na inibição de formação de biofilme sobre as lamínulas modificadas. A Figura 31 apresenta os valores de absorbância do corante Cristal Violeta aderido à biomassa que se desenvolveu sobre as lamínulas.



**Figura 31.** Inibição de formação de biofilme sobre lamínulas modificadas com filme fino a base de eugenol. (A) capacidade de inibição de biofilme pelo recobrimento utilizando diferentes concentrações de APTES; (B) indicativo de desenvolvimento de biofilme sobre lamínulas contendo apenas eugenol, sem modificação prévia com APTES, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorbância sob o comprimento de onda de 600 nm. Replicatas N = 4. Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle negativo \* ( $p < 0,05$ ). Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle positivo \*\* ( $p < 0,05$ ) Teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

Conforme resultados de experimentos de inibição de biofilme por filme fino, o protocolo aplicado apresenta capacidade de impedir o desenvolvimento de biomassa fúngica sobre as superfícies das lamínulas, mesmo para concentrações menores de APTES. Além disso, é possível verificar na Figura 31B que apenas a modificação com eugenol ( $625 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) não foi o suficiente para inibir a formação de biofilme, indicando a importância da primeira camada de APTES sobre o vidro, possivelmente atuando como ponto de retenção às moléculas de eugenol e, por consequência, indicando a presença desta camada.

Por fim, outra maneira de verificar a aplicabilidade deste protocolo, para o uso ao qual se destina, foi realizar a modificação da superfície das lamínulas com APTES em outro solvente e, para isso, foi utilizado metanol, mantendo a segunda modificação (o tratamento com eugenol) em tolueno seco. Os resultados de inibição de adesão celular obtidos para os substratos modificados nessas condições experimentais estão representados na Figura 32.



**Figura 32.** Resultados do teste de inibição de biofilme sobre lamínulas modificadas, utilizando metanol como solvente para reação de silanização de superfície com APTES 0,1 e 1%, através de testes de coloração de biomassa por Cristal Violeta, com determinação de absorbância sob o comprimento de onda de 600 nm. Replicatas N = 4. Ausência de diferença estatística em comparação ao grupo controle positivo \* ( $p < 0,05$ ). Teste one-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey.

De acordo com os resultados expostos pela Figura 32, a modificação das lamínulas com APTES é, conforme esperado, sensível ao meio reacional e, além disso, ao alterar esta primeira etapa de modificação, o filme fino final (suspostamente contendo eugenol) não apresenta atividade antibiofilme. É possível relacionar estas observações com as características do filme de APTES formado, pois há indicativos de que, na presença de água (neste caso, proveniente do solvente), os grupos amino podem interagir diretamente com a superfície do vidro, tornando-os menos acessíveis,

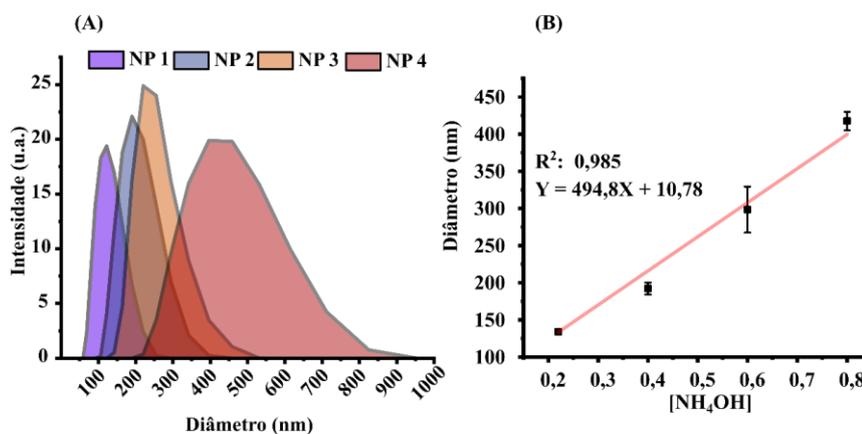
produzindo um filme menos reativos <sup>72</sup> e, portanto, com menor interação com as moléculas de eugenol.

## 5.5. Inibição de biofilme através de recobrimentos multifuncionais

Como alternativa às limitações dos filmes finos, principalmente quanto a sua baixa estabilidade à água e, possivelmente à umidade, foi proposto o desenvolvimento de filmes nanoestruturados, compostos de nanopartículas de sílica contendo eugenol. Para isso, o primeiro passo para tornar esta alternativa factível é a síntese das nanopartículas e, para isso, o método de Stöber <sup>62</sup> foi selecionado.

### 5.5.1. Síntese de nanopartículas de sílica através de método de Stöber

O primeiro ponto investigado, referente ao protocolo de síntese, foi a influência da concentração do catalisador sobre o tamanho das partículas produzidas, conforme Figura 33.

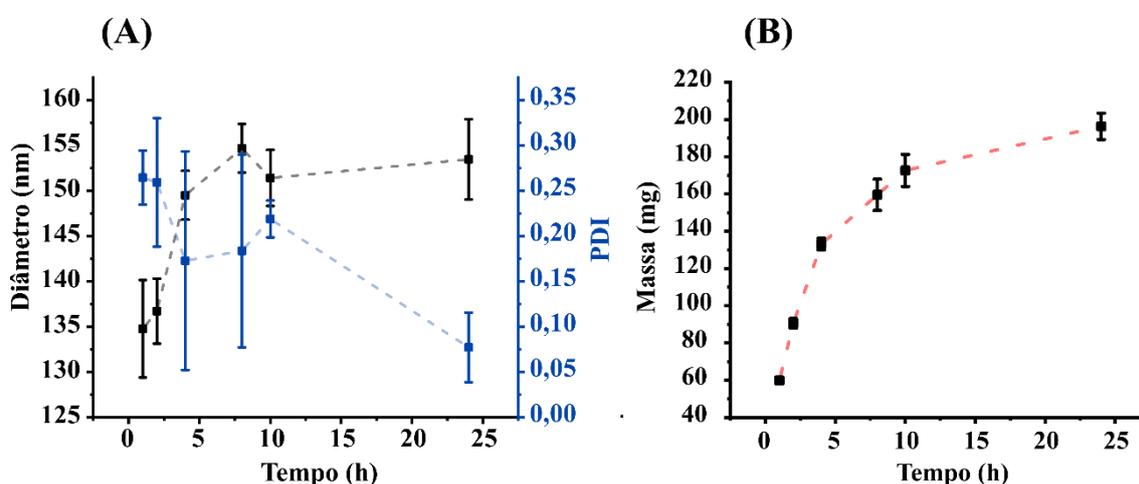


**Figura 33. Perfil das distribuições de diâmetros de partículas (A) obtidas sob diferentes concentrações de catalisador, e a relação linear existente entre estes parâmetros (B). Replicatas N = 3.**

A partir dos resultados do primeiro estudo sobre a síntese das nanopartículas é possível identificar a influência da concentração de catalisador sobre o tamanho das mesmas, em acordo com dados dispostos em literatura <sup>62,80,83,112-118</sup>. Nestas condições reacionais e no intervalo de concentrações investigado, uma relação linear entre estes parâmetros foi identificada, o que pode ser observado por outros grupos de pesquisa

62,118–121. Isto se torna mais interessante quando há a necessidade de tamanhos específicos de partículas, o que pode ser estimado, nestas condições experimentais, através da equação do ajuste linear. Porém, é importante ter em mente que este comportamento linear se dá para intervalos e condições limitadas e, ao analisar um intervalo grande de concentrações, é possível identificar relações não-lineares 62,114,119,121.

Dentre as condições investigadas, a condição NP1 foi selecionada, para verificar a influência do tempo de síntese sobre o tamanho das partículas, pois apresentou o menor valor de diâmetro de partículas ( $134,1 \pm 1,7$  nm). Neste experimento, a reação NP1 foi monitorada ao longo de 24 horas, quanto ao diâmetro, polidispersão e massa das partículas produzidas, conforme Figura 34.



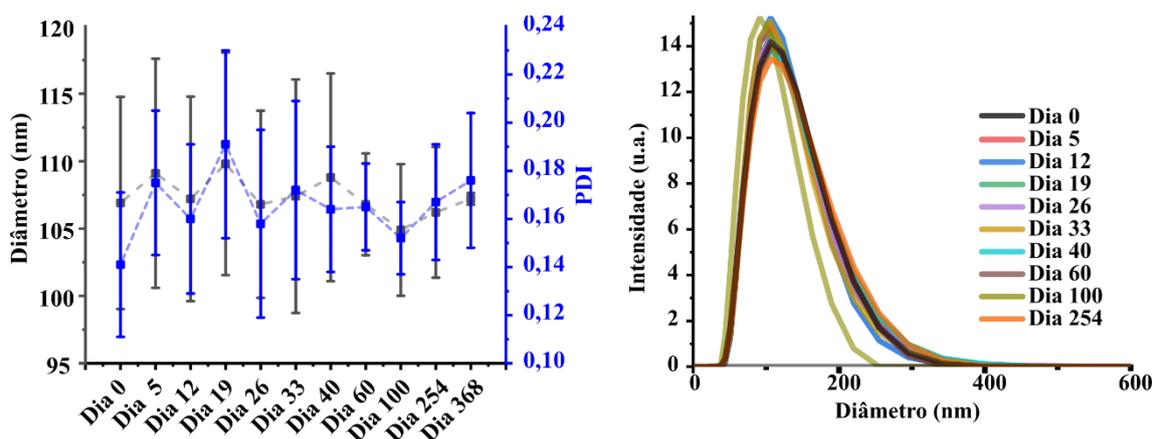
**Figura 34.** Verificação da variação de tamanho, polidispersão e massa das partículas de sílicas sintetizadas através do método de Stöber sob diferentes tempos reacionais. Replicatas  $N = 3$ . (Concentração de TEOS:  $0,28 \text{ mol L}^{-1}$ ; Concentração de água:  $6,0 \text{ mol L}^{-1}$ ; Concentração de  $\text{NH}_3$  (a partir de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ):  $0,21 \text{ mol L}^{-1}$ ; Solvente: etanol absoluto).

Conforme apresentado na Figura 34, o tempo de síntese parece ter grande influência sobre as três propriedades investigadas. A curva de crescimento das partículas ao longo do tempo indica que a partir de 4 horas de síntese o tamanho das partículas se torna constante, enquanto nas primeiras horas é possível identificar as maiores variações no tamanho. Essas observações podem ser explicadas pelo fato de os processos de agregação ocorrerem mais rapidamente entre partículas menores, ou entre uma partícula menor e outra maior, levando ao aumento do tamanho das partículas

resultantes, de forma acelerada <sup>112-114,122</sup>. Após determinado tempo de síntese, as partículas menores já foram consumidas e, por isso, o crescimento se torna mais lento, até ser minimizado quando o sistema alcança um tamanho específico denominado diâmetro crítico <sup>123</sup>. Além disso, é possível observar a diminuição do índice de polidispersão ao longo do tempo de síntese, o que pode ser associado à diminuição da reatividade das partículas conforme as mesmas se tornam maiores. Esta tendência pode ser associada à possibilidade de que as partículas menores estejam envolvidas em processos de homoagregação (partícula menor-partícula menor) e/ou heteroagregação (partícula menor-partícula maior) e, desta forma, produzam populações de partículas com diferentes distribuições de tamanhos, ou seja, com maior polidispersão. Por outro lado, após períodos mais longos de síntese, as partículas resultantes apresentam maior estabilidade coloidal, sendo menos propensas a eventos de homoagregação, tendendo a apresentar crescimentos associados, majoritariamente, à incorporação de partículas menores e/ou espécies solúveis <sup>114,123,124</sup>. Além disso, como é possível observar, a massa das partículas continua aumentando ao longo do tempo, mesmo quando o tamanho se torna constante. Isso pode estar relacionado ao fato de a concentração dos monômeros hidrolisados diminuir a ponto de não promover mais eventos de nucleação (que originam as partículas primárias ou núcleos) e, então, essas espécies passam a ser consumidas durante o processo de densificação das redes de sílica, levando ao aumento da massa e densidade do material <sup>118,125</sup>.

Na tentativa de reduzir os tamanhos das partículas para aproximadamente 100 nm, o tempo de uma hora foi selecionado e, nesta condição, menores concentrações de catalisador foram testadas (0,002 a 0,16 mol L<sup>-1</sup> de NH<sub>3</sub>, a partir de NH<sub>4</sub>OH; condições NP5 e NP10, respectivamente). Conforme análise de espalhamento de luz dinâmico, entre tais condições apenas a NP10 apresentou formação de partículas após o tempo de uma hora (106,9 ± 7,9 nm; PDI = 0,141), enquanto sob as demais condições nenhuma partícula foi observada, mesmo após 120 horas de síntese. Estas observações podem estar relacionadas com a concentração crítica de catalisador, abaixo da qual não há formação de partículas, pois a hidrólise do TEOS é desfavorecida e, portanto, a concentração de monômero hidrolisada necessária para iniciar o evento de nucleação não é alcançada e, desta forma, os núcleos que originam as partículas não são produzidos. Até o momento, através da condição NP10 1h, nanopartículas (~100 nm) puderam ser obtidas e, por isso, esta condição foi estabelecida como a ideal à finalidade

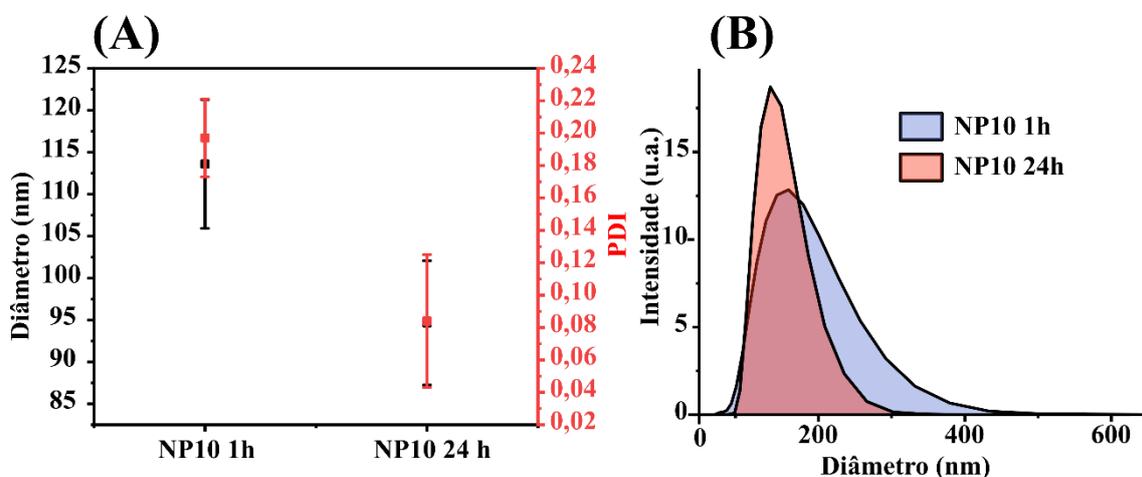
desta tese. No entanto, inicialmente as partículas precisariam ser submetidas a testes em meio aquoso e, para tanto, seria necessário que as mesmas apresentassem estabilidade no meio. Para investigar esta estabilidade, as partículas NP10 1h foram mantidas em suspensão em 1 mL de água e medidas de diâmetro e polidispersão foram realizadas periodicamente, por aproximadamente um ano, conforme Figura 35.



**Figura 35.** (A) Monitoramento de diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão e (B) curvas de distribuição de diâmetros das nanopartículas, mantidas na forma de suspensão em água ultrapurificada, ao longo de 368 anos. Replicatas  $N = 3$ . Condições de síntese  $[\text{TEOS}] = 0,28 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{H}_2\text{O}] = 6,0 \text{ mol L}^{-1}$ ;  $[\text{NH}_3, \text{NH}_4\text{OH}] = 0,16 \text{ mol L}^{-1}$ ; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 1 hora.

