



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

ROSELY MAIER-QUEIROZ

DESENVOLVIMENTO DE FILME BIOINSPIRADO NA
SUPERFÍCIE SUPER-HIDROFÓBICA DA *Colocasia esculenta* (L.)
Schott PARA RECOBRIMENTOS FUNCIONAIS ESTRUTURAIS

Recife

2020

ROSELY MAIER-QUEIROZ

**DESENVOLVIMENTO DE FILME BIOINSPIRADO NA
SUPERFÍCIE SUPER-HIDROFÓBICA DA *Colocasia esculenta* (L.)
Schott PARA RECOBRIMENTOS FUNCIONAIS ESTRUTURAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciência de Materiais como dos requisito
parcial para obtenção do título de Doutor em
Ciência de Materiais pela Universidade Federal de
Pernambuco.

Área de Concentração: Materiais Não Metálicos

Orientador: Prof. Dr. Petrus d'Amorim Santa Cruz Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Severino Alves Junior

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária Monick Raquel Silvestre da S. Portes, CRB4-1217

M217d Maier-Queiroz, Rosely
Desenvolvimento de filme bioinspirado na superfície super-hidrofóbica da colocasia esculenta (L.) Schott para recobrimentos funcionais estruturais / Rosely Maier-Queiroz. – 2020.
141 f.: il., fig., tab.

Orientador: Petrus d'Amorim Santa Cruz Oliveira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Ciência de Materiais, Recife, 2020.
Inclui referências e apêndices.

1. Materiais não-metálicos. 2. Bactericida estrutural. I. Oliveira, Petrus d'Amorim Santa Cruz (orientador). II. Título.

620.19 CDD (23. ed.) UFPE - CCEN 2021 – 101

ROSELY MAIER-QUEIROZ

DESENVOLVIMENTO DE FILME BIOINSPIRADO NA SUPERFÍCIE SUPER-HIDROFÓBICA DA *Colocasia esculenta* (L.) Schott PARA RECOBRIMENTOS FUNCIONAIS ESTRUTURAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 14/08/2020.

BANCA EXAMINADORA

Participação via Videoconferência

Profº. Dr. Petrus D'Amorim Santa Cruz Oliveira (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Participação via Videoconferência

Profº. Dr. André Galembeck (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Participação via Videoconferência

Profª. Drª. Yêda Medeiros Bastos de Almeida (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Participação via Videoconferência

Profº. Dr. Antônio Eduardo Martinelli (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Participação via Videoconferência

Profª. Drª. Norma Buarque de Gusmão (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Helena (in memorian) e José, à Tia Maria e ao meu esposo Patrick.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por se fazer presente na minha vida por me guiar, me dar sabedoria e me fortalecer nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, minha por sempre me estimular a estudar e a correr atrás dos meus objetivos, e a pai pelo apoio e paciência. Sou eternamente grata pela educação que me ofereceram, e por terem me ensinado que não se consegue nada sem esforço.

Agradeço ao meu esposo, Patrick, pela cumplicidade, paciência, e pelo amor.

Agradeço à Tia Maria pelo apoio, palavras de sabedoria e de fé e pelo carinho e aos meus primos Magda, Marcus e Mayza pela amizade.

Agradeço aos meus amigos Janilson, Edielen, Karollyne, Mário, Alfredo, Patrícia e Karina Carvalho, pelas palavras de apoio quando precisei, companheirismo e amizade.

Agradeço aos órgãos de fomento e à CAPES pelo financiamento desse trabalho de tese. Agradeço ao meu orientador Prof. Petrus Santa-Cruz por ter me aceitado como aluna de doutorado enquanto eu trabalhava, por ter se esforçado em transmitir as aulas à distância e por ter me orientado e me ajudado a desenvolver a minha tese.

Agradeço ao meu coorientador professor Severino Alves Junior, por me receber como aluna e por contribuir com o desenvolvimento deste trabalho. Também agradeço aos seus alunos Leonis, Yago, Leandro e Dominique e aos demais do BSTR por me auxiliar quando precisei.

Agradeço ao Professor Eduardo Falcão pela paciência, e pelos conselhos e incentivos, serei sempre grata.

Agradeço ao professor Silvio Melo por nos ajudar a desenvolver o software TopoSlicer® que foi uma das ferramentas desenvolvidas e usadas neste trabalho.

Agradeço à professora Magda Vieira, Prof. Severino Urtiga e a Rafael por nos permitir usar o goniômetro todas as vezes que precisamos.

Agradeço à Professora Norma Gusmão e à Nicole pela colaboração, por nos ajudar a desenvolver um protocolo para nossos testes microbiológicos, e por permitir a utilização dos equipamentos no departamento de antibióticos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Carolina, Sueli, Karina, Fátima, Bruna, Abissal, Felipe e à Elibe por colaborarem com o desenvolvimento do meu trabalho.

Agradeço aos meus colegas da central analítica, Eliete, Elaine, Seu Severino e Elias, pelo auxílio na utilização dos equipamentos da central analítica.

Agradeço ao professor André Galembeck por permitir que eu utilizasse o MEV e por me emprestar o Software de produção de imagem de MEV em 3D, durante meus experimentos.