De acordo com os resultados dos experimentos de estabilidade, não foram identificadas variações significativas sobre o tamanho e/ou PDI ao longo do período investigado. Essa característica do sistema torna possível a manutenção das partículas em suspensão, evitando a necessidade de etapas de secagem, que apresentam grandes complicações a este tipo de sistema, principalmente no que diz respeito à prevenção de agregação e aglomeração das partículas, o que impede a recuperação das nanopartículas e suas propriedades (tamanho e PDI) quando ressuspensas para uso. No entanto, duas informações eram muito importantes para a demanda deste trabalho: (i) concentração de nanopartículas; (ii) concentração de encapsulado. Pensando nisso, formas de aumentar o rendimento da síntese — idealmente, mantendo o tamanho das nanopartículas — e de obter o material na forma sólida, evitando ou inibindo processos de agregação e aglomeração, foram investigadas. No que diz respeito ao aumento da massa produzida, a abordagem mais simples e conhecida é aumentar o tempo de síntese, porém, conforme

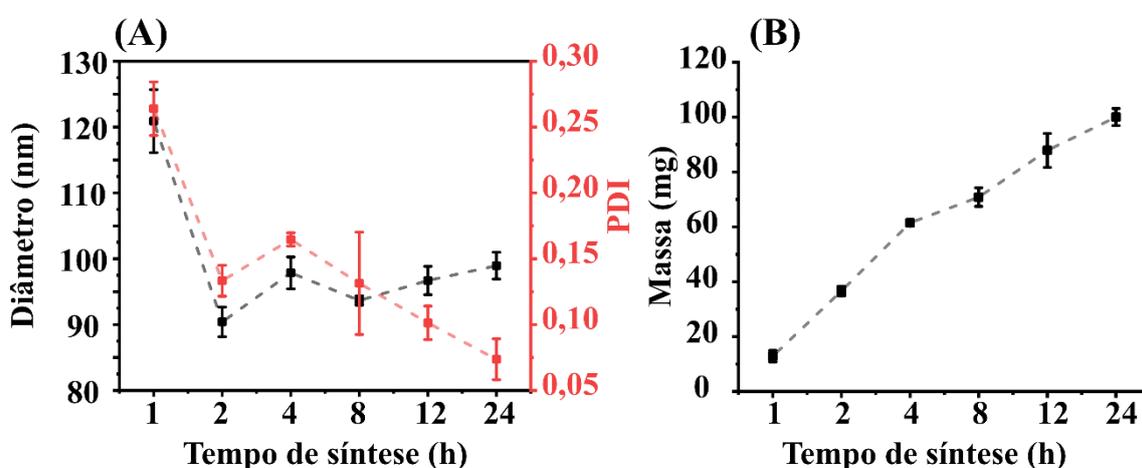
verificado na Figura 35, podem ocorrer variações no tamanho. Para investigar esta possibilidade, os resultados da síntese de NP10 por 1 e 24 horas foram comparados, conforme Figura 36.



**Figura 36.** Comparação dos diâmetros, índices de polidispersão (A) e dos perfis de distribuição de tamanho (B) das nanopartículas produzidas na condição NP10 sob tempos de síntese de 1 hora e 24 horas. Replicatas N = 3. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto.

A partir deste experimento, pode-se verificar que o tamanho das partículas não estava sendo afetado pelo aumento do tempo de síntese, variando de  $113 \pm 7,7$  nm para  $94,6 \pm 7,4$  nm, quando o tempo de síntese passou de 1 hora para 24 horas, conforme identificado anteriormente. Além disso, por meio desta abordagem foi possível obter nanopartículas menos polidispersas, como identificado pela diminuição do valor de PDI), que apresentou variação de  $0,197 \pm 0,024$  para  $0,084 \pm 0,041$ , para as sínteses de 1 hora e 24 horas, respectivamente, além de alcançar maior massa de material sintetizado ( $5 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $23,3 \text{ mg mL}^{-1}$  para sínteses com duração de 1 hora e 24 horas, respectivamente). A diminuição do diâmetro médio pode ser associada à estabilização do sistema ao consumir as partículas menores, aliado a processos de dissolução das partículas agregadas e incorporação destas nas etapas de densificação da rede de sílica. Algo parecido foi proposto em estudo de produção de partículas multicamadas<sup>123</sup>, onde o grupo de pesquisa buscava entender o mecanismo de crescimento das nanopartículas e, através de dados experimentais, identificou que as partículas cresciam até determinado diâmetro, a partir do qual, a dupla camada elétrica se tornaria suficientemente espessa para inibir a interação com núcleos e pequenas partículas,

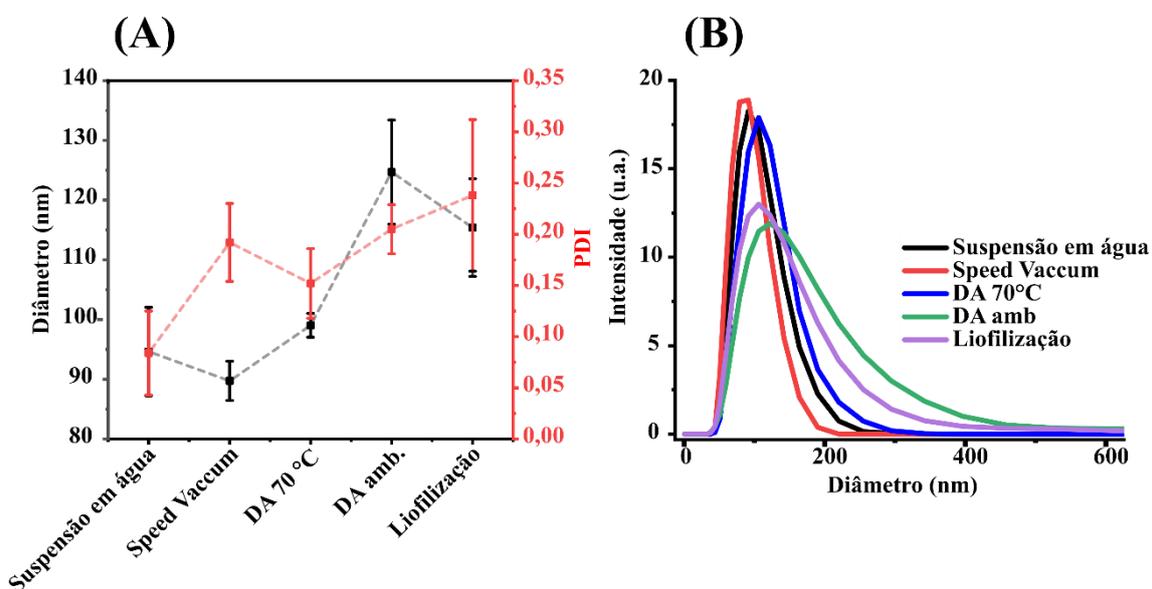
inibindo assim a agregação e, conseqüentemente, o aumento do tamanho. Esta ideia de núcleos interagindo, preferencialmente entre si, também auxilia na compreensão sobre aumento da densidade de partículas, visto que, se não houver inibição dos processos de agregação (como um tamanho crítico limitante), as partículas menores serão consumidas para promover o crescimento das maiores e, conseqüentemente, a densidade de partículas aumentaria juntamente ao tamanho, o que não ocorre neste experimento, onde apenas a densidade apresentou aumento. Pensando nisso, esta condição de síntese foi observada ao longo de 24 horas, a fim de estudar o comportamento do sistema, conforme Figura 37.



**Figura 37.** Avaliação de diâmetro, polidispersão (A) e massa (B) das partículas produzidas na condição NP10, ao longo de 24 horas. Replicatas N = 3. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto.

Conforme a Figura 37, o diâmetro das partículas não sofre grandes alterações após 2 horas de síntese. Além disso, a diferença mais expressiva, observada na amostra produzida com 1 hora de reação, pode estar associada à maior reatividade das superfícies das partículas, promovendo maiores irregularidades, comuns de serem observadas em sistemas pobres em água e/ou amônia<sup>115,119,125,126</sup>. A partir de 2 horas é possível notar que o diâmetro das partículas se torna aproximadamente constante, enquanto há aumento na massa produzida e diminuição da polidispersão das partículas. Esta última observação pode estar associada à diminuição da reatividade da superfície, através de processos de redissolução e precipitação, além da adição de monômeros mono-hidrolizados, que acabam “envenenando” os sítios ativos (Si-OH)<sup>123</sup>, impedindo reações seguintes. Outro ponto interessante pode ser observado comparando as curvas

de aumento de massa ao longo do tempo de síntese para as condições NP1 (Figura 34) e NP10 (Figura 37), onde na primeira, ao final do período de 24 horas, obtivemos uma condição muito indicativa de equilíbrio, enquanto na segunda, podemos identificar uma região de aumento de massa quase linear. Isso pode estar associado à menor concentração de catalisador e, por consequência, a taxas mais lentas de hidrólise de TEOS e formação das espécies reativas necessárias para o surgimento de núcleos e partículas<sup>127,128</sup>. Frente aos resultados obtidos, a condição NP10 24h foi selecionada para encapsulamento dos compostos com propriedade antifúngica, porém, antes havia a necessidade de se estabelecer a abordagem ideal para obtenção das partículas na forma sólida, evitando perda de características por eventos como agregação ou aglomeração das nanopartículas e, para isto, diferentes métodos de secagem foram investigados, conforme Figura 38.



**Figura 38.** Aplicação de diferentes métodos de secagem e seus efeitos sobre diâmetro, PDI (A) e perfil da distribuição de diâmetros (B) das nanopartículas sintetizadas na condição NP10 24 horas. Replicatas N = 3. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup> ; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 24 horas.

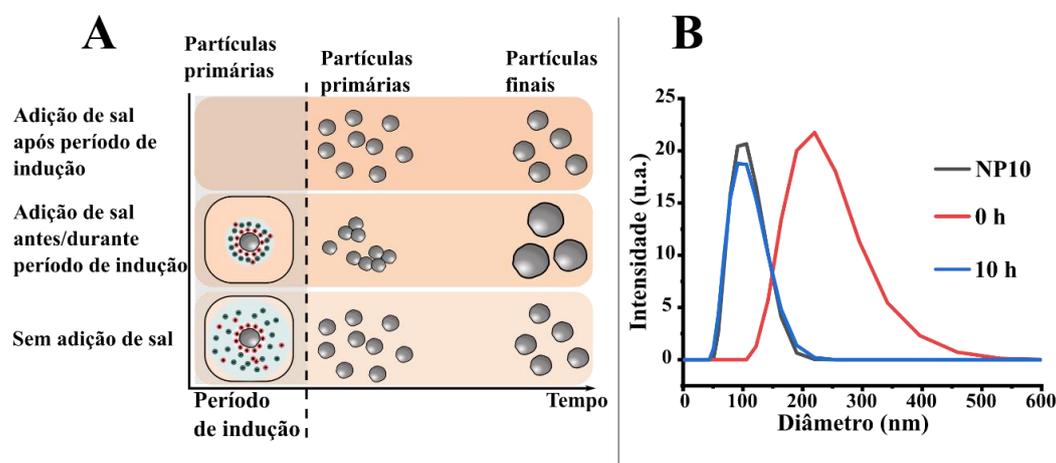
De acordo com a Figura 38, o método de secagem que manteve o menor diâmetro das nanopartículas, após ressuspensão, foi o de secagem utilizando o equipamento SpeedVaccum (descrição das funcionalidades na seção 4.9.2), seguido pela desidratação alcoólica com posterior evaporação do solvente em estufa a 70 °C. Porém, o PDI do primeiro método apresentou maior diferença à amostra em

**suspensão, quando comparado à desidratação alcoólica e, por este motivo, aliado à maior simplicidade e menor necessidade de equipamentos mais específicos, a desidratação alcoólica foi selecionada como método de secagem. Todavia, aqui tem-se um ponto que deve ser analisado com cuidado: a secagem das nanopartículas contendo os compostos antifúngicos, em estufa. Por se tratar de compostos voláteis e passíveis de degradação por processos oxidativos, tal abordagem pode influenciar nas propriedades dos mesmos. Idealmente, este problema seria resolvido utilizando o processo de liofilização, ou até mesmo a secagem em temperatura ambiente após desidratação alcoólica, porém os resultados de diâmetro e PDI (Figura 38) expõem a baixa aplicabilidade destas abordagens, visando à manutenção das propriedades físicas do sistema.**

#### *5.5.2. Incorporação de eugenol às partículas de sílica*

A abordagem de incorporação de eugenol à matriz de sílica por exposição *in situ* não apresentou resultados positivos. De fato, isso foi observado para condições experimentais nas quais eugenol foi adicionado após 2 ou 12 horas de síntese, demonstrando que apenas o estágio de condensação e, conseqüentemente, densificação das partículas não seria o suficiente para determinar a entrada (ou permanência) do composto no material. Outro fator que poderia estar inibindo a incorporação de eugenol às nanopartículas é a dupla camada elétrica dos núcleos, que tem importante papel na estabilização destes durante o desenvolvimento/crescimentos das partículas, ao acentuar as contribuições coulombicas na repulsão partícula-partícula. De fato, a possibilidade de desprotonação do eugenol em meio alcalino poderia proporcionar a inibição de interações eugenol-partícula, justificando os resultados observados. Sendo assim, uma adaptação desta abordagem de incorporação, visando a minimização da dupla camada elétrica das partículas, poderia facilitar este tipo de interação. Para investigar essa possibilidade, o mesmo procedimento foi repetido, porém com a adição de 100 µL de uma solução 100 mM de KCl, no início e após 10 horas de síntese. A adição de eletrólito à síntese de nanopartículas de sílica pelo método de Stöber pode ter efeitos muito específicos dependendo do momento da adição. Isso se dá, pois a estabilização coloidal provocada por fatores como força iônica do meio pode ser diminuída pela adição de eletrólitos, devido à diminuição de espessura da dupla camada elétrica dos

coloides. Este fator tem maior efeito sob as nanopartículas de sílica quando estas ainda não atingiram o diâmetro de estabilidade, denominado diâmetro crítico, por isso, a adição de KCl no início da síntese, onde os núcleos ainda não estão formados e, tampouco as partículas primárias, acarreta na facilitação dos fenômenos de agregação, levando a partículas finais com diâmetros maiores, uma vez que um fator de repulsão núcleo-núcleo — a dupla camada elétrica — é minimizado. Estes efeitos são menos intensos sob partículas maiores, ou seja, a adição de sais após determinado tempo de síntese não afeta, ao menos de forma tão expressiva, o desenvolvimento das nanopartículas. Desta forma, a facilitação de interações eletrostáticas núcleo-núcleo, poderia ser usada para propor o mesmo tipo de efeito para interação eugenol-partícula. De acordo com as medidas de UV-Vis, nestas condições, há a incorporação de eugenol à estrutura das nanopartículas, sendo o máximo incorporado de aproximadamente 8,3 % de eugenol (sendo a concentração inicial equivalente a  $625 \text{ mg L}^{-1}$ ). Além disso, pode-se observar o efeito de uma condição experimental que facilite eventos de agregação, sobre o diâmetro de partículas de sílica (Figura 39). Para cada condição experimental, foram executadas sínteses em triplicata.



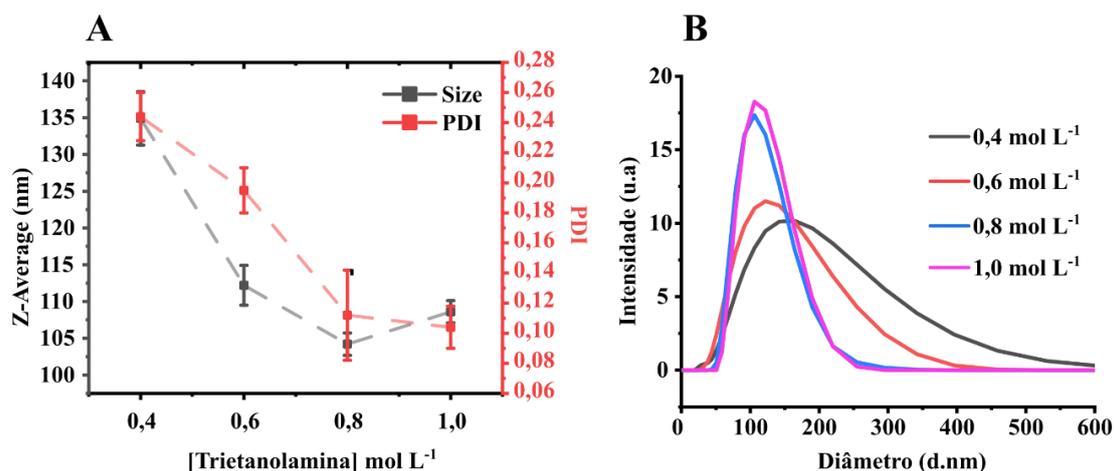
**Figura 39.** A) Ilustração dos efeitos da adição de sal, em diferentes momentos da reação, sobre a dupla camada elétrica dos núcleos e o diâmetro final das partículas. B) Verificação experimental dos efeitos da adição de KCl à síntese de partículas de sílica por método de Stöber, de acordo com o momento da adição. A amostra NP10 define a condição controle de síntese sem adição de KCl. As amostras 0h e 10h representam as partículas produzidas em condições experimentais, cuja adição de KCl se deu ao início da síntese (juntamente com os demais reagentes) e após 10 horas de incubação,

respectivamente. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; [NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH] = 0,16 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 24 horas.

Ainda que esta abordagem tenha possibilitado a incorporação de eugenol às nanopartículas, o material produzido não apresentou inibição contra *A. niger*, possivelmente pela baixa concentração de eugenol. Sendo assim, outras abordagens se fizeram necessárias.

Devido às dificuldades associadas à incorporação de eugenol às partículas durante o processo de síntese, abordagens envolvendo exposição pós-síntese foram estabelecidas, conforme protocolos dispostos na Seção 4.10.2. Entretanto, as partículas de sílica sintetizadas utilizando hidróxido de amônio como catalisador não apresentaram potencial para adsorver eugenol, mesmo após processo de calcinação. Esta observação poderia estar associada à baixa porosidade, comum a partículas sintetizadas por este método <sup>129</sup>. Frente a isto, reagentes com capacidade de atuarem como catalisadores e agentes espaçadores de estrutura <sup>129</sup> foram utilizados para o preparo de partícula, com o intuito de produzir partículas com maior diâmetro de poro, conforme detalhado na Seção 4.10.2.