Agradeço ao Prof. Breno Sampaio e ao Prof. Patrick Kampkötter do dept° de Economia (UFPE e Tü) por me permitir usar a sala de alunos para escrever minha tese e a todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento da minha tese.

RESUMO

A super-hidrofobicidade observada nas folhas de algumas plantas, conhecida como “Efeito Lótus”, ocorre devido à presença de estruturas hierárquicas nano/micro em suas superfícies. Neste trabalho de Tese foi preparado um filme hidrofóbico sintético bioinspirado nas folhas da *Colocasia esculenta* (L.) Schott. Propõe-se aqui a impressão dessas superfícies para aplicações biomédicas. A *C. esculenta* (L.) Schott foi escolhida como template devido a sua abundância em regiões tropicais e a sua característica super-hidrofóbica. O filme desenvolvido pode ser utilizado para proteção de adesivos transdérmicos quanto à umidade e de um modo geral, à redução da aderência bacteriana em substratos sólidos, que resultem na inibição de formação de biofilme. Deste modo, ele pode ser utilizado como uma alternativa ao uso de antibióticos, que contribui para o aumento da resistência bacteriana. A etapa inicial utilizada para produção das estruturas sintéticas bioinspiradas foi avaliar o comportamento hidrofóbico de diferentes superfícies poliméricas produzidas via *soft lithography*. Foram produzidos moldes negativos das folhas da *C. esculenta* com PLA, PDMS e poliacrilato fotopolimerizável, e réplicas (positivas) com o PVB. Os resultados das medidas de ângulos de contato, que apresentaram ângulos de 125° e 124° quando produzidas a partir de moldes de PDMS e poliacrilato respectivamente, sugerem que esses dois polímeros são os mais adequados para a produção de moldes negativos via *soft lithography*. Foi montada uma “biofábrica de templates” utilizando-se a hidroponia para produção controlada em laboratório das folhas utilizadas como biomoldes, permitindo-se controlar o estresse hídrico como parâmetro modificador das estruturas hierárquicas utilizadas. Para viabilizar a impressão *Drop-on-Demand* (DoD) dessas estruturas, foi desenvolvido um software para uso de micrografias como moldes digitais. Esse software converte imagens de AFM (2D) em fatias (2D) para impressão *Layer-by-Layer* (LbL) de superfícies em 3D. As superfícies bioinspiradas foram utilizadas no desenvolvimento de testes microbiológicos para avaliar o efeito antibacteriano estrutural proposto, que apresentou uma redução da adesão de *S. aureus* em 24%, mas um aumento da adesão da *E. coli* em 14%. Esses resultados indicam que fatores como formato da bactéria, tipo de parede celular e o mecanismo de adesão devem ser considerados no desenvolvimento dos bactericidas estruturais propostos. Para avaliação preliminar de uso em adesivos carreadores transdérmicos de fármacos através de compósitos PVB/Fármaco@carreador, escolheu-se o Lapachol como fármaco-modelo, e sintetizou-se os adsorventes ZIF-8, MCM-48-APTES e HKUST como carreadores, identificando-se o HKUST como o mais indicado para adsorver o fármaco nas condições testadas.

Palavras-chave: Superfície super-hidrofóbica. *Soft lithography*. Bactericida estrutural. Bioinspiração.

ABSTRACT

The super-hydrophobicity observed on the surfaces of some plants' leaves, known as "Lotus Effect", occurs due to the presence of hierarchical nano/microstructures on their surfaces. Within the scope of this PhD thesis, we created a synthetic hydrophobic film bioinspired by the leaves of *Colocasia esculenta* (L.) Schott. It is proposed here to print these surfaces for biomedical applications. This plant was chosen as a template due to its abundance in tropical regions and its superhydrophobic behavior. The developed film can be applied for protecting transdermal adhesives against humidity and bacterial adhesion on solid substrates, resulting in an inhibition of biofilm formation. It can hence serve to decrease antibiotics usage, which has led to bacterial resistance. The first step of the development process was to evaluate the non-wetting behavior of different polymer surfaces produced via soft lithography. We produced negative molds of *C. esculenta* leaves with PLA, PDMS and UV-curing polyacrylate, and positive replicas with PVB. Results of contact angle measurements, which showed contact angles of 125° and 124° for PDMS and polyacrylate negative molds, respectively, suggested these two polymers to be the most suitable. We established a "biofactory of templates" using hydroponics for leave production in controlled laboratory conditions, thereby allowing for control of hydric stress as a parameter to modify the hierarchical structures. We furthermore developed a software to be able to employ micrographs of these structures as digital templates for *DoD* printing. This software converts 2D AFM images to 2D slices, which can then be used for *Layer-by-Layer* (LbL) printing of 3D surfaces. We used the bioinspired surface to perform microbiological tests to assess its antibacterial effect, which showed a 24% reduction in *S. aureus* adhesion but a 14% increase in *E. coli* adhesion. Results thus indicate that factors such as bacterial shape, type of cell wall, and the mechanism of adhesion need to be considered when developing structural antibacterial surfaces. For a preliminary evaluation of the use in transdermal drug carrier adhesives using PVB/drug@carrier composites, Lapachol was chosen as the model drug and ZIF-8, MCM-48-APTES and HKUST adsorbents were synthesized as carriers, identifying HKUST as the most suitable for drug adsorption under the tested conditions.