O uso de surfactantes como agentes porogênicos, como por exemplo, o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), possibilita a produção de partículas que apresentam micro e mesoporos <sup>130-133</sup>. No entanto, a utilização deste tipo de agente implica a adição de um novo componente à reação, por isso, o uso de aminoácidos e alcanolaminas tem sido difundido, pela possibilidade de atuarem tanto como catalisador, quanto agente porogênico <sup>129,134-137</sup>. Dentre as alcanolaminas, Nandy e colaboradores <sup>129</sup> observaram que a aplicação de trietanolamina como catalisador no Método de Stöber possibilita a obtenção de partículas com maiores área específica e diâmetro de poro, quando comparado com aquelas produzidas na presença de hidróxido de amônio. Frente à potencialidade e acessibilidade ao reagente em questão, este foi utilizado como ferramenta na abordagem de adsorção de eugenol em partículas de sílica, tendo como foco indução à maior porosidade no material. Para isso, o reagente trietanolamina foi utilizado como catalisador e agente porogênico na síntese de partículas de sílica, sob diferentes condições de concentração, conforme Figura 40.



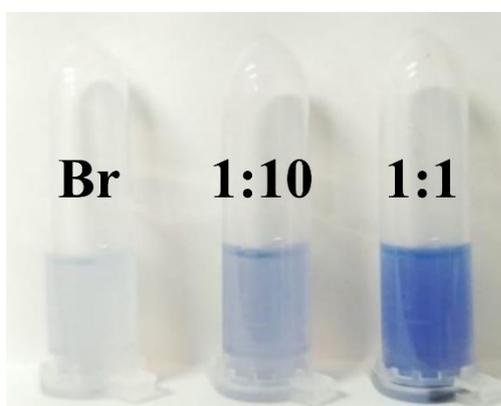
**Figura 40.** A) Efeitos da concentração de trietanolamina, utilizada como catalisador na síntese de partículas de sílica, sobre o diâmetro e a polidispersão das mesmas. B) Distribuições de tamanhos de partículas conforme a concentração de catalisador. Síntese das partículas e respectivas medidas feitas em triplicata. Condições de síntese [TEOS] = 0,28 mol L<sup>-1</sup>; [H<sub>2</sub>O] = 6,0 mol L<sup>-1</sup>; Solvente: etanol absoluto; Tempo de síntese: 24 horas.

No intervalo de concentração investigado, é possível observar a diminuição do tamanho das partículas conforme o aumento da concentração de trietanolamina. Além disso, para concentrações de trietanolamina inferiores a 0,4 mol L<sup>-1</sup>, não foi possível observar a formação de partículas. As partículas produzidas utilizando 1 mol L<sup>-1</sup> de trietanolamina foram selecionadas para os experimentos de adsorção de eugenol, por apresentarem diâmetro próximo a 100 nm, semelhante às partículas sintetizadas pela condição NP10 24h, e serem produzidas em maior massa, quando comparado à condição de 0,8 mol L<sup>-1</sup>. No entanto, não foi possível observar retenção de eugenol nestes materiais.

Uma vez que a manipulação de propriedades físicas das partículas, ao que tudo indica, foi insuficiente para promover a incorporação de eugenol ao material, estratégias de modificação química foram investigadas. Em resumo, partículas sintetizadas na presença do organosilano 3-(trietoxisilil)propil isocianato, foram submetidas a experimentos de adsorção de eugenol, conforme seção 4.10.3. Porém, esta abordagem, nas condições investigadas, não apresentou resultados positivos, mesmo para partículas sintetizadas na presença de excesso de organosilano. Uma possível racionalização para estas observações pode estar na reatividade do grupo isocianato com água, presente no meio, levando à produção de uma amina correspondente. Esta possibilidade pode ser

testada, qualitativamente, através de exposição das partículas de sílica modificadas à solução de ninidrina. A ninidrina é comumente aplicada em análises qualitativas (e em alguns casos, quantitativas) de aminoácidos, pela reação com grupo amino e formação do composto denominado púrpura de Ruhemann<sup>138,139</sup>. Esta reação tem se mostrado aplicável à indicação de grupos amino em filmes finos e partículas<sup>140,141</sup>.

Para isso, 20 mg de partículas foram suspensos em 1 mL de solução de ninidrina ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), por sonicação em banho, durante 1 hora. Ao final do processo, foi possível observar o surgimento da coloração azul/roxo, indicando a formação do composto púrpura de Ruhemann, conforme Figura 41.



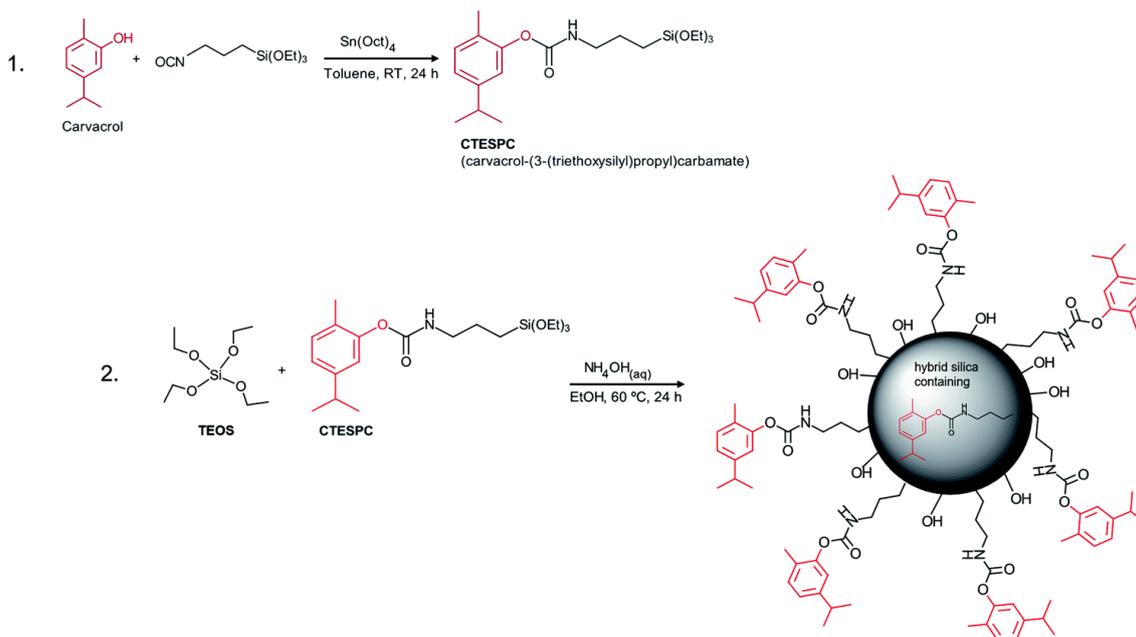
**Figura 41. Microtubos contendo partículas de sílica sintetizadas por método de Stöber sem adição de 3-(trietoxisilil)propil isocianato como agente modificador de estrutura (Br) e com adição do mesmo nas proporções organosilano:TEOS de 1:10 e 1:1, suspensas em solução de ninidrina  $5 \text{ g L}^{-1}$ .**

A partir da verificação de que a abordagem baseada na reação entre grupos isocianato e eugenol, para incorporação do composto às partículas, poderia ser inviável nas condições investigadas, uma nova alternativa foi proposta. Para isto, considerando as especificidades do método de Stöber, a abordagem escolhida foi a produção de um organosilano modificado com eugenol e, para isso, os procedimentos detalhados na Seção 4.11 foram desenvolvidos.

## **5.6. Elaboração do método de síntese de organosilano derivado de eugenol**

A literatura apresenta diferentes abordagens para a formação da ligação uretana, principalmente com foco na reação entre di- ou poli-isocianatos e poliois, para produção

de poliuretano <sup>142</sup>. Um aspecto comum a muitas destas abordagens é a necessidade de catalisadores complexos e/ou tóxicos <sup>143,144</sup>, com destaque aos compostos organoestânicos, amplamente utilizados para esta finalidade <sup>143,145–147</sup>. Em um estudo elaborado por Sokolik e Lellouche <sup>147</sup>, que em um primeiro momento foi compreendido como base para a proposta representada pelo Esquema 3 (Seção 4.11), os autores investigaram a produção de nanopartículas híbridas, modificadas com organosilano contendo a molécula carvacrol, conforme Figura 42.

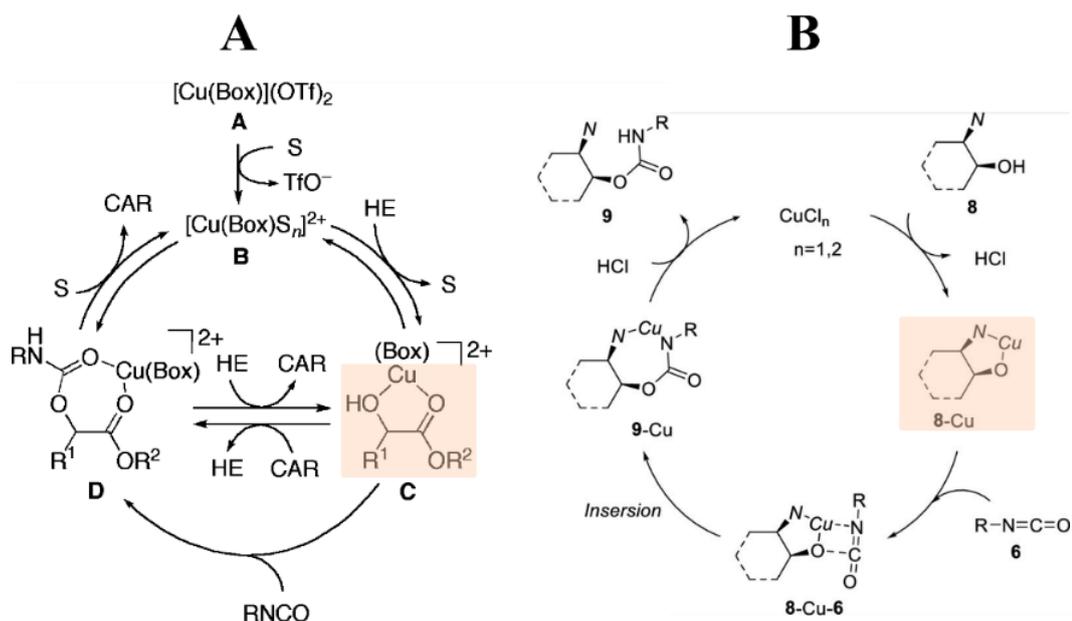


**Figura 42.** Esquema de (1) síntese de CTESPC ((carvacrol-3-(trietoxisilil)propil)carbamato)) e (2) produção de nanopartícula de sílica híbrida. Figura reproduzida e legenda adaptada com permissão, de Sokolik e Lellouche <sup>147</sup>. (Licenciado sob CC BY 3.0 - <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)

No entanto, o uso de tetraoctilestanho como catalisador demandaria cuidados intensos na manipulação, armazenamento e descarte do reagente, devido à possibilidade deste servir como precursor de espécies de organoestanho tri-substituídas, que por sua vez, são investigadas devido aos danos que produzem em diferentes organismos, invertebrados e mamíferos <sup>148–150</sup>. Como alternativas ao uso de organoestananas, alguns grupos têm investigado a aplicação de outros organometálicos com menor toxicidade, baseados em zircônio e bismuto, por exemplo <sup>144,151</sup>, na formação de ligações uretana. Porém, a complexidade destes reagentes ainda se apresentaria como um fator limitante. Então, uma alternativa surgiu a partir do estudo publicado por Oda e colaboradores <sup>152</sup>. Neste estudo, o grupo estava estabelecendo uma planta-piloto para produção do fármaco

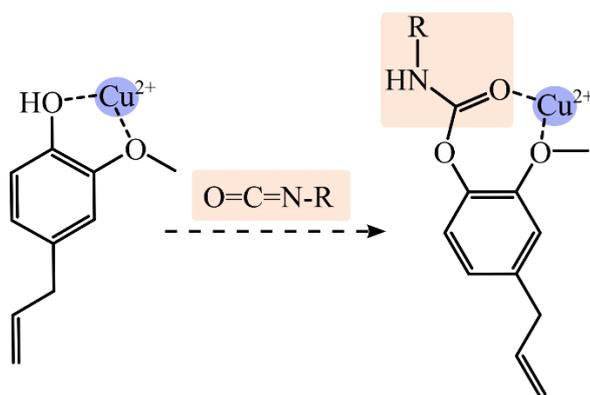
tosilato de naldemedina, utilizado no tratamento de constipação induzida por opioides (OIO), com base em protocolo de síntese previamente estabelecido em escala laboratorial. No entanto, o grupo identificou variações na taxa de determinada etapa de reação, envolvendo a reação de adição entre um grupo OH e um grupo isocianato. De acordo com o estudo, esta reação ocorreria de forma mais rápida ao preparar os reagentes em laboratório e, de forma mais lenta quando feito diretamente na planta-piloto. Esta observação levou o grupo a propor que o fator determinante seria a qualidade da água utilizada, visto que os demais reagentes/condições não variavam. Através de análises químicas e físico-químicas, o grupo identificou maior concentração de cobre na água de laboratório. A partir desta associação, o grupo testou diferentes sais de cobre, além de cobre metálico em pó, como catalisadores na etapa de reação em questão, obtendo conversões superiores a 90%. O grupo destaca a aplicabilidade de cloreto de cobre (II) como catalisador, nestas condições, devido sua solubilidade em meios aquosos, além de sua estabilidade em solução.

Com base em mecanismo de carbamoilação de alfa-hidroxiéster catalisada por cobre (II), proposto por Kurono e colaboradores <sup>153</sup>, Oda e colaboradores <sup>152</sup> propuseram um mecanismo associado à adição de hidroxila a isocianato. Ambos os mecanismos propõem que a atividade catalítica do cobre (II) seja substrato-dependente, sendo necessária a formação de um complexo bidentado, conforme Figura 43.



**Figura 43.** Mecanismos envolvendo atividade catalítica de cobre (II), segundo (A) Kurono e colaboradores <sup>153</sup>, e (B) Oda e colaboradores <sup>152</sup>. Figuras adaptadas com permissão, de Kurono e colaboradores <sup>153</sup> (Copyright © 2011, American Chemical Society), e (B) Oda e colaboradores <sup>152</sup> (Copyright © 2022, American Chemical Society). Figuras adaptadas sob autorização.

Desta forma, a aplicação de sais de cobre (II) como catalisador da reação proposta no Esquema 4, parece depender da possibilidade de formação de um complexo bidentado entre eugenol e o centro metálico, conforme Esquema 4.



**Esquema 4.** Ilustração de proposta de ação parcial do cobre (II) na formação da ligação uretana entre as moléculas de eugenol e do organossilano contendo grupo isocianato.

Ainda que não tratado explicitamente como formação de complexos bidentados, efeitos anti- e pró-oxidantes associados ao eugenol, frente a processos como peroxidação de lipídios <sup>154</sup>, danos em DNA <sup>155</sup>, disfunções na expressão de mRNAs <sup>156</sup>,

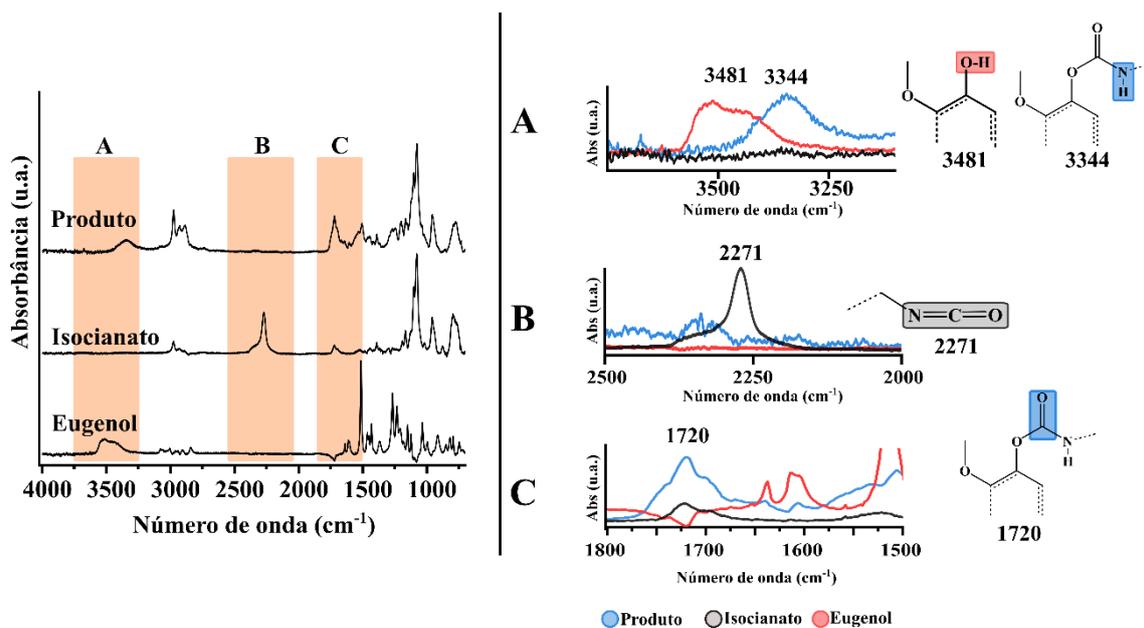
mediados por metais como ferro e cobre, são atribuído à capacidade quelante da molécula. Além disso, cimentos ortodônticos baseados em misturas de óxido de zinco e eugenol, para produção de eugenolato de zinco, demonstram a potencialidade do eugenol em formar complexos com núcleos metálicos divalentes <sup>157,158</sup>.

Outro aspecto importante desta síntese é o solvente utilizado. O uso de tolueno seco é necessário devido à alta reatividade do organosilano na presença de água, levando à formação de oligômeros, devido à hidrólise e policondensações do reagente. No entanto, uma das vantagens de utilizar o cloreto de cobre (II) como catalisador seria sua compatibilidade com meios aquosos. Além disso, o mesmo é insolúvel em tolueno. Sendo assim, outro sistema precisou ser elaborado. A abordagem escolhida foi utilizar um sistema contendo dois solventes secos: tolueno e acetonitrila. Esse último, escolhido por três motivos: (i) miscibilidade com tolueno e demais reagentes; (ii) facilidade de secagem, apenas com peneira molecular 3Å (5% m/v) por 72 horas <sup>159</sup>; (iii) aumento da solubilidade do sal hidratado, devido à formação de complexos de cobre-acetonitrila <sup>160-162</sup>.

#### *5.6.1. Caracterização do produto de síntese de organosilano derivado de eugenol*

Como alternativa às limitações das demais abordagens para incorporação de eugenol às partículas de sílica, a síntese de um organosilano modificado com eugenol foi investigada. Para isso, técnicas de purificação e caracterização foram aplicadas a fim de possibilitar este estudo.

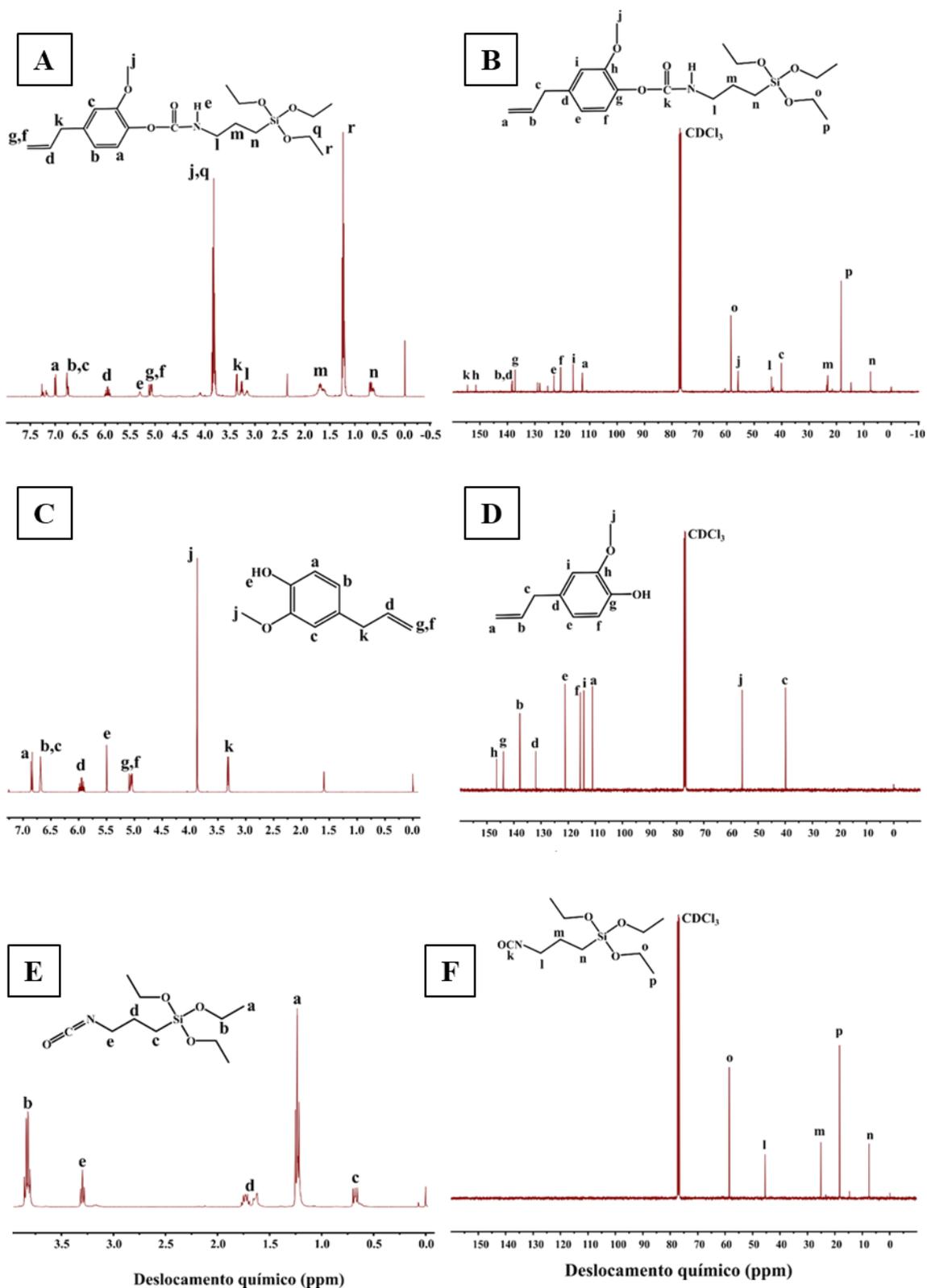
A reação entre eugenol e 3-(triétoxisilil)propil isocianato foi verificada através da técnica de FTIR-ATR, com foco em sinais característicos dos reagentes e do produto proposto, conforme Figura 44, a seguir.



**Figura 44.** À esquerda, espectros de infravermelho em modo absorbância, obtidos pela técnica de FTIR-ATR, do produto proposto e dos reagentes utilizados. À direita, estão destacadas as regiões que contêm os sinais atribuídos a funções químicas características de cada um dos compostos.

De acordo com a Figura 44, três sinais podem ser indicativos da formação do produto. O primeiro, e talvez mais proeminente, é o desaparecimento (para esta técnica) do sinal em  $2271\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao estiramento do grupo NCO<sup>163,164</sup>, característico do reagente 3-(trietoxisilil)propil isocianato. O segundo é o sinal em  $1720\text{ cm}^{-1}$ , atribuído ao estiramento da ligação C=O do grupo uretana<sup>165</sup>. Por último, o surgimento do sinal em  $3344\text{ cm}^{-1}$  que, deslocado cerca de  $137\text{ cm}^{-1}$  frente ao sinal em  $3481\text{ cm}^{-1}$  (atribuído ao grupo -OH fenílico do eugenol), pode ser atribuído ao estiramento da ligação N-H do grupo uretana.

Após investigação do produto bruto pela técnica de FTIR-ATR, as observações foram complementadas pelos resultados de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , conforme Figura 45.

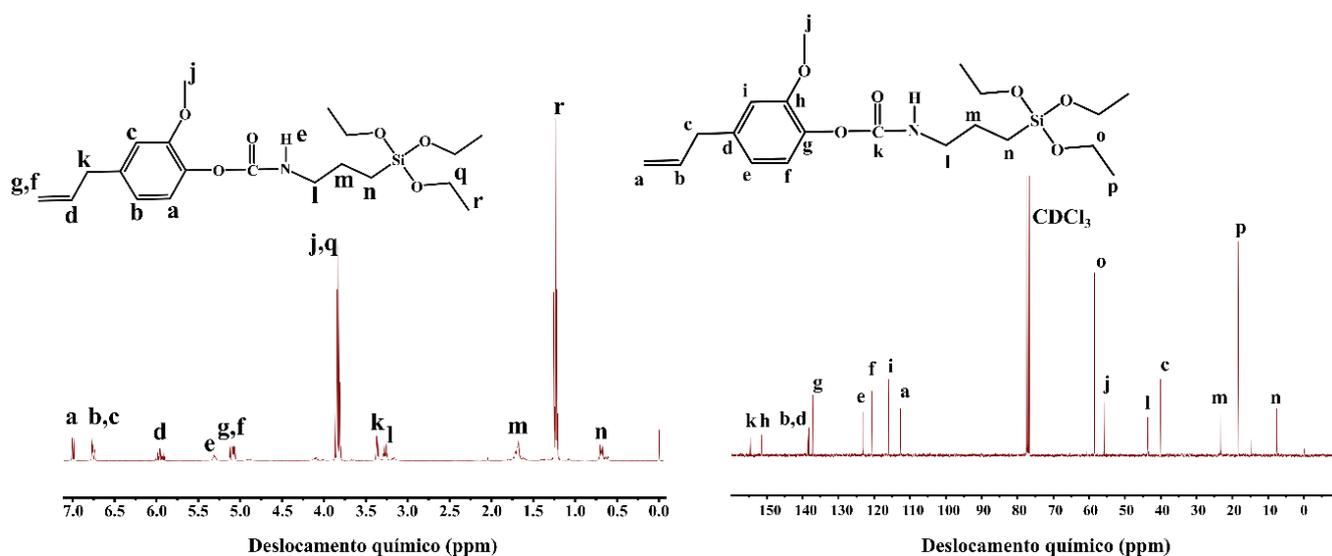


**Figura 45.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (esquerda) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (direita) para o produto de síntese (A e B), eugenol (C e D) e 3-(trietoxisilil)propil isocianato (E e F). RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, tetrametilsilano (TMS) como referência). RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, tetrametilsilano (TMS) como referência).

Através do RMN de  $^1\text{H}$  é possível identificar o sinal em aproximadamente  $\delta = 5,3$  ppm, atribuído ao hidrogênio da ligação N-H presente no grupo uretana <sup>147</sup> (Figura 45A). Porém, devido à proximidade com o sinal atribuído ao hidrogênio da ligação O-H <sup>163</sup>, esta observação não se dá de forma explícita. De fato, por se tratar de um produto bruto, e manter inalteradas diversas regiões das moléculas originais, se torna menos evidente a confirmação da estrutura proposta por meio de RMN de  $^1\text{H}$ . No entanto, através da análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  é possível observar deslocamentos mais expressivos de alguns núcleos de  $^{13}\text{C}$ , como por exemplo, o carbono pertencente ao anel aromático e diretamente ligado ao grupo metoxi ( $\text{OCH}_3$ ), que apresenta um deslocamento de  $\delta = 146$  ppm (eugenol) <sup>166,167</sup> para  $\delta = 151$  ppm (produto de síntese) e, principalmente, o sinal em aproximadamente  $\delta = 155$  ppm, atribuído ao carbono da ligação uretana, indicando a formação da ligação e, portanto, a formação do produto proposto. Outro aspecto importante observado a partir das análises por RMN de  $^{13}\text{C}$  se dá sobre ausência do sinal atribuído ao carbono do grupo NCO, no reagente de partida, que, segundo literatura <sup>163</sup>, ocorre em aproximadamente  $\delta = 120$  ppm. No entanto, de acordo com banco de dados experimentais, disponibilizado pela John Wiley & Sons, através da plataforma SpectraBase®, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (fornecido pela Sigma-Aldrich Co. LLC) do reagente 3-(trietoxisilil)propil isocianato (comercializado pela Sigma-Aldrich Co. LLC) apresenta o mesmo perfil apresentado pela Figura 45F, ou seja, a ausência do sinal atribuído ao carbono do grupo NCO (Detalhes podem ser encontrados em <https://spectrabase.com/spectrum/3sbMIBOeU0Q>. Copyright © 2021 Sigma-Aldrich Co. LLC. - Database Compilation Copyright © 2021 John Wiley & Sons, Inc. All Rights Reserved). A ausência do sinal atribuído ao núcleo  $^{13}\text{C}$  do grupo isocianato pode estar associada ao processo de relaxação mais longo do núcleo.

Frente aos indicativos de formação do produto proposto, o material foi submetido à purificação em coluna cromatográfica preparativa, conforme descrito na Seção 4.11.

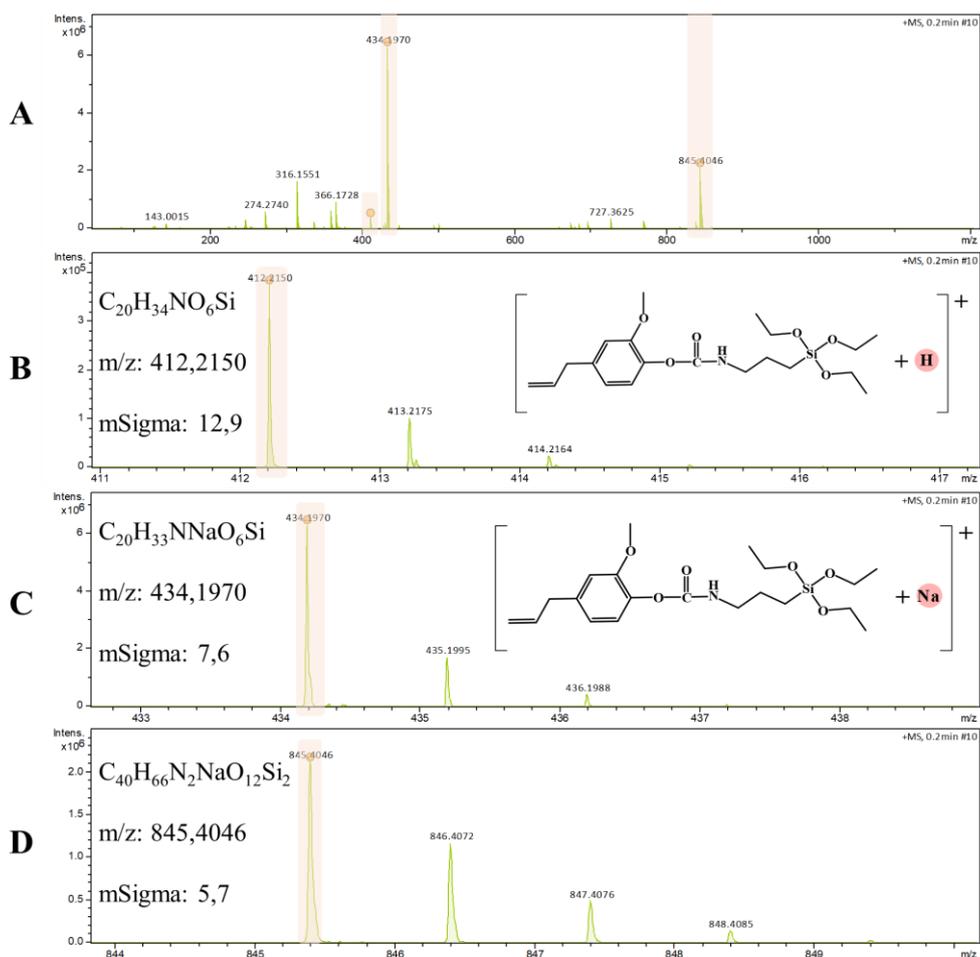
A partir das análises de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , após o processo de purificação aplicado, não foram observadas modificações nas atribuições de sinais nos espectros, indicando a manutenção da estrutura química do material, conforme Figura 46.



**Figura 46.** Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (esquerda) e RMN de  $^{13}\text{C}$  (direita) para o produto purificado. RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C, tetrametilsilano (TMS) como referência).

A obtenção de um sólido incolor/levemente opaco após processo de purificação por cromatografia em coluna, partindo de um material bruto de coloração amarelo-escuro, indica a eliminação de contribuições do meio reacional. Além disso, de acordo com os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , apresentados na Figura 46, o processo de purificação possibilitou a eliminação de contribuições do meio reacional, que poderiam estar associadas aos sinais não atribuídos nas regiões próximas a  $\delta = 2,5$  ppm e  $\delta = 130$  ppm, presentes nos espectros do produto bruto. Uma vez purificado, o material foi submetido à análise por espectrometria de massas de alta resolução, a fim de elucidar a estrutura com base e dados de massa exata.

Através da análise por espectrometria de massas em sistema híbrido Q-ToF (Quadrupolo e Tempo de Voo), onde a amostra foi analisada por método de infusão direta, sendo ionizada no modo positivo pelo método de ionização por eletrospray (ESI+), a estrutura química proposta e indicada pelas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$  pode ser suportada, conforme Figura 47.



**Figura 47.** A) Perfil massa/carga da molécula após ionização por eletrospray no modo positivo; B) Perfil isotópico relacionado ao sinal m/z 412,2150; C) Perfil isotópico relacionado ao sinal m/z 434,1970; D) Perfil isotópico relacionado ao sinal m/z 845,4046.