Keywords: Superhydrophobic surface. Soft lithography. Structural Bactericide. Bioinspiration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema da série de experimentos desenvolvidos	27
Figura 2 –	Estruturas encontradas na natureza. Quatro tipos de propriedades biológicas que são encontradas na natureza. a) Propriedades autolimpantes: folha de lótus, pena de pato e olhos de mosquitos (da esquerda para a direita). b) Propriedades mecânicas: as patas do gecko, tentáculos de polvo, e strider aquático. c) Coloração devido à estrutura: pena de pavão, asa de borboleta, e carapaça de besouros. d) Propriedades Óticas: Asas de cigarra, componente dos olhos de traça, esporo de esponja. Em cada caso, primeiro é mostrado na primeira linha uma foto da característica, na segunda linha imagens de MEV da estrutura micrométrica e na terceira linha, da estrutura nanométrica	29
Figura 3 –	Exemplos de materiais bioinspirados em estruturas hierárquicas presentes na natureza disponíveis no mercado. a) Linha de sombras bioinspiradas LUCI da L’Oréal Paris (Fonte: LUCI-L’Oréal). b) Um adesivo GeckSkin de 43 cm ² sustentando uma TV de 42 polegadas e outro adesivo GeckSkin10x10 cm sustentando um peso de 135 kg da (esquerda para a direita) ambos fixos em substrato de vidro	30
Figura 4 –	Visão geral de estruturas presentes na biodiversidade e suas potenciais aplicações	32
Figura 5 –	Folha de lótus. a) Imagem da superfície da folha de lótus; b) MEV da superfície da folha de lótus que fica voltada para cima, preparada por substituição de glicerol; c) Nanocristais de cera na forma tubular presentes na superfície da folha de lótus que fica voltado para cima; d) Superfície da folha de lótus que fica voltado para cima após secagem no ponto crítico; e) Superfície da folha de lótus que fica voltado para baixo após secagem no ponto crítico, com estruturas convexas	33

Figura 6 –	<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott. gota d'água sobre a folha e estruturas hierárquicas mostradas em micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura	34
Figura 7 –	Imagens de MEV e microscopia ótica de cortes longitudinais de papilas. Folha de lótus (a, b); <i>Euphorbia mirsynites</i> (c, d); <i>Alocasia macrorrhiza</i> (e,f); <i>Colocasia esculenta</i> (g, h). A seta em (b) corresponde a um estômato	35
Figura 8 –	Gotas de água em uma superfície sólida. (a) Esquema do ângulo de contato e tensões superficiais descritas na equação de Young. (b) Deformações de gota de água em função do tipo de superfície sólida	36
Figura 9 –	Modelos de molhabilidade. (a) Modelo de Young; (b) Modelo de Wenzel; (c) Modelo de Cassie-Baxter	38
Figura 10 –	Comportamento da energia de superfície em um líquido	39
Figura 11 –	Esquemas de histerese de ângulo de contato. (a) ângulos de contato de avanço e de recuo numa superfície plana obtidos através do aumento e diminuição do volume da gota, respectivamente; (b) em superfície inclinada com um ângulo de inclinação α	40
Figura 12 –	Diferentes estados de superfícies super-hidrofóbicas. a) Estado Wenzel, b) Estado Cassie, c) Estado “lótus”, d) Estado de transição entre estados Wenzel e Cassie, e) Estado “Gecko”	42
Figura 13 –	Esquema do processo de adesão bacteriana. (A) Adesão convencional, em duas etapas; (B) Adesão com auxílio de nano fibra (flagelo ou cílios)	45
Figura 14 –	<i>Escherichia coli</i>	46
Figura 15 –	Parede celular do <i>S. aureus</i>	48
Figura 16 –	Efeitos autolimpantes. (a) de uma superfície com ângulo de contato elevado e baixo ângulo de deslizamento (b) de uma superfície com ângulo de contato baixo e ângulo de deslizamento alto	49
Figura 17 –	Regime das propriedades do fluido para impressão à jato de tinta por DoD	53

Figura 18 –	Esquema da replicação da superfície da folha de lótus por soft lithography	55
Figura 19 –	Estrutura química do polidimetilsiloxano	56
Figura 20 –	Ácidos acrílicos	57
Figura 21 –	Poliacrilato e polimetacrilato	58
Figura 22 –	Formação do PLA	59
Figura 23 –	Estrutura química do PVB	59
Figura 24 –	Esquema simplificado do AFM	61
Figura 25 –	Volume de interação: a) localização dos sinais emitidos pela amostra; b) relação da voltagem para elementos leves e pesados	63
Figura 26 –	Esquema dos componentes do MEV	63
Figura 27 –	Exemplo de imagem de MEV de nanocristais de cera presentes na superfície da folha da <i>C. esculenta</i> (L.) Schott	64
Figura 28 –	Formação da imagem em MEV	65
Figura 29 –	Exemplos de pontos de interesse em um objeto que se deseja projetar em 3D.....	66
Figura 30 –	Tipos de sistemas de adesivos transdérmicos	68
Figura 31 –	Estrutura da ZMS-5	70
Figura 32 –	Diferentes tipos de ZIFs (Zeolitic Imidazolate Frameworks), com destaque para a ZIF-8	72
Figura 33 –	Mecanismos de penetração de fármaco por via cutânea	74
Figura 34 –	Estrutura do Lapachol	75
Figura 35 –	Esquema de cultivo hidropônico utilizado na biofábrica de biotemplates na Ponto Quântico Nanodispositivos. (Positiva-UFPE/LandFoton)	78
Figura 36 –	Sistema de cultivo hidropônico. a) plantas com 16 dias de cultivo sob condições controladas; b) Efeito lótus das folhas cultivadas.....	78
Figura 37 –	<i>C. esculenta</i> cultivada por hidroponia sob condições de stress hídrico. (a) sistema de cultivo sob condições de stress hídrico. (b) Micrografia da superfície da folha cultivada sob condições normais, que apresenta o efeito lótus (c) Micrografia da superfície	