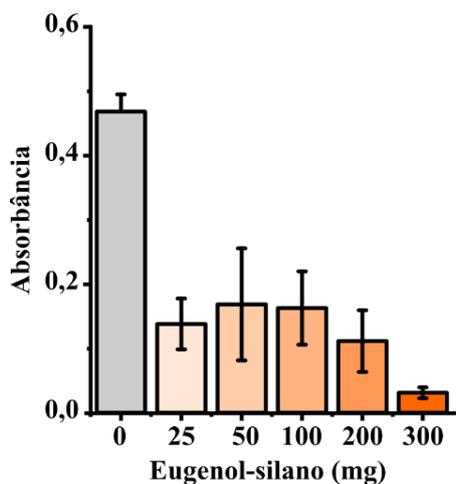
Conforme Figura 47, a estrutura proposta ao produto da reação pode ser indicada pela técnica de espectrometria de massas de alta resolução, uma vez que, de acordo com o perfil de fragmentação é possível identificar os sinais m/z de 412,2150, 434,1970 e 845,4046, atribuídos ao produto protonado, à formação de aduto com sódio, e a organização do aduto com sódio na forma de dímero, respectivamente. Desta forma, há diferentes evidências indicando a formação do produto almejado. Considerando que o produto de reação esteja devidamente purificado, o rendimento do protocolo de síntese foi de 86 % (com relação aos 10 mmol de eugenol utilizados).

Frente à verificação da formação do produto 4-alil-2-metoxifenil-(3-(trietoxisilil)propil)carbamato, denominado, a partir de então como eugenol-silano, o

mesmo foi aplicado na produção de materiais híbridos, assim como na aplicação em testes antifúngicos.

### 5.6.2. Inibição à adesão fúngica por recobrimento baseado em eugenol-silano

Lamínulas de vidro previamente preparadas, conforme protocolo descrito na Seção 4.6, foram modificadas com o composto eugenol-silano, a fim de verificar a aplicabilidade do mesmo na inibição de adesão fúngica. Para isso, diferentes massas do composto foram utilizadas em processo de modificação estabelecido na Seção 4.7. Um ponto a ser observado é a proposta de modificação da superfície do vidro em uma única etapa, sem a necessidade de modificação com APTES, seguida da exposição à solução de eugenol. Após, as lamínulas foram submetidas a experimentos de inibição de adesão (conforme protocolo detalhado na Seção 4.5). Os resultados observados estão representados pela Figura 48.



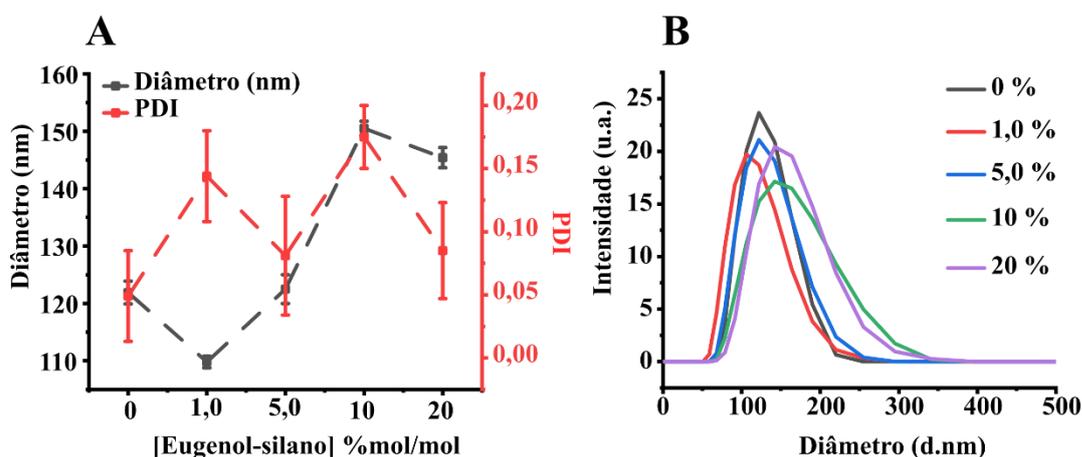
**Figura 48.** Resultados de experimento de inibição de biofilme utilizando lamínulas submetidas a procedimento de modificação com eugenol-silano, sob diferentes concentrações. Replicatas N = 4.

De acordo com a Figura 48, através do processo de modificação de lamínulas com eugenol-silano, é possível promover a inibição de adesão de *A. niger* sobre o vidro, quando as lamínulas são expostas, nas condições investigadas, à solução contendo 300 mg do modificador, sendo equivalente a uma solução de 10 mg mL<sup>-1</sup> do composto. Desta forma, há indícios da aplicabilidade do filme de eugenol-silano à proteção de substratos de vidro à contaminação por *A. niger*. O composto foi utilizado para

produção de nanopartículas de sílica modificadas, a fim de testar o potencial inibitório das mesmas sobre *A. niger* como elemento base para a proposição de filmes multifuncionais.

### 5.6.3. Síntese de partículas de sílica modificadas com eugenol-silano

A produção de partículas de sílica por método de Stöber <sup>62</sup> é susceptível a interferências de muitos fatores, desde a pureza do reagente, até à incorporação de algum aditivo. A adição de um agente modificador, como um organossilano, pode alterar nos processos de nucleação e crescimento das partículas, produzindo materiais com propriedades físicas distintas. Este tipo de comportamento pode ser verificado através das análises por DLS, conforme Figura 49, a seguir.



**Figura 49. A) Efeitos da concentração de eugenol-silano, utilizado como modificador química na síntese de partículas de sílica, sobre o diâmetro e a polidispersão das mesmas. B) Distribuições de tamanhos de partículas conforme a concentração do modificador. Síntese das partículas e respectivas medidas feitas em triplicata.**

Em geral, ao aumentar a concentração do eugenol-silano no meio reacional, o tamanho das partículas produzidas também aumentou. A adição do silano, com intuito de modificação das partículas em etapa de densificação, possibilita a deposição de espécies hidrolisadas do eugenol-silano sobre sítios ativos da partícula, levando ao aumento da mesma. Além disso, as medidas de DLS foram realizadas após a ressuspensão das partículas secas, visto sua aplicação necessitar do material em pó e,

portanto, partículas com maior conteúdo de modificante podem apresentar interações interpartículas mais acentuadas durante a secagem, levando ao aumento das partículas. Neste caso, esta última possibilidade parece ter menor impacto sobre o diâmetro das partículas, uma vez que os índices de polidispersão (PDI) se mantêm baixos, indicando homogeneidade entre as populações de partículas.

A presença do eugenol-silano nas partículas de sílica foi investigada através de análises termogravimétricas, conforme Figura 50.

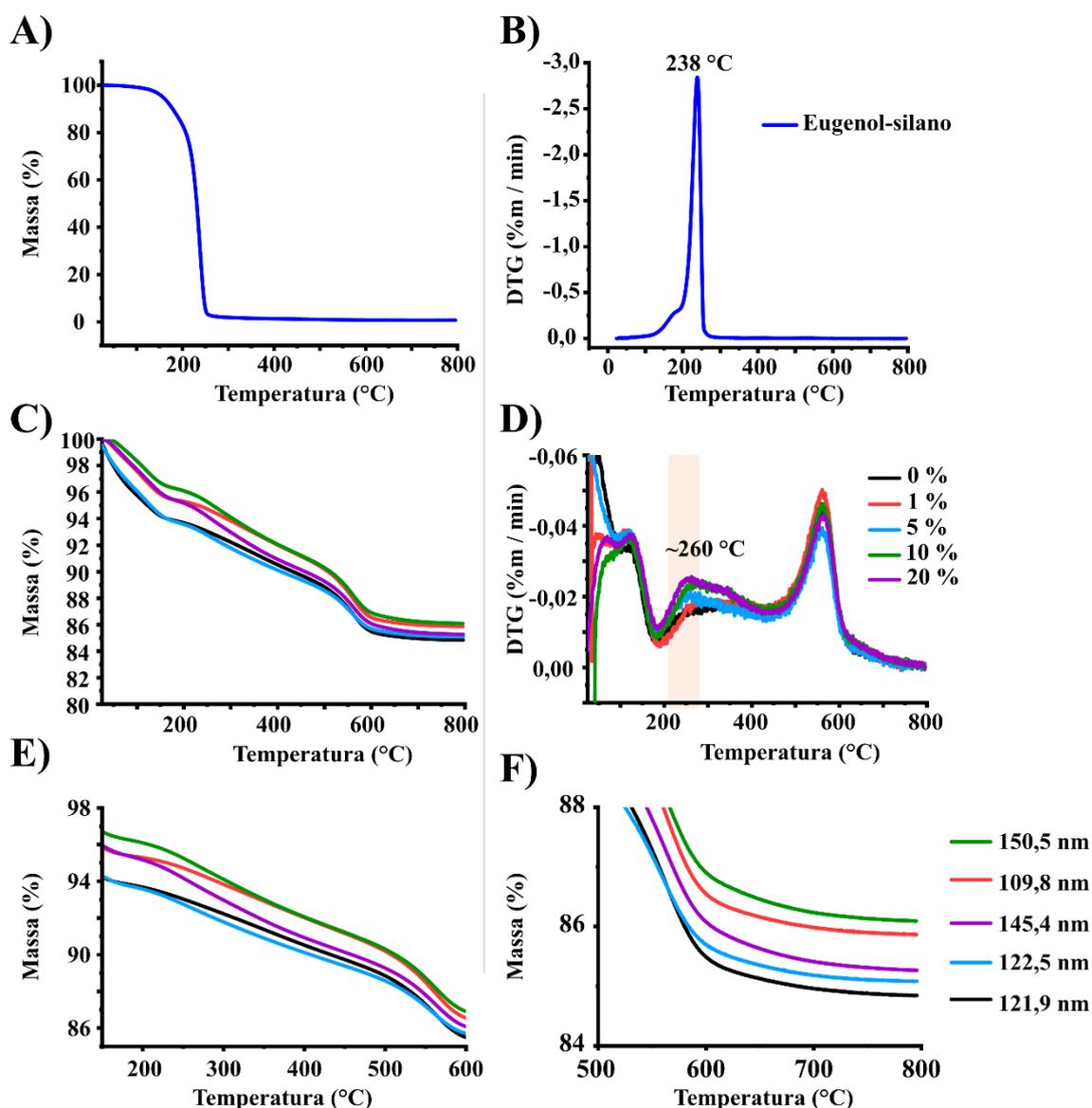
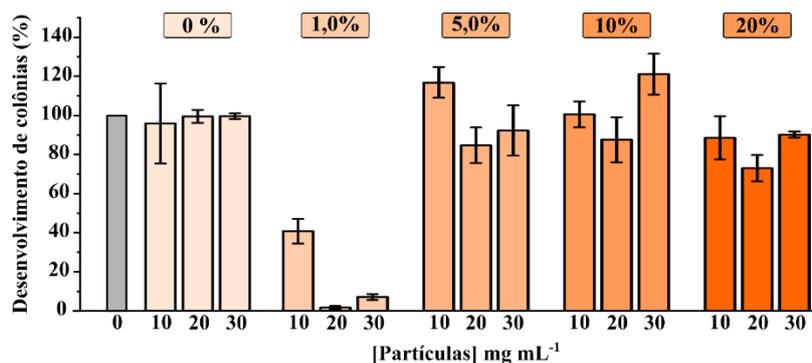


Figura 50. (A) Termograma do eugenol-silano e (B) sua respectiva derivação do percentual de perda de massa com relação ao tempo. (C) Termogramas das partículas de sílica sintetizadas na presença de eugenol-silano, e (D) respectivas derivações dos percentuais de perdas de massa com relação ao tempo. Em (D) destaque para região atribuída à degradação de eugenol-silano presente nas partículas. (E) Destaque às variações das inclinações dos termogramas das partículas de sílica na região de 100 a 600 °C. (F) Destaque à região de 600 a 800 °C dos termogramas das partículas e sua variação de perda de massa conforme tamanho das partículas. Rampa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> até 800 °C. Gás nitrogênio sob fluxos de 40 mL min<sup>-1</sup> (balança) e 60 mL min<sup>-1</sup> (amostra). Porta amostra de platina.

De acordo com as derivadas das curvas de perda de massa, é possível verificar um pico de evento térmico associado à decomposição do organossilano em aproximadamente 260 °C. Este sinal pode ser atribuído à degradação do eugenol-silano na partícula, enquanto o deslocamento do sinal de degradação do material puro, em 238 °C, pode estar associado ao aumento da estabilidade térmica do composto quando incorporado à rede de sílica. O sinal de decomposição pode ser melhor evidenciado a partir da formulação contendo 5 % de eugenol-silano. Ainda que a técnica provenha indicativos da presença do eugenol-silano, a quantificação da massa é dificultada pela resposta da técnica ao diâmetro da partícula. De acordo com os termogramas, a perda de massa parece aumentar com a diminuição do tamanho da nanopartícula, exceto pela partícula com 1 % de eugenol-silano, cujo tamanho é de 109 nm, e isso pode estar associado ao maior PDI da partícula, sendo possível que as diferentes populações afetem, de formas distintas, a análise termogravimétrica. A perda de massa no intervalo de temperatura de 150 a 600 °C sofre influência da área específica da partícula, devido aos eventos de desidroxilação, pois quanto maior a área, maior o conteúdo de sílica e, conseqüentemente, maior a influência da desidroxilação sobre a perda de massa total (quanto menor a partícula, maior a área específica; para partículas de mesma natureza). Interações entre diferentes tipos de partículas de sílica (formas de produção) e perda de massa foram investigadas por Kunc e colaboradores<sup>168</sup>. Segundo o grupo de pesquisa, a perda de massa em diferentes regiões de aquecimento (< 200 °C e > 200 °C) pode apresentar comportamentos específicos de acordo com a síntese e o método de secagem das partículas. Além disso, os seus dados indicam que o tamanho da partícula de sílica apresenta influência sobre o desenvolvimento dos termogramas.

#### 5.6.4. *Teste de atividade antifúngica de partículas modificadas com eugenol-silano*

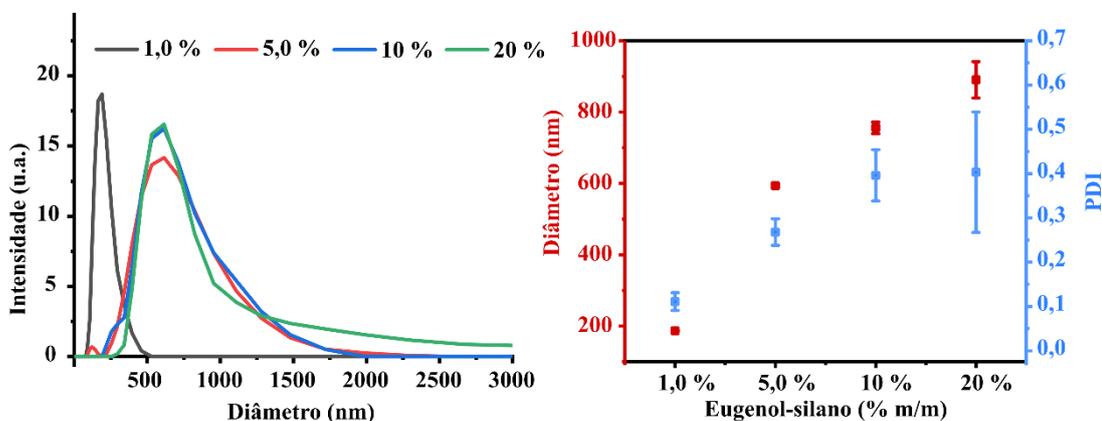
A atividade das partículas modificadas foi medida a partir da contagem do número de colônias formadas após o cultivo por 72 horas, e o percentual de crescimento foi determinado em comparação com o controle positivo (inóculo sem contato com partículas), conforme Figura 51.



**Figura 51.** Percentual de desenvolvimento de colônias de *A. niger* após exposição a suspensões de partículas de sílica modificadas com diferentes concentrações eugenol-silano.

As partículas de sílica sintetizadas com 1 % de eugenol-silano (% mol/mol TEOS:eugenol-silano) foram capazes de inibir o desenvolvimento do *A. niger*, sendo que o efeito de inibição se mostrou mais proeminente para concentrações de 20 e 30 mg mL<sup>-1</sup>. Ao contrário do que poderia ser esperado, as partículas contendo 5, 10 e 20% de eugenol-silano (concentrações de formulação) não apresentaram atividade contra *A. niger*, ou apresentaram atividades menos expressivas. Estes resultados podem estar associados aos efeitos causados pelo processo de esterilização das partículas, o que pode ser investigado através de medidas de diâmetro das mesmas após o tratamento térmico (conforme Figura 52). Este método de esterilização é menos adequado a partículas, principalmente em solução, devido à possibilidade de indução de fenômenos de agregação interpartículas. Porém, esterilização, das partículas em estado sólido, por radiação ultravioleta se mostrou insuficiente, o que pode ser identificado pelo crescimento de bactérias em placas contendo as partículas espalhadas sobre o meio de cultivo. Outra alternativa seria a esterilização por filtração e, para isso, filtros com porosidade de 0,45 µm foram aplicados na filtração das suspensões, porém houve grande retenção de partículas (verificada pela diminuição expressiva da contagem de fótons junto à técnica da DLS, utilizada como indicativo da aplicabilidade desta alternativa). Ainda que as partículas apresentem diâmetros menores que o tamanho de poro do filtro (segundo resultados de DLS), é necessário considerar interações com a membrana filtrante, assim como as partículas retidas no volume morto do filtro. Sendo assim, ainda que em um cenário não ideal, o método de esterilização por autoclavagem foi utilizado.