	da folha cultivada sob stress hídrico, que apresenta adesão da gotícula de água	79
Figura 38 –	Microfotografias da superfície da folha da <i>C. esculenta</i> (L.) Schott. (a) e (b) superfície da folha sem modificação (c) e (d) superfície da folha exposta à Clorofórmio até evaporação do solvente	81
Figura 39 –	Espectro de Infravermelho do clorofórmio e da cera epicuticular removida da superfície da folha da <i>C. esculenta</i> (L.) Schott	82
Figura 40 –	Micrografias da superfície do lado superior de folha da <i>C. esculenta</i> (L.) Schott. (a) 2450x, mostrando a microestrutura presente na superfície das folhas. (b) 10500x, mostrando estrutura hierárquica nanométrica de uma calota ampliada. (c) Ampliação de 53.000x, mostrando os nanocristais de cera	84
Figura 41 –	Moldes negativos obtidos a partir da <i>C. esculenta</i> (L.) Schott sob diferentes ampliações. (a)-(c) Molde negativo de PDMS. (d)-(f) Molde negativo de poliacrilato fotopolimerizável. (g)-(h) Molde negativo de PLA	85
Figura 42 –	Réplicas positivas de PVB sob diferentes ampliações. (a)-(c) obtidas a partir e moldes negativos de PDMS incolor. (d)-(f) obtidas a partir e moldes negativos de Poliacrilato fotopolimerizável	86
Figura 43 –	Formato de gotas de 10 µL de água em diferentes superfícies. (a) Superfície da <i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott in natura com 18 dias de cultivo. b) Superfície da réplica de PVB obtida partir do molde de PDMS. c) Superfície da réplica de PVB obtida partir do molde de Poliacrilato	87
Figura 44 –	Proposta do software TopoSlicer®, para fatiamento de imagens 2D em um conjunto de imagens separadas por cotas para impressão 3D em impressora DoD de materiais	90
Figura 45 –	Utilização do software Gwydion para testar e comparar a linearidade do contraste com os valores de profundidade do eixo Z. (a) Imagem de AFM da superfície da <i>C. esculenta</i> ; (b) Projeção 3D da imagem 2D de AFM; (a) Imagem de MEV da superfície da <i>C. esculenta</i> ; (b) Projeção 3D da imagem 2D de MEV	91

Figura 46 –	TopoSlicer® (a) Interface com imagem AFM mostrada como exemplo. (b) conjunto de imagens em função das cotas, geradas pelo software a partir do fatiamento da imagem de entrada	92
Figura 47 –	Diagrama de imprimibilidade do fluido utilizado para impressão das réplicas	95
Figura 48 –	- Imagens de AFM das superfícies impressas de PVB. a) AFM da superfície lisa impressa; b) Projeção 3D do AFM da impressa superfície lisa; c) AFM de superfície bioinspirada; d) Projeção 3D do AFM da impressa superfície bioinspirada	97
Figura 49 –	Esquema de testes de adesão bacteriológica nas superfícies lisa e bioinspirada	99
Figura 50 –	Réplicas positivas de PVB obtidas a partir de molde negativo de PDMS branco sob diferentes ampliações	100
Figura 51 –	Histogramas da quantidade de bactéria contada nas águas utilizadas para lavar as superfícies após 30min de contato com suspensão bacteriana. (a) Quantidade de <i>S. aureus</i> por 1 μ L (b) Quantidade de <i>E.coli</i> por 1 μ L	101
Figura 52 –	Esquema da síntese da ZIF-8	102
Figura 53 –	Difratogramas da ZIF-8: Comparação entre (a) ZIF-8 pós-síntese e (b) ZIF-8 após adsorção com Lapachol	105
Figura 54 –	ZIF-8 nanométrica sintetizada pelo método de Cravillon et al. (2001)	106
Figura 55 –	Sistemas contendo Lapachol. (a) Lapachol/Nitrato de Zinco. (b) Apenas Lapachol. (c) Lapachol/Imidazol. (d) ZIF-8-Lapachol	107
Figura 56 –	Comparação do espectro UV-Vis de soluções de Lapachol, Lapachol e ZIF-8, Lapachol e Imidazol, Lapachol e Nitrato de zinco dissolvidos em etanol	108
Figura 57 –	Espectros UV-vis dos compostos dessorvidos da ZIF-8 após sucessivas lavagens	108
Figura 58 –	Esquema de síntese de H-ZSM-5 pelo método da semente	110
Figura 59 –	Representação do sistema de tratamento com vapor d'água	111
Figura 60 –	Difratogramas da ZSM-5: (a) pós síntese e (b) após adsorção do Lapachol	112