Além disso, experimentalmente é possível observar a rápida decantação destas partículas, o que indica a perda da estabilidade coloidal das mesmas, o que por consequência pode estar associado ao aumento do tamanho de forma desordenada.



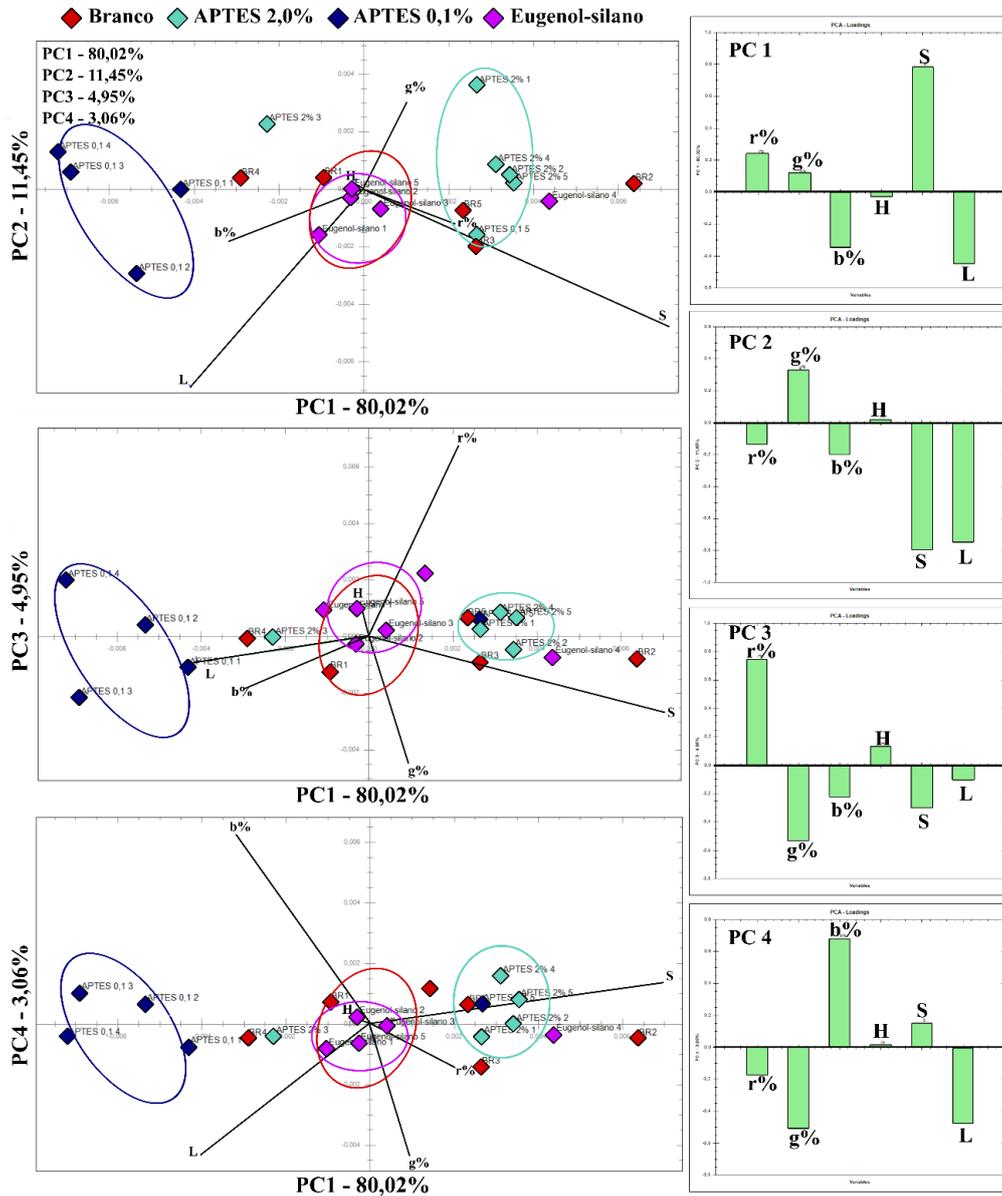
**Figura 52. Verificação de modificações no diâmetro e na polidispersão de partículas de sílica funcionalizadas com eugenol-silano, após tratamento térmico utilizado para esterilização das mesmas. A) Distribuição de diâmetros das partículas funcionalizadas com diferentes concentrações de eugenol-silano; B) Variação de diâmetro e PDI de acordo com a formulação da partícula.**

Conforme Figura 52, é possível inferir sobre o efeito de processos de agregação interpartículas causados pelo aquecimento elevado das partículas, prejudicando as interações entre esporos e partículas. Os resultados de DLS corroboram com as observações experimentais sobre a perda da estabilidade coloidal, atribuída ao aumento de tamanho de forma desordenada, visto os valores de diâmetro (600 a 900 nm) e PDI (0,25 a 0,40) determinados. Ainda assim, através deste experimento exploratório, é possível identificar a atividade das partículas modificadas com eugenol-silano, expondo o potencial deste sistema para aplicações envolvendo inibição fúngica.

### 5.7. Similaridade e percepção de cores

Através da decomposição das imagens no espaço de cor HSL, foi possível avaliar, além das contribuições dos canais de cores vermelho (R, *red*), verde (G, *green*) e azul (B, *blue*), a influência de parâmetros como matiz (H, *hue*), saturação (S, *saturation*) e luminância (L, *luminance*). Após a decomposição das imagens, os grupos

formam submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA). O sistema foi ser representado, majoritariamente, utilizando quatro componentes principais, conforme Figura 53. Neste modelo de espaço de cor, as contribuições dos canais de cores são apresentadas em percentual, invés de frequência em histograma, como usualmente ocorre no espaço de cor RGB.



**Figura 53.** Resultados das análises de componentes principais (à esquerda) e os *loadings* para cada componente (à direita). As imagens foram avaliadas de acordo com a contribuição dos canais: %r (percentual de vermelho); %g (percentual de verde); %b (percentual de azul); H (hue, matiz); S (saturação); L (luminância).

De acordo com a Figura 53 é possível identificar que as amostras modificadas com APTES na concentração 0,1% (m/v) estão mais isoladas/distintas das demais. No

gráfico PC1 × PC3 é possível observar que a saturação e a luminância promovem a separação deste grupo, com relação aos demais. No gráfico PC1 × PC4 a contribuição da saturação para a PC1 parece determinar o isolamento do grupo. Os demais grupos de amostras exibem comportamento similar nas combinações de componentes investigadas, sem apresentar isolamento, mas ainda assim, é possível identificar a proximidade entre as replicatas. Ainda que seja possível identificar estes grupos de amostra com base nos canais observados, as imagens foram submetidas à análise de similaridade no espaço de cor L\*a\*b.

Através da abordagem utilizando o espaço cor L\*a\*b foi possível determinar o coeficiente de similaridade de cada uma das cores tendo como referência as imagens adquiridas com lâminas não modificadas (branco) anexadas à câmera embutida do *smartphone*, na configuração descrita na seção 4.12.

**Tabela 7.** Similaridades de cores determinadas através da distância Euclidiana no espaço de cores Lab. Para cada amostra observada na tabela, 5 replicatas foram investigadas para cada cor exibida. Índice de similaridade ( $\Delta E$ ) e desvio-padrão (SD) das quintuplicatas.

	APTES 0,1 %		APTES 2,0 %		Eugenol-silano	
	$\Delta E$	SD	$\Delta E$	SD	$\Delta E$	SD
	0,48	0,30	0,60	0,24	0,48	0,19
	0,38	0,15	0,67	0,34	0,58	0,25
	0,68	0,33	0,61	0,40	0,40	0,21
	0,63	0,38	0,46	0,18	0,55	0,17
	0,71	0,35	0,64	0,50	0,49	0,16
	0,46	0,15	0,64	0,35	0,64	0,19
	0,53	0,22	0,43	0,20	0,32	0,15
	0,63	0,34	0,47	0,35	0,44	0,26

A partir dos resultados expostos na Tabela 7 é possível identificar alta similaridade entre as cores das imagens adquiridas utilizando substratos modificados e não modificados. Os substratos modificados apresentaram a capacidade de captar as cores investigadas sem quaisquer variações perceptíveis ao olho humano, quando comparado à imagem utilizada como referência. Nestas condições experimentais, isso pode indicar a aplicabilidade dos sistemas na proteção de materiais ópticos, ao menos àqueles que operam na região visível do espectro eletromagnético, sem o comprometimento da qualidade óptica.

Através dos resultados de percepção de cores é possível identificar que as cores apresentaram, em geral, grande similaridade, conforme Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados coletados a partir de formulário de percepção de cores. Os dados estão organizados conforme respostas do grupo limitado (N = 33; 18-40 anos, sem especificidades de visão, respondendo por *smartphone*).

	Grupo limitado (N = 33)			Grupo limitado (N = 33)			
	Percentual de percepção: <i>cores idênticas</i>			Percentual de percepção: <i>com muita atenção nota-se alguma diferença</i>			
	APTES 0,1 %	APTES 2,0 %	Eugenol- silano	APTES 0,1 %	APTES 2,0 %	Eugenol- silano	
	84	74	68		16	23	26
	84	77	77		13	19	13
	84	48	87		16	32	13
	74	61	65		26	39	23

Conforme os resultados da pesquisa, a maior parte das pessoas percebe as cores controle e amostra como idênticas e, em alguns casos, com leve diferença, necessitando de uma observação atenta para que seja verificada. Em geral, a soma destes dois níveis de percepção corresponde a mais de 80 % das respostas, ou seja, 80 % das pessoas percebem as imagens como idênticas e/ou bastante parecidas. Ao extrapolar a análise para o grupo inteiro de respostas, ou seja, sem faixa etária, condição visual, e

dispositivo de visualização definidos, é possível verificar a mesma tendência observada para o grupo limitado, conforme Tabela 9, a seguir.

**Tabela 9.** Resultados coletados a partir de formulário de percepção de cores. Os dados estão organizados conforme respostas do grupo geral (N = 159; 18-70 anos, com e sem especificidades de visão, respondendo por diversos dispositivos).

	Grupo estendido (N = 159)				Grupo estendido (N = 159)		
	Percentual de percepção: <i>cores idênticas</i>				Percentual de percepção: <i>com muita atenção nota-se alguma diferença</i>		
	APTES 0,1 %	APTES 2,0 %	Eugenol- silano		APTES 0,1 %	APTES 2,0 %	Eugenol- silano
	87	80	79		12	17	19
	87	77	87		12	20	11
	87	66	86		12	25	13
	84	76	73		14	21	15

Em ambos os grupos, as amostras apresentam grande ou total similaridade à exceção da amostra verde coletada por lente modificada com APTES 2,0%, à qual, em ambos os grupos, menos vezes foi atribuída a percepção de *cores idênticas*. Isso parece estar em concordância ao valor de  $\Delta E$  (Tabela 7), cuja variabilidade se aproxima ao intervalo no qual *com atenção, diferença entre as amostras pode ser observada*.

É importante observar que o experimento de percepção não manteve parâmetros como distância de observação, iluminação externa; brilho de tela e tempo de observação fixos e constantes, por se tratar de uma pesquisa online.

Desta forma, ao final das análises de similaridade de cores, ambas as abordagens, isto é, distância Euclidiana no espaço de cor  $L^*a^*b$ , e percepção humana, indicam que as lentes modificadas apresentam a manutenção de parâmetros de cor, saturação e luminância, sendo, sob as condições experimentais investigadas e frente aos critérios observados, potencialmente aplicáveis a componentes ópticos para captação de imagens na região do visível.

## 6. Conclusões

As abordagens desenvolvidas nesta tese possibilitaram a investigação da influência das condições reacionais do processo sol-gel de superfície, sobre as propriedades dos recobrimentos produzidos e, conseqüentemente os efeitos destas sobre a capacidade de inibição de adesão de *A. niger* sobre os materiais modificados. A utilização do processo sol-gel em superfície, como estratégia para produção de filmes finos funcionalizados, possibilitou a aplicação de organossilanos, como (3-aminopropil)trióxido de silício, para modificação da superfície de componentes ópticos, servindo como agente de retenção de compostos com potencial antifúngico, como eugenol, promovendo a produção de recobrimento com atividade inibitória a fungos. Cabe ressaltar que a utilização de *A. niger* como fungo-modelo permitiu investigações sobre abordagens para inibição da interação fungo-vidro, estabelecendo protocolos e conceitos que podem ser aplicados em estudos focados na inibição de interações polimicrobianas com substratos desta natureza.

A potencialidade de aplicação dos recobrimentos, desenvolvidos na presente tese, a componentes ópticos de operação na região visível do espectro eletromagnético, pode ser verificada através da manutenção da transmitância de radiação na faixa de 400 a 700 nm e, ratificadas, a partir de investigações que expuseram a manutenção de diferentes características de imagens adquiridas utilizando dispositivos modificados com estes recobrimentos.

Por fim, a presente tese elucidou algumas questões essenciais para a produção de nanopartículas de sílica através do método de Stöber, assim como a manipulação de sua composição a fim de produzir nanomateriais híbridos com atividade contra *A. niger*. A elaboração desses materiais se estabelece como a etapa base para a produção de filmes finos nanoestruturados de caráter híbrido, compostos de nanopartículas de sílica modificadas com agentes antifúngicos depositadas em camadas através de processo sol-gel de superfície, sobre componentes ópticos.

Desta forma, a presente tese alega que através da combinação de processo sol-gel em superfície e incorporação de composto natural com propriedades antifúngica, é possível elaborar recobrimentos transparentes capazes de inibir a adesão fúngica, com potencial aplicabilidade para componentes ópticos.

## 7. Referências bibliográficas

1. Mongardini, J. *Global Smartphones Sales May Have Peaked*; International Monetary Fund: S.I., 2020.
2. Turner, J. S.; McLennan, E. I.; Rogers, J. S.; Matthaei, E. ;*Nature* **1946**, *158*, 469.
3. Dannemiller, K. C.; Weschler, C. J.; Peccia, J. ;*Indoor Air* **2017**, *27*, 354.
4. Nastasi, N.; Haines, S. R.; Xu, L.; da Silva, H.; Divjan, A.; Barnes, M. A.; Rappleye, C. A.; Perzanowski, M. S.; Green, B. J.; Dannemiller, K. C. ;*Build. Environ.* **2020**, *174*, 106774.
5. Abdel-Hafez, S. I. I.; Shoreit, A. A. M.; Abdel-Hafez, A. I. I.; E.-Maghraby, O. M. O. ;*Mycopathologia* **1986**, *93*, 25.
6. Gutarowska, B.; Szulc, J.; Nowak, A.; Otlewska, A.; Okrasa, M.; Jachowicz, A.; Majchrzycka, K. ;*Int. J. Environ. Res. Public. Health* **2018**, *15*, 877.
7. Trikojus, V. M. ;*Nature* **1946**, *158*, 472.
8. Dórea, J. G.; Farina, M.; Rocha, J. B. T. ;*J. Appl. Toxicol.* **2013**, *33*, 700.
9. Kern, J. K.; Geier, D. A.; Homme, K. G.; Geier, M. R. ;*Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2020**, *74*, 103312.
10. Teitell, L.; Berk, S. ;*Ind. Eng. Chem.* **1952**, *44*, 1088.
11. Berk, S.; Teitell, L. ;*Ind. Eng. Chem.* **1954**, *46*, 778.
12. Cordero, I. ;*Community Eye Health* **2014**, *27*, 17.
13. Cordero, I. ;*Community Eye Health* **2013**, *26*, 57.
14. Cordero, I. ;*Community Eye Health* **2010**, *23*, 57.
15. Watkins, R. ;*Community Eye Health* **2003**, *16*, 28.
16. Asp, A. J.; Webber, C. M.; Nicolai, E. N.; Martínez-Gálvez, G.; Marks, V. S.; Ben-Abraham, E. I.; Wilson, J. W.; Lujan, J. L. ;*Ann. Glob. Health* **2020**, *86*, 16.
17. Mezzari, A.; Perin, C.; Santos Júnior, S. A.; Bernd, L. A. G. ;*Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **2002**, *44*, 269.
18. Gadd, G. M.; Rhee, Y. J.; Stephenson, K.; Wei, Z. ;*Environ. Microbiol. Rep.* **2012**, *4*, 270.
19. De Leo, F.; Isola, D. ;*Appl. Sci.* **2022**, *12*, 10490.
20. Wolińska, A.; Podlewski, J.; Słomczewski, A.; Grządział, J.; Gałązka, A.; Kuźniar, A. ;*Front. Microbiol.* **2022**, *12*, 799378.
21. Wainwright, M. ;*Trans. Br. Mycol. Soc.* **1988**, *90*, 159.
22. Ehrlich, H. ;*Earth-Sci. Rev.* **1998**, *45*, 45.
23. Lutgens, F. K.; Tarbuck, E. J. *Essentials of geology*; 11th ed.; Prentice Hall: Boston, 2012.
24. Quach, N. T.; Ngo, C. C.; Nguyen, T. H.; Nguyen, P. L.; Vu, T. H. N.; Phan, T. H. T.; Nguyen, Q. H.; Le, T. T. M.; Chu, H. H.; Phi, Q.-T. ;*Sci. Rep.* **2022**, *12*, 11411.
25. Weaver, J. L.; DePriest, P. T.; Plymale, A. E.; Pearce, C. I.; Arey, B.; Koestler, R. J. ;*Npj Mater. Degrad.* **2021**, *5*, 11.
26. Carmona, N.; Laiz, L.; Gonzalez, J. M.; Garcia-Heras, M.; Villegas, M. A.; Saiz-Jimenez, C. ;*Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2006**, *58*, 155.
27. Krumbein, W. E.; Urzì, C. E.; Gehrman, C. ;*Geomicrobiol. J.* **1991**, *9*, 139.
28. Gorbushina, A. A.; Palinska, K. A. .
29. Macedo, M. F.; Vilarigues, M. G.; Coutinho, M. L. ;*Appl. Sci.* **2021**, *11*, 9552.
30. Hiromoto, S. In *Metals for Biomedical Devices*; Elsevier, 2019; pp. 131–152.
31. Vicklund, R. E. ;*Ind. Eng. Chem.* **1946**, *38*, 774.
32. Richards, O. W. ;*J. Bacteriol.* **1949**, *58*, 453.
33. Tajiki, F.; Asgari, H. M.; Zamani, I.; Ghanbari, F. ;*Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 17799.