Figura 61 –	Espectro de UV-vis de adsorção do Lapachol em ZSM-5 e do Lapachol puro	113
Figura 62 –	Adsorção do Lapachol em MCM-48-APTES, HKUST e SBA-15 respectivamente.....	115
Figura 63 –	Espectros UV-Vis do Lapachol puro dissolvido em etanol com 0, 10 e 40 dias	116
Figura 64 –	Espectros UV-Vis do sobrenadante obtido após 48h de adsorção do Lapachol em MCM-48-APTES, HKUST e SBA-15.....	117
Figura 65 –	Espectros UV-Vis do sobrenadante obtido após 24h de dessorção do Lapachol em MCM-48-APTES, HKUST e SBA-15	118
Figura 66 –	Composição dos compósitos de PVB	119
Figura 67 –	Termogramas de TGA para PVB, Lapachol e compósitos PVB/Lapachol@adsorvente	120
Figura 68 –	Formato de gotas de 10 µL de água em diferentes compósitos. (a) Superfície do compósito PVB/Lapachol@ HKUST. b) Superfície do compósito PVB/Lapachol. c) Superfície do compósito PVB/Lapachol@SBA-15	121
Figura 69 –	Réplicas positivas da <i>C. esculenta</i> em PVB sob diferentes ampliações. (a)-(b) réplicas produzidas com PVB/Lapachol@HKUST. (c)-(d) réplicas produzidas com PVB/Lapachol. (e)-(f) réplicas produzidas com PVB/Lapachol@SBA-15	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Informações obtidas por MEV.....	62
Tabela 2 –	Ângulos de contato e de deslizamento para gota de 10µL de água na superfície da folha da <i>C. Esculenta</i>	79
Tabela 3 –	Ângulos de contato para gotas de água de 10 µL na superfície da folha e das réplicas positivas de PVB	87
Tabela 4 –	Características físicas dos solventes usados e do fluido de impressão	94
Tabela 5 –	Número de Reynolds, Weber, Ohnesorge e fator de imprimibilidade (Z) do fluido imprimível	95
Tabela 6 –	Valores médios do ângulo de contato dos compósitos PVB/Lapachol@adsorvente e PVB/Lapachol	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Diâmetro do bico de impressão
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> -Microscopia de Força Atômica
APTES	3-aminopropiltrietoxissilano
Bit	<i>Binary digit</i> -dígito binário
CAD	<i>Computer Assisted Drawing</i> - Desenho assistido por computador
COFs	<i>Covalent Organic Frameworks</i>
DoD	<i>Drop-on-Demand</i>
DVLO	Teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA enzimática	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> ensaio de imunoabsorção
FDA	Food and Drug Administration
HKUST	Estrutura organometálica baseada em Cobre e BTC
HZSM-5	<i>Zeolite Socony Mobil n. 5</i> na forma ácida
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LED	<i>Light emitting diode</i> -diodo de emissão de luz
MCM-48	<i>Mobil Composition of Matter n. 48</i> / sílica mesoporosa n. 48
MCM-48-APTES	<i>Mobil Composition of Matter n. 48</i> amino-funcionalizado com 3-aminopropiltrietoxissilano
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MOFs	<i>Metal Organic Frameworks</i> – Estruturas organometálicas
MRSA	<i>Multiple resistente staphylococcus aureus</i>
η	Viscosidade do fluido
Oh	Número de Ohnesorge
ρ	densidade do fluido
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMSU terminado (1000)]	diurapropyltriethoxysilane [bis (aminopropil) -polidimetilsiloxano

PDLA	(DL-Lactato)
PFOTES	1H, 1H, 2H, 2H-perfluorooctiltrietoxilsilano
PLA	Ácido polilático
PLLA	Poli(D-lactide)
PVB	Polivinil butiral
PVD	Deposição física de vapor
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SBA-15	<i>Santa Barbara Amorphous n. 15</i> - sílica mesoporosa amorfa n. 15
STM Tunelamento	<i>Scanning Tunneling Microscope</i> - Microscópio de corrente de
<i>Re</i>	Número de Reynolds
γ	tensão superficial do fluido
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta visível
<i>v</i>	Velocidade de ejeção das gotas
<i>Wa</i>	Trabalho de adesão
<i>We</i>	Número de Weber
<i>Z</i>	Parâmetro de imprimibilidade de Derby
ZIF-7 Imidazol n.7	<i>zeolitic imidazolate frameworks n.7</i> -Estruturas zeolíticas de
ZIF-8 imidazol n. 8	<i>zeolitic imidazolate frameworks n. 8</i> -Estruturas zeolíticas de
ZIF-9 imidazol n. 9	<i>zeolitic imidazolate frameworks n. 9</i> -Estruturas zeolíticas de
ZIF-67 imidazol n. 67	<i>zeolitic imidazolate frameworks n. 67</i> - Estruturas zeolíticas de

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVO	24
3	ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	26
4	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
4.1	BIOINSPIRAÇÃO E BIOMIMÉTICA	28
4.1.1	Colocasia Esculenta	32
4.2	SUPER-HIDROFOBICIDADE E MOLHABILIDADE.....	36
4.2.1	Modelo Wenzel	37
4.2.2	Modelo Cassie-Baxter	37
4.2.3	Energia de superfície	38
4.2.4	Ângulo de deslizamento e histerese do ângulo de contato	40
4.2.5	Superfícies super-hidrofóbicas	41
4.3	HIDROFOBICIDADE E RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	43
4.3.1	Escherichia coli	46
4.3.2	Staphylococcus aureus	47
4.4	BACTERICIDA ESTRUTURAL.....	48
4.5	IMPRESSÃO DE MATERIAIS	49
4.5.1	Impressão a jato de tinta	50
4.5.2	Soft lithography	54
4.5.2.1	Materiais poliméricos para <i>soft lithography</i>	56
4.6	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	60
4.7	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	62
4.7.1	Esterescopia para produção de imagem 3D	65
4.8	COMPÓSITOS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS POR VIA TRANSDÉRMICA: PARTE ESTRUTURAL	67

4.9	PARTE FUNCIONAL: CARREADOR DO FÁRMACO (ADSORÇÃO/DESSORÇÃO).....	69
4.9.1	MCM-48.....	69
4.9.2	SBA-15	69
4.9.3	ZSM-5	70
4.9.4	MOFs.....	71
4.9.4.1	ZIF-8	71
4.9.4.2	H-KUST.....	72
4.10	FÁRMACO MODELO PARA PROVA DE CONCEITO.....	73
4.10.1	Lapachol	74
5	EXPERIMENTAL E RESULTADOS	77
5.1	CULTIVO E PRODUÇÃO DE BIOTEMPLATES	77
5.1.1	Efeito dos cristais de cera na super-hidrofobicidade da <i>C. esculenta</i> (L.) Schott.....	80
5.2	SOFT LITHOGRAPHY	82
5.2.1	MEV	83
5.2.2	Medidas de Ângulo de contato.....	87
5.3	PRINTRÔNICA.....	88
5.3.1	Preparação dos <i>templates</i> digitais para printrônica	88
5.3.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura	88
5.3.1.2	Microscopia de Força Atômica AFM	89
5.3.2	Desenvolvimento do software <i>TopoSlicer</i> [®]	89
5.3.3	Impressão da réplica a partir das cotas geradas pelo <i>TopoSlicer</i> [®]	93
5.4	BACTERICIDA ESTRUTURAL A PARTIR DE SUPERFÍCIE BIOINSPIRADA	98
5.5	CARREADORES DO FÁRMACO	102
5.5.1	ZIF-8	102
5.5.1.1	Síntese da ZIF-8.....	102

5.5.1.2	Caracterização da ZIF-8.....	102
5.5.2	H-KUST	104
5.5.3	ZSM-5	109
5.5.3.1	Síntese da ZSM-5.....	109
5.5.3.2	Caracterização da ZSM-5	111
5.5.4	SBA.....	113
5.5.5	MCM-48-APTES	114
5.5.6	Adsorção do Lapachol em MCM-48, H-KUST e SBA-15.....	115
5.6	DEGRADAÇÃO DO LAPACHOL	116
5.7	COMPÓSITOS DE PVB COM OS CARREADORES CONTENDO LAPACHOL	118
6	CONCLUSÕES.....	123
7	PERSPECTIVAS	125
8	ENTREGÁVEIS	126
	REFERÊNCIAS.....	127
	APÊNDICE A - TRABALHOS ENVIADOS A CONGRESSOS E PUBLICADOS.....	137
	APÊNDICE B - PATENTES	138
	APÊNDICE C - CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE IMPRESSÃO DO FLUIDO PREPARADO.....	139

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos materiais introduzindo estratégias mais eficazes de administração e entrega de fármacos tem objetivado o aumento da eficiência de tratamentos terapêuticos. Um dos desafios da indústria farmacêutica, uma das que mais cresce no cenário mundial (INTERNATIONAL TRADE ADMINISTRATION, 2016), é desenvolver processos cada vez mais rápidos econômicos e que ofereçam maior conforto e praticidade aos pacientes. Por este motivo, a personalização da dose de fármacos, visando a redução dos efeitos colaterais gerados pela maneira de administração, é cada vez mais estudada e otimizada.

Diante dos problemas trazidos pelos métodos convencionais de administração de medicamentos, uma alternativa eficiente de personalizar e direcionar a dosagem de um fármaco num tratamento terapêutico, está nos processos de *drug delivery* (DELUCIA *et al.*, 2014). Em casos em que uma liberação contínua de fármaco é necessária, nanopartículas biodegradáveis podem ser utilizadas, como as *Metal Organic Frameworks* (MOFs), ou mais recentemente, as *Covalent Organic Frameworks* (COFs), em que as estruturas porosas expandidas por síntese reticular são feitas pela união de moléculas orgânicas através de ligações covalentes (Diercks & Yaghi, 2017). Essas estruturas agem como nanorreservatórios de fármacos para uma liberação lenta e contínua, reduzindo assim a dosagem a qual os pacientes devem se submeter.