34. Haas, D.; Ilieva, M.; Fritz, T.; Galler, H.; Habib, J.; Kriso, A.; Kropsch, M.; Ofner-Kopeinig, P.; Reinthaler, F. F.; Strasser, A.; Zentner, E.; Schalli, M. ;*Sci. Total Environ.* **2023**, *892*, 164700.
35. Parkinson, S. M.; Wainwright, M.; Killham, K. ;*Mycol. Res.* **1989**, *93*, 529.
36. Ngo, C. C.; Nguyen, Q. H.; Nguyen, T. H.; Quach, N. T.; Dudhagara, P.; Vu, T. H. N.; Le, T. T. X.; Le, T. T. H.; Do, T. T. H.; Nguyen, V. D.; Nguyen, N. T.; Phi, Q.-T. ;*Appl. Sci.* **2021**, *11*, 5351.
37. Soni, A.; Brightwell, G. ;*Foods* **2022**, *11*, 844.
38. Mahanta, U.; Khandelwal, M.; Deshpande, A. S. ;*J. Mater. Sci.* **2021**, *56*, 17915.
39. Filippovich, S. Yu.; Bachurina, G. P. ;*Appl. Biochem. Microbiol.* **2022**, *58*, 507.
40. Lepore, E.; Giorcelli, M.; Saggese, C.; Tagliaferro, A.; Pugno, N. ;*J. Mater. Res.* **2013**, *28*, 976.
41. Ensikat, H. J.; Ditsche-Kuru, P.; Neinhuis, C.; Barthlott, W. ;*Beilstein J. Nanotechnol.* **2011**, *2*, 152.
42. Marmur, A. ;*Langmuir* **2004**, *20*, 3517.
43. Kelleher, S. M.; Habimana, O.; Lawler, J.; O' Reilly, B.; Daniels, S.; Casey, E.; Cowley, A. ;*ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 14966.
44. Román-Kustas, J.; Hoffman, J. B.; Alonso, D.; Reed, J. H.; Gonsalves, A. E.; Oh, J.; Hong, S.; Jo, K. D.; Dana, C. E.; Alleyne, M.; Miljkovic, N.; Cropek, D. M. ;*Microchem. J.* **2020**, *158*, 105089.
45. Jenkins, J.; Mantell, J.; Neal, C.; Gholinia, A.; Verkade, P.; Nobbs, A. H.; Su, B. ;*Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1626.
46. Ivanova, E. P.; Hasan, J.; Webb, H. K.; Truong, V. K.; Watson, G. S.; Watson, J. A.; Baulin, V. A.; Pogodin, S.; Wang, J. Y.; Tobin, M. J.; Löbbe, C.; Crawford, R. J. ;*Small* **2012**, *8*, 2489.
47. Vera-González, N.; Shukla, A. ;*Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 538602.
48. Zada, T.; Reches, M.; Mandler, D. ;*J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2020**, *95*, 609.
49. Nayak, N.; Huertas, R.; Crespo, J. G.; Portugal, C. A. M. ;*Sep. Purif. Technol.* **2019**, *229*, 115674.
50. Karade, V. C.; Sharma, A.; Dhavale, R. P.; Dhavale, R. P.; Shingte, S. R.; Patil, P. S.; Kim, J. H.; Zahn, D. R. T.; Chougale, A. D.; Salvan, G.; Patil, P. B. ;*Sci. Rep.* **2021**, *11*, 5674.
51. Sypabekova, M.; Hagemann, A.; Rho, D.; Kim, S. ;*Biosensors* **2022**, *13*, 36.
52. Gobbo, V. A.; Parihar, V. S.; Prato, M.; Kellomäki, M.; Vernè, E.; Spriano, S.; Massera, J. ;*Ceram. Int.* **2023**, *49*, 1261.
53. Bao, T.; Wang, S.; Zhang, N.; Zhang, J. ;*J. Chromatogr. A* **2021**, *1645*, 462130.
54. Iler, R. K. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1972**, *38*, 496.
55. Hwang, J.; Ahn, Y. ;*Bull. Korean Chem. Soc.* **2015**, *36*, 391.
56. Sriramulu, D.; Reed, E. L.; Annamalai, M.; Venkatesan, T. V.; Valiyaveetil, S. ;*Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35993.
57. Park, E. J.; Sim, J. K.; Jeong, M.-G.; Seo, H. O.; Kim, Y. D. ;*RSC Adv.* **2013**, *3*, 12571.
58. Chi, F.; Zeng, Y.; Liu, C.; Liang, D.; Li, Y.; Xie, R.; Pan, N.; Ding, C. ;*ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 16887.
59. Knowles, B. R.; Wagner, P.; Maclaughlin, S.; Higgins, M. J.; Molino, P. J. ;*ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 18584.
60. Tamanna, T.; Landersdorfer, C. B.; Ng, H. J.; Bulitta, J. B.; Wood, P.; Yu, A. ;*Appl. Nanosci.* **2018**, *8*, 1471.
61. Kanugala, S.; Jinka, S.; Puvvada, N.; Banerjee, R.; Kumar, C. G. ;*Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6198.

62. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26*, 62.
63. Ghimire, P. P.; Jaroniec, M. ;*J. Colloid Interface Sci.* **2021**, *584*, 838.
64. Dos Santos Da Silva, A.; Dos Santos, J. H. Z. ;*Adv. Colloid Interface Sci.* **2023**, *314*, 102888.
65. Singh, L. P.; Bhattacharyya, S. K.; Kumar, R.; Mishra, G.; Sharma, U.; Singh, G.; Ahalawat, S. ;*Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *214*, 17.
66. Teitell, L.; Berk, S. ;*Ind. Eng. Chem.* **1952**, *44*, 1088.
67. NCCLS NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada. Documento M38-A do NCCLS*; 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
68. Ferreira, J. A. G.; Penner, J. C.; Moss, R. B.; Haagensen, J. A. J.; Clemons, K. V.; Spormann, A. M.; Nazik, H.; Cohen, K.; Banaei, N.; Carolino, E.; Stevens, D. A. ;*PLOS ONE* **2015**, *10*, e0134692.
69. Pasternack, R. M.; Rivillon Amy, S.; Chabal, Y. J. ;*Langmuir* **2008**, *24*, 12963.
70. Xiang, S.; Xing, G.; Xue, W.; Lu, C.; Lin, J.-M. ;*The Analyst* **2012**, *137*, 1669.
71. Schlecht, C. A.; Maurer, J. A. ;*RSC Adv.* **2011**, *1*, 1446.
72. Wang, W.; Vaughn, Mark. W. ;*Scanning* **2008**, *30*, 65.
73. Pujari, S. P.; Scheres, L.; Marcelis, A. T. M.; Zuilhof, H. ;*Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 6322.
74. Kim, J.; Seidler, P.; Wan, L. S.; Fill, C. ;*J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *329*, 114.
75. Chaganti, L. K.; Venkatakrisnan, N.; Bose, K. ;*Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20181764.
76. Rodembusch, F. S.; Leusin, F. P.; da Costa Medina, L. F.; Brandelli, A.; Stefani, V. ;*Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 254.
77. Rahman, I. A.; Vejayakumaran, P.; Sipaut, C. S.; Ismail, J.; Chee, C. K. ;*Ceram. Int.* **2008**, *34*, 2059.
78. Bogush, G. H.; Zukoski, C. F. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 1.
79. Van Blaaderen, A.; Van Geest, J.; Vrij, A. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *154*, 481.
80. Lee, K.; Look, J.-L.; Harris, M. T.; McCormick, A. V. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *194*, 78.
81. Nagao, D.; Kon, Y.; Satoh, T.; Konno, M. ;*J. Chem. Eng. Jpn.* **2000**, *33*, 468.
82. Parnell, S. R.; Washington, A. L.; Parnell, A. J.; Walsh, A.; Dalgliesh, R. M.; Li, F.; Hamilton, W. A.; Prevost, S.; Fairclough, J. P. A.; Pynn, R. ;*Soft Matter* **2016**, *12*, 4709.
83. Giesche, H. ;*J. Eur. Ceram. Soc.* **1994**, *14*, 189.
84. Lecloux, A. J.; Bronckart, J.; Noville, F.; Dodet, C.; Marchot, P.; Pirard, J. P. ;*Colloids Surf.* **1986**, *19*, 359.
85. Pinto, E.; Vale-Silva, L.; Cavaleiro, C.; Salgueiro, L. ;*J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 1454.
86. Olea, A.; Bravo, A.; Martínez, R.; Thomas, M.; Sedan, C.; Espinoza, L.; Zambrano, E.; Carvajal, D.; Silva-Moreno, E.; Carrasco, H. ;*Molecules* **2019**, *24*, 1239.
87. de Oliveira Pereira, F.; Mendes, J. M.; de Oliveira Lima, E. ;*Med. Mycol.* **2013**, *51*, 507.
88. Schmidt, E.; Jirovetz, L.; Wlcek, K.; Buchbauer, G.; Gochev, V.; Girova, T.; Stoyanova, A.; Geissler, M. ;*J. Essent. Oil Bear. Plants* **2007**, *10*, 421.
89. Ju, J.; Xie, Y.; Yu, H.; Guo, Y.; Cheng, Y.; Zhang, R.; Yao, W. ;*Food Chem.* **2020**, *310*, 125974.
90. Cai, R.; Hu, M.; Zhang, Y.; Niu, C.; Yue, T.; Yuan, Y.; Wang, Z. ;*LWT* **2019**, *106*, 50.

91. Kato, K.; Matsui, T.; Tanaka, S. ;*Appl. Spectrosc.* **1987**, *41*, 861.
92. Haris, P. I.; Severcan, F. ;*J. Mol. Catal. B Enzym.* **1999**, *7*, 207.
93. Schulz, H.; Baranska, M. ;*Vib. Spectrosc.* **2007**, *43*, 13.
94. Freitas, C. S. A.; Maciel, L. F.; Corrêa dos Santos, R. A.; Costa, O. M. M. M.; Maia, F. C. B.; Rabelo, R. S.; Franco, H. C. J.; Alves, E.; Consonni, S. R.; Freitas, R. O.; Persinoti, G. F.; Oliveira, J. V. de C. ;*Environ. Microbiol.* **2022**, *24*, 1430.
95. Miller, L. M.; Bourassa, M. W.; Smith, R. J. ;*Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2013**, *1828*, 2339.
96. Sailer, K. ;*Int. J. Radiat. Biol.* **1996**, *69*, 601.
97. Benedetti, E.; Bramanti, E.; Papineschi, F.; Rossi, I.; Benedetti, E. ;*Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 792.
98. Lipiec, E.; Bambery, K. R.; Heraud, P.; Hirschmugl, C.; Lekki, J.; Kwiatek, W. M.; Tobin, M. J.; Vogel, C.; Whelan, D.; Wood, B. R. ;*J. Mol. Struct.* **2014**, *1073*, 134.
99. Whelan, D. R.; Bambery, K. R.; Heraud, P.; Tobin, M. J.; Diem, M.; McNaughton, D.; Wood, B. R. ;*Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 5439.
100. Whelan, D. R.; Hiscox, T. J.; Rood, J. I.; Bambery, K. R.; McNaughton, D.; Wood, B. R. ;*J. R. Soc. Interface* **2014**, *11*, 20140454.
101. Serec, K.; Šegedin, N.; Krajačić, M.; Dolanski Babić, S. ;*Appl. Sci.* **2021**, *11*, 2360.
102. Sofińska, K.; Wilkosz, N.; Szymoński, M.; Lipiec, E. ;*Molecules* **2020**, *25*, 561.
103. Tajmir-Riahi, H. A.; Theophanides, T. ;*J. Biomol. Struct. Dyn.* **1985**, *3*, 537.
104. Lone, S. A.; Wani, M. Y.; Fru, P.; Ahmad, A. ;*Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1191.
105. Martins, C.; Doran, C.; Laires, A.; Rueff, J.; Rodrigues, A. S. ;*Food Chem. Toxicol.* **2011**, *49*, 385.
106. Atsumi, T.; Fujisawa, S.; Tonosaki, K. ;*Toxicol. In Vitro* **2005**, *19*, 1025.
107. Bhaumik, S.; Anjum, R.; Rangaraj, N.; Pardhasaradhi, B. V. V.; Khar, A. ;*FEBS Lett.* **1999**, *456*, 311.
108. Ju, J.; Lei, Y.; Guo, Y.; Yu, H.; Cheng, Y.; Yao, W. ;*LWT* **2023**, *173*, 114226.
109. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book*; Gold, V., Ed.; 4th ed.; International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): Research Triangle Park, NC, 2019.
110. Zhao, J.; Ji, S.; Chen, Y.; Guo, H.; Yang, P. ;*Phys Chem Chem Phys* **2012**, *14*, 8803.
111. Sedgwick, A. C.; Wu, L.; Han, H.-H.; Bull, S. D.; He, X.-P.; James, T. D.; Sessler, J. L.; Tang, B. Z.; Tian, H.; Yoon, J. ;*Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 8842.
112. Bogush, G. H.; Zukoski, C. F. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 1.
113. Bogush, G. H.; Zukoski, C. F. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1991**, *142*, 19.
114. Bogush, G. H.; Tracy, M. A.; Zukoski, C. F. ;*J. Non-Cryst. Solids* **1988**, *104*, 95.
115. Van Blaaderen, A.; Van Geest, J.; Vrij, A. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *154*, 481.
116. Boukari, H.; Lin, J. S.; Harris, M. T. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *194*, 311.
117. Park, S. K.; Kim, K. D.; Kim, H. T. ;*Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2002**, *197*, 7.
118. Green, D. L.; Lin, J. S.; Lam, Y.-F.; Hu, M. Z.-C.; Schaefer, D. W.; Harris, M. T. ;*J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *266*, 346.
119. Wang, X.-D.; Shen, Z.-X.; Sang, T.; Cheng, X.-B.; Li, M.-F.; Chen, L.-Y.; Wang, Z.-S. ;*J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *341*, 23.
120. Liau, L. C.-K.; Chen, Y.-T. ;*Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2006**, *286*, 138.