Para monitorar a liberação do fármaco, esses sistemas podem permitir rastreamento por meio de imageamento por ressonância magnética (WUTTKE *et al.*, 2017). Da série de MOFs biocompatíveis, as ZIF-7, ZIF-8 e ZIF-9 vêm sendo estudadas como potenciais carreadores para a liberação controlada de fármacos para o tratamento de câncer, como o 5- Fluorouracil, e de anti-inflamatórios, como por exemplo, o ibuprofeno (GOMAR & YEGANEHI, 2017).

Um exemplo de tecnologia de liberação controlada de fármacos é o carreamento por via transdérmica. Estudos revelam que a superfície da pele, e de mucosas nasais e bucal, podem ser utilizadas como rotas alternativas aos métodos convencionais de administração de medicamentos, como por via oral ou intravenosa (TIWARI *et al.*, 2012).

Porém, um dos inconvenientes desse método de administração é a necessidade adição de uma camada impermeabilizante aos dispositivos de *drug-delivery* via transdérmica, aumentando as etapas do processo de produção. Com base nisso, busca-se aqui o desenvolvimento de recobrimentos funcionais estruturais com vistas à proteção de sistemas de carreamento transdérmico. Para uma prova de conceito com os recobrimentos propostos, foi

escolhido o Lapachol, isolado a partir do Ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*), como fármaco modelo. Trata-se de uma planta nativa da mata atlântica brasileira também conhecida como Pau d'Arco, apresentando ação anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e anticancerígena. O Lapachol foi descrito pela primeira vez na literatura em 1882, (2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona). Ele foi pioneiramente estudado por Lima *et al.* (1956) no Instituto de Antibióticos da UFPE e atualmente é um dos fármacos utilizados para *drug delivery* por via transdérmica.

Alguns anti-inflamatórios, como o Lapachol e o ibuprofeno, são administrados por via oral, mas como pode causar eventuais náuseas ou desconfortos gástricos, o tratamento parenteral por via tópica, utilizando cremes ou loções, surge como uma opção mais cômoda ao paciente. Apesar de oferecer maior conforto, a via tópica apresenta baixa absorção do fármaco, exigindo várias aplicações ao longo do dia, por isso, muitas vezes é desconsiderado como opção de tratamento (HERRMANN, DANIELS & LUNTER, 2016). Diante disso, os adesivos transdérmicos são uma alternativa para melhorar a disponibilidade do fármaco no local de ação e tornar a administração cômoda e indolor para o paciente. Eles reduzem a frequência de dosagem horária para diária ou até mesmo semanal, aumentam a biodisponibilidade do fármaco e não são invasivos nem causam problemas gástricos como efeito colateral (BANERJEE *et al.*, 2014).

Com relação à impermeabilidade, a molhabilidade da superfície externa destes adesivos é um fator que deve ser controlado para evitar que o fármaco contido no seu interior seja exposto à água e tenha sua ação afetada. Uma superfície hidrofóbica pode contribuir para impermeabilização seletiva da superfície, preservando a respiração cutânea. Normalmente na maioria dos processos atuais de produção da superfície externa desses adesivos, faz-se necessária a adição de um polímero impermeabilizante como principal componente da camada mais externa. Como qualquer indústria, a farmacêutica preza muito pela redução de custos de produção e otimização do processo, então a adição de uma camada de um polímero impermeabilizante na camada mais externa é traduzida em aumento do número de etapas, tornando o tempo de produção mais longo e mais caro. Uma possível solução seria a utilização da mesma matriz polimérica ao longo de toda a extensão do adesivo contendo material aderente apenas na camada mais interna. Mas como seria possível transformar um polímero hidrofílico em hidrofóbico sem alterar as condições do ambiente?

A natureza tem mostrado que a hidrofobicidade depende não somente do material, mas também da estrutura da superfície, como no caso da folha de Lótus e a pétala de rosa, que

apresentam superfícies com propriedades super-hidrofóbicas. Todas elas têm algo em comum: A superfície formada por estruturas hierárquicas nano-micro, que fazem com que a energia de superfície diminua e as gotículas de água não consigam molhar sua superfície (MA *et al.*, 2017). Com base nisso, o desenvolvimento de superfícies bioinspiradas em estruturas hierárquicas presentes na superfície de folhas de plantas se apresenta como uma estratégia promissora que tem sido cada vez mais estudada.

Estudos feitos por Bhushan, Jung e Koch (2009) têm mostrado que é possível alterar as propriedades de molhabilidade de um material através da modificação de sua micro/nanoestrutura. A *soft lithography* abordada no seu trabalho apresenta-se como uma maneira de mimetizar superfícies de materiais biológicos utilizando novos materiais, de maneira rápida, precisa e barata. Com base nisso, pode-se afirmar que o desenvolvimento de adesivos transdérmicos formados por uma única matriz polimérica é possível, desde que se consiga uma maneira de se biomimetizar as estruturas hierárquicas presentes na natureza com o material ativo, e que tal técnica possa ser escalonada.