121. Greasley, S. L.; Page, S. J.; Sirovica, S.; Chen, S.; Martin, R. A.; Riveiro, A.; Hanna, J. V.; Porter, A. E.; Jones, J. R. ;*J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *469*, 213.
122. Harris, M. T.; Brunson, R. R.; Byers, C. H. ;*J. Non-Cryst. Solids* **1990**, *121*, 397.
123. Masalov, V. M.; Sukhinina, N. S.; Kudrenko, E. A.; Emelchenko, G. A. ;*Nanotechnology* **2011**, *22*, 275718.
124. Lee, K.; Sathyagal, A. N.; McCormick, A. V. ;*Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **1998**, *144*, 115.
125. Bailey, J. K.; Mecartney, M. L. ;*Colloids Surf.* **1992**, *63*, 151.
126. van Blaaderen, A.; Kentgens, A. P. M. ;*J. Non-Cryst. Solids* **1992**, *149*, 161.
127. Matsoukas, T.; Gulari, E. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *132*, 13.
128. Matsoukas, T.; Gulari, E. ;*J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *124*, 252.
129. Nandy, S.; Kundu, D.; Naskar, M. K. ;*J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2014**, *72*, 49.
130. Vazquez, N. I.; Gonzalez, Z.; Ferrari, B.; Castro, Y. ;*Bol. Soc. Esp. Cerámica Vidr.* **2017**, *56*, 139.
131. Kurdyukov, D. A.; Eurov, D. A.; Kirilenko, D. A.; Sokolov, V. V.; Golubev, V. G. ;*Microporous Mesoporous Mater.* **2018**, *258*, 205.
132. Kim, M.-K.; Ki, D.-H.; Na, Y.-G.; Lee, H.-S.; Baek, J.-S.; Lee, J.-Y.; Lee, H.-K.; Cho, C.-W. ;*Pharmaceutics* **2021**, *13*, 184.
133. Travaglini, L.; Picchetti, P.; Del Giudice, A.; Galantini, L.; De Cola, L. ;*Microporous Mesoporous Mater.* **2019**, *279*, 423.
134. Kosuge, K.; Murakami, T.; Kikukawa, N.; Takemori, M. ;*Chem. Mater.* **2003**, *15*, 3184.
135. Yokoi, T.; Wakabayashi, J.; Otsuka, Y.; Fan, W.; Iwama, M.; Watanabe, R.; Aramaki, K.; Shimojima, A.; Tatsumi, T.; Okubo, T. ;*Chem. Mater.* **2009**, *21*, 3719.
136. Carrillo-Pesqueira, F. J.; Carrillo-Torres, R. C.; Álvarez-Ramos, M. E.; Hernández-Paredes, J. ;*Microsc. Microanal.* **2018**, *24*, 1098.
137. Kobler, J.; Möller, K.; Bein, T. ;*ACS Nano* **2008**, *2*, 791.
138. Ruhemann, S. ;*J Chem Soc Trans* **1910**, *97*, 2025.
139. Ruhemann, S. ;*J Chem Soc Trans* **1911**, *99*, 1486.
140. Sun, Y.; Kunc, F.; Balhara, V.; Coleman, B.; Kodra, O.; Raza, M.; Chen, M.; Brinkmann, A.; Lopinski, G. P.; Johnston, L. J. ;*Nanoscale Adv.* **2019**, *1*, 1598.
141. Kockmann, A.; Porsiel, J. C.; Saadat, R.; Garnweitner, G. ;*RSC Adv.* **2018**, *8*, 11109.
142. *Polyurethane Chemistry: Renewable Polyols and Isocyanates*; Gupta, R. K.; Kahol, P. K., Eds.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2021; Vol. 1380.
143. Devendra, R.; Edmonds, N. R.; Söhnel, T. ;*Heliyon* **2020**, *6*, e04074.
144. Levent, E.; Sala, O.; Wilm, L. F. B.; Löwe, P.; Dielmann, F. ;*Green Chem.* **2021**, *23*, 2747.
145. Hostettler, Fritz.; Cox, E. F. ;*Ind. Eng. Chem.* **1960**, *52*, 609.
146. Ni, H.; Nash, H. A.; Worden, J. G.; Soucek, M. D. ;*J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2002**, *40*, 1677.
147. Sokolik, C. G.; Lellouche, J.-P. ;*RSC Adv.* **2018**, *8*, 36712.
148. Bushnell, P. J.; Ehman, K. D. In *Encyclopedia of Toxicology*; Elsevier, 2005; pp. 312–314.
149. Hoch, M. ;*Appl. Geochem.* **2001**, *16*, 719.
150. Gibbs, P. E.; Bryan, G. W. In *Organotin*; Champ, M. A.; Seligman, P. F., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 1996; pp. 259–280.
151. Sardon, H.; Irusta, L.; Fernández-Berridi, M. J. ;*Prog. Org. Coat.* **2009**, *66*, 291.

152. Oda, S.; Masui, Y.; Omura, S.; Imamura, Y.; Takeuchi, Y.; Hosoya, M. ;*Org. Process Res. Dev.* **2022**, *26*, 2519.
153. Kurono, N.; Ohtsuga, K.; Wakabayashi, M.; Kondo, T.; Ooka, H.; Ohkuma, T. ;*J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10312.
154. Ito, M.; Murakami, K.; Yoshino, M. ;*Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 461.
155. Horvathova, E.; Navarova, J.; Galova, E.; Sevcovicova, A.; Chodakova, L.; Snahnicanova, Z.; Melusova, M.; Kozics, K.; Slamenova, D. ;*J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6632.
156. NORIHISA OKADA; ATSUSHI HIRATA; YUKIO MURAKAMI; MASAO SHOJI; HIROSHI SAKAGAMI; SEIICHIRO FUJISAWA ;*Anticancer Res.* **2005**, *25*, 3263.
157. Ishikawa, K.; Matsuya, S.; Miyamoto, Y.; Kawate, K. In *Comprehensive Structural Integrity*; Elsevier, 2003; pp. 169–214.
158. Copeland, H. I.; Brauer, G. M.; Sweeney, W. T.; Forziati, A. F. ;*J. Res. Natl. Bur. Stand.* **1955**, *55*, 133.
159. Williams, D. B. G.; Lawton, M. ;*J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 8351.
160. Kratochvil, Byron.; Zatko, D. A.; Markuszewski, Richard. ;*Anal. Chem.* **1966**, *38*, 770.
161. Manahan, S. E.; Iwamoto, R. T. ;*Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 1409.
162. Olshin, P. K.; Myasnikova, O. S.; Kashina, M. V.; Gorbunov, A. O.; Bogachev, N. A.; Kompanets, V. O.; Chekalin, S. V.; Pulkin, S. A.; Kochemirovsky, V. A.; Skripkin, M. Yu.; Mereshchenko, A. S. ;*Chem. Phys.* **2018**, *503*, 14.
163. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. *Spectrometric identification of organic compounds*; 7th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, 2005.
164. Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. In *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*; Elsevier, 1991; pp. 213–223.
165. Lin-Vien, D.; Colthup, N. B.; Fateley, W. G.; Grasselli, J. G. In *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*; Elsevier, 1991; pp. 117–154.
166. Thirukumaran, P.; Shakila Parveen, A.; Sarojadevi, M. ;*ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 2790.
167. Mahajan, M. S.; Mahulikar, P. P.; Gite, V. V. ;*Prog. Org. Coat.* **2020**, *148*, 105826.
168. Kunc, F.; Balhara, V.; Sun, Y.; Daroszewska, M.; Jakubek, Z. J.; Hill, M.; Brinkmann, A.; Johnston, L. J. ;*The Analyst* **2019**, *144*, 5589.
169. Tabisz, Ł.; Stanek, J.; Łęska, B. ;*Materials* **2020**, *13*, 3088.
170. Fernandes, R. S.; Raimundo, I. M.; Pimentel, M. F. ;*Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2019**, *577*, 1.
171. D02 Committee *Test Method for Water in Ethanol and Hydrocarbon Blends by Karl Fischer Titration*; ASTM International.
172. Plumeré, N.; Ruff, A.; Speiser, B.; Feldmann, V.; Mayer, H. A. ;*J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *368*, 208.
173. Picco, A. S.; Ferreira, L. F.; Liberato, M. S.; Mondo, G. B.; Cardoso, M. B. ;*Nanomed.* **2018**, *13*, 179.

## APÊNDICE A

O protocolo de síntese pelo método de Stöber pode ser modificado a fim de controlar características como o tamanho, a polidispersão e a concentração das nanopartículas de sílica, conforme a aplicação desejada. No entanto, este método possui aspectos essenciais que devem ser observados. A seguir estão elencados alguns pontos interessantes de serem considerados por quem desejar realizar a síntese desses materiais através do método de Stöber. Essas e outras especificidades do método podem ser observadas em detalhe no estudo de revisão elaborado por Da Silva e Dos Santos <sup>64</sup>.

- i. *A pureza do precursor de sílica:* Bogush e col. <sup>114</sup> observaram que a utilização de TEOS sem prévia purificação, resultaria em partículas irregulares e com distribuição bimodal de tamanhos. Porém, ao utilizarem TEOS destilado, partículas esféricas e monodispersas foram produzidas. Esses resultados destacam a necessidade de cuidado no armazenamento e manipulação do reagente, uma vez que, mesmo após destilação, a sua degradação ao longo do tempo pode influenciar na repetibilidade da síntese.
- ii. *A qualidade do solvente:* Tabisz e col. <sup>169</sup> identificaram que a qualidade do solvente pode influir sobre propriedades das partículas. Portanto, é necessário que o solvente adequado seja selecionado, quanto a sua composição e pureza, conforme as características desejadas às partículas. Além disso, é preciso destacar a importância na manutenção do solvente escolhido, para auxiliar na repetibilidade dos experimentos.
- iii. *A presença de água:* Devido a sua influência sobre o meio reacional, atuando como diluente e co-catalisador, é necessário considerar as quantidades de água presente nos demais reagentes (solvente, catalisador, aditivos, etc.) ao se estabelecer o protocolo de síntese <sup>169,170</sup>. Métodos como de titulação podem ser potenciais ferramentas para a quantificação de água em outros componentes da síntese <sup>171</sup>.
- iv. *A qualidade do catalisador (hidróxido de amônio):* Conforme observado por Plumeré e col. <sup>172</sup>, métodos de titulação podem ser aplicados para a determinação da real concentração de amônia em solução, a fim de se obter uma síntese mais reprodutível. Essa estratégia pode se fazer necessária para inibir problemas experimentais associados à perda de catalisador por

evaporação. O armazenamento e a manipulação adequados podem ser alternativas para minimizar erros experimentais;

- v. *Temperatura*: De acordo com o estudo utilizado como referência para o protocolo de síntese, a temperatura do meio reacional pode estar descrita apenas como “temperatura ambiente”, porém este parâmetro pode apresentar intensa influência sobre as propriedades das partículas, conforme as condições de síntese <sup>172</sup>.
- vi. *Métodos de secagem*: Quando a utilização das partículas de sílica se dá em estado sólido, algumas dificuldades podem ser observadas quanto à manutenção das propriedades físicas do material (tamanho e dispersão). Porém, há diferentes métodos de secagem que podem ser aplicados para obtenção das partículas na forma de pó, mantendo suas propriedades <sup>77,173</sup>. A escolha do método deve ser investigada conforme a estrutura disponível e a aplicação desejada.

## APÊNDICE B

O protocolo a seguir dispõe das etapas desenvolvidas para o preparo, purificação e análise do produto investigado através da reação entre eugenol e o organosilano 3-(trietoxisilil)propil isocianato.

- i. 10 mmol de eugenol foram adicionados a frasco tipo Schlenk;
- ii. 8 mL de tolueno seco foram adicionados ao frasco contendo eugenol. A solução foi mantida sob agitação e aquecimento (30 °C);
- iii. 2 mL de acetonitrila seca foram adicionados a outro frasco tipo Schlenk, contendo 0,1 mmol de cloreto de cobre (II) dihidratado;
- iv. A solução de cobre em acetonitrila foi transferida para o frasco contendo a solução de eugenol em tolueno;
- v. A mistura foi mantida a 30 °C por 30 minutos;
- vi. Então, 15 mmol de 3-(trietoxisilil)propil isocianato foram adicionados;
- vii. A reação foi mantida sob agitação, a 30 °C, por 24 horas;
- viii. Após o tempo de reação, o solvente foi removido em sistema de vácuo, utilizando condensador imerso em nitrogênio líquido;
- ix. O material resultante apresentou aspecto de “cera” e coloração amarelo escuro. Este foi mantido sob vácuo, até sua purificação;
- x. O material bruto foi analisado por FTIR-ATR para monitorar duas bandas, em aproximadamente 2271  $\text{cm}^{-1}$  e 1720  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas ao grupo NCO e à ligação uretana, respectivamente. As análises por FTIR-ATR foram executadas junto ao Laboratório de Multiusuário de Análise Térmica (LAMAT), da Central Analítica, do Instituto de Química/UFRGS;
- xi. Após, a amostra foi encaminhada ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Central Analítica, do Instituto de Química/UFRGS, para análise por RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ . A amostra foi preparada em  $\text{CDCl}_3$ ;

A purificação foi feita através de eluição em coluna cromatográfica de sílica gel para cromatografia *flash* (tamanho de partícula: 220 – 400 mesh; 35 – 75  $\mu\text{m}$ ). O preparo da coluna cromatográfica foi feito da seguinte maneira:

- i. Um pedaço pequeno de algodão foi introduzido na coluna para impedir a saída de material sólido pela torneira da vidraria;

- ii. Areia foi adicionada até altura de 5 cm. Essa abordagem garante que a fase estacionária não sofra afunilamento na base da coluna, mantendo seu diâmetro constante, garantindo que as bandas dos compostos sejam eluídas de forma constante por toda a fase estacionária;
- iii. Cerca de 50 mL de hexano p.a. foram adicionados, auxiliando estabilização da camada de areia, e criando uma condição para adição de sílica gel (fase estacionária) de forma branda, sem colisão direta com a camada de areia;
- iv. 90 g de sílica gel foram misturados com aproximadamente 200 mL de hexano (em capela, devido à pulverização da sílica gel em pó). Então, esta mistura foi adicionada aos poucos à coluna. Esta quantidade de sílica proporcionou uma coluna de fase estacionária de 15 cm (essa altura pode variar de acordo com a vidraria utilizada);
- v. Após a decantação da fase estacionária, o solvente foi escoado e mantido 5 cm acima do topo da fase. Então, determinada quantidade de areia foi adicionada, formando uma camada de 2 cm sobre o topo da fase estacionária. Esta camada de areia auxilia a adição da amostra sem a perturbação da fase estacionária, facilitando a eluição constante da amostra;
- vi. Hexano foi adicionado e escoado até tocar o topo da camada de areia, para garantir o melhor empacotamento da coluna. Este procedimento foi repetido cinco vezes. Por se tratar do método *flash*, ou seja, sob pressão, o escoamento do solvente/eluente foi feito sempre sob fluxo de nitrogênio;
- vii. A amostra foi dissolvida em 5 mL de diclorometano e adicionada à coluna de 1 em 1 mL. A cada adição, o solvente foi escoado até o menisco tocar a camada de areia. Ao final das adições, uma banda de coloração amarelo-escura pode ser verificada logo abaixo da camada de areia, ou seja, no topo da fase estacionária (cabeça da coluna);
- viii. A partir deste momento, a amostra passou a ser eluída. Para tal, o eluente hexano:acetato de etila foi utilizado nas proporções de 100:0, 80:20, 60:40 e 20:80. Ao final, a mistura de diclorometano:acetato de etila 50:50 foi utilizada. Para cada composição de eluente, 220 mL foram utilizados. A coleta das frações foi feita em duas frações iniciais de 50 mL atribuídas como volume morto, e quatro frações de 30 mL, denominadas como frações 1-4;

- ix. Após a finalização das eluições, as soluções foram evaporadas em capela, durante 48 horas;
- x. Após evaporação dos solventes, sólido levemente esbranquiçado, com aspecto de cristais em forma de agulha, estava presente nas frações 2-4 do eluente hexano:acetato de etila 60:40. Ao manipular o material, observou-se a consistência de cera.
- xi. O material purificado foi encaminhado ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear para análise por RMN de  $^1\text{H}$  e RMN de  $^{13}\text{C}$ , e à Rede de Cromatografia e Espectrometria de Massas (RCEM) para análise por QToF-MS. Ambos os laboratórios compõem a Central Analítica do Instituto de Química/UFRGS.

## APÊNDICE C

### Pesquisa sobre percepção de cores

Olá!

Desejo que esteja bem.

Quero lhe agradecer pela disponibilidade em participar desta pesquisa. Mas quem sou eu, qual o motivo disso e como isso está estruturado?

Eu me chamo Alan, e estou doutorando pelo programa de pós-graduação em química, no Instituto de Química (IQ-UFRGS). Meu projeto está relacionado à produção de componentes para fotografia. Para testar a percepção humana de cores, este teste está organizado em **duas seções**.

#### Seção 1

Informações sobre características de quem está realizando o teste, e qual o dispositivo utilizado para isso.

#### Seção 2

16 duplas de cores serão exibidas para que você possa definir o quão similares/diferentes elas são.

**Importante!** Tudo isso é sobre a sua percepção, portanto não há certo ou errado. Aqui, há apenas você me contando sobre como enxerga as coisas.

Caso queira saber mais sobre o projeto, meu email é: alan.silva@ufrgs.br. Sinta-se confortável para entrar em contato.

Com carinho,  
Alan.

---

#### Qual a sua idade?

Por favor, responda utilizando **apenas números**, ou seja, se você tem 20 anos, responda **20**

---

**Você possui alguma(s) destas especificidades relacionada à sua visão?**

*Marque todas que se aplicam.*

- ECTASIAS DE CÓRNEA
  - AMETROPIA
  - MIOPIA
  - HIPERMETROPIA
  - ASTIGMATISMO
  - PRESBIOPIA
  - CATARATA
  - GLAUCOMA
  - DALTONISMO
  - NENHUMA
  - Outro: \_\_\_\_\_
- 

**Em que tipo de dispositivo você está realizando este teste?**

Descrição:

**Se possível**, peço que neste momento, você **coloque o brilho da tela do seu dispositivo no máximo**. Além disso, verifique e **desative modos como "leitura", "noturno", "filtro azul"**, para evitar que a tela fique com coloração amarelada/avermelhada.

**Importante:** caso qualquer uma destas ações lhe cause algum desconforto/irritação, retorne às configurações que são mais confortáveis para você.

*Marcar apenas uma oval.*

- Notebook
  - Computador de mesa (PC, CPU, Desktop)
  - Tablet
  - Smartphone
- 

**Percepção de cores.** Existe diferença entre as cores 1 e 2?

Considere a escala de similaridade definida de 1 a 5, onde:

- 1** - Não é possível observar diferença entre as cores;
- 2** - Com muita atenção é possível notar alguma diferença entre as cores;
- 3** - Olhando rapidamente já é possível notar diferença entre as cores;
- 4** - É possível notar uma grande diferença entre as cores;
- 5** - São cores totalmente diferentes;