As principais técnicas de fabricação de microestruturas ordenadas são a *soft lithography*, a fotolitografia e ataque químico ou iônico, que apesar de corresponderem a técnicas rápidas e baratas, são processos *top-down*, gerando desperdício de materiais. Todos estes processos acarretam custos que podem ser reduzidos ou eliminados quando se substitui por um processo *bottom-up*. O processo *bottom-up* é uma alternativa mais econômica, pois propõe a construção do material, partícula por partícula, até alcançar a estrutura desejada, que nesse caso corresponde a impressão de materiais (SHIMOMURA e SAWADAISHI, 2001).

A Impressão 3D por processo de fusão de polímero e deposição *LbL* (*layer-by-layer*) surgiu em 1984, e desde o fim dos anos 90 vem sendo explorada como uma forma de produção de peças tridimensionais através da superposição de camadas poliméricas. Os avanços obtidos com essa técnica transformam a impressão em uma excelente alternativa aos processos convencionais de prototipagem e reprodução de peças em 3D, porém não atingem ainda resolução espacial para reprodução de estruturas menores que 10 μm (CHEN *et al.*, 2019).

Apesar das impressoras 3D ainda não apresentarem resolução satisfatória para a reprodução das estruturas propostas no presente trabalho, as impressoras tipo jato de tinta vem sendo uma excelente alternativa aos processos convencionais de impressão de estruturas através da superposição de camadas (*LbL*). Atualmente elas são utilizadas para impressão de dispositivos, incluindo óticos e elétricos (LE, 1998; CAVERT, 2001).

Recentemente, o desenvolvimento de impressoras de materiais, tipo *Drop-on-Demand* (*DoD*), vem dando origem a uma nova área na Ciência de Materiais, chamada Printrônica. Essas impressoras utilizam a tecnologia de jato de tinta por métodos de ejeção de gotas que possibilita a impressão diversos materiais. Com isso, as impressoras de materiais com tecnologia *DoD* vem evoluindo ao longo dos anos buscando sempre aumentar a resolução do material impresso. A impressora utilizada no presente trabalho pode ejetar gotas de volumes de 1 pL, que equivalem a um diâmetro mínimo de impressão de 9 μm .

Apesar de utilizarem imagens 2D, as impressoras *DoD* podem imprimir superposição de camadas (*layer-by-layer*), com resolução submicrométrica entre as camadas, e vem permitindo a reprodução de estruturas ordenadas com resolução maior do que as impressoras 3D.

Neste contexto, a printrônica apresenta-se como uma nova ferramenta da Ciência de Materiais no desenvolvimento de recobrimentos bioinspirados, e este trabalho de tese surge com uma proposta para aplicações biomédicas. Propõe-se aqui a utilização de uma impressora de materiais para mimetização das microestruturas presentes na superfície da espécie da planta *Colocasia esculenta* (L.) Schott, típica da região tropical, para o desenvolvimento de filmes de compósitos PVB/Lapachol@HKUST, PVB/Lapachol@SBA-15 para liberação controlada de fármacos em adesivos transdérmicos.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é desenvolver filmes bioinspirados nas folhas super-hidrófobas da *Colocasia esculenta* (L.) Schott para aplicações biomédicas, como superfícies antibacterianas passivas e filmes para adesivos transdérmicos poliméricos.

Duas das propostas aqui apresentadas são a prova de conceito da impressão de filmes bioinspirados nesta espécie de planta e a prova de conceito da utilização dos filmes bioinspirados como autodescontaminantes, pela redução da adesão bacteriana. O objetivo final é de contornar o aumento da resistência bacteriana resultante da pressão evolutiva das espécies frente a agentes ativos, como antibióticos ou nanopartículas metálicas, que usadas atualmente de forma crescente, vêm provocando o aumento da produção de flagelina em poucas gerações de bactérias, inibindo a ação bactericida das nanopartículas por aglomeração induzida por esta proteína estrutural.

Os objetivos específicos deste trabalho de tese são:

- Cultivar *in vitro* a *Colocasia esculenta* (L.) Schott por métodos hidropônicos monitorados, para uso de suas folhas como *biotemplates* para a reprodução das estruturas hierárquicas de superfície;
- Utilizar os *biotemplates* para reprodução das estruturas hierárquicas por *soft lithography*, otimizar a *soft lithography*, selecionando o tipo de material que produz réplicas com ângulos de contato mais elevados, e caracterizar as propriedades físicas e estruturais das réplicas obtidas;
- Desenvolver um software de conversão de uma micrografia 2D em um conjunto de imagens separadas por cotas (z) para impressão 3D *LbL* das estruturas bioinspiradas;
- Imprimir superfície bioinspirada na impressora de materiais a partir dos *templates* digitais gerados pelo software aqui desenvolvido;

- Projetar e avaliar a atividade das superfícies antibacterianas estruturais, bioinspiradas na superfície das folhas da *C. esculenta* (L.) Schott, para atuarem como superfícies autodescontaminantes;
- Sintetizar carreadores de um fármaco modelo (Lapachol), e acompanhar sua estabilidade e comportamento para propor a produção de compósitos PVB/Lapachol@carreador.

3 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

Na primeira etapa deste projeto a *soft lithography* foi utilizada para reprodução das estruturas hidrofóbicas presentes na superfície das folhas da *Colocasia esculenta* em PVB, utilizando como moldes negativos o PLA, o PDMS e poliacrilato fotopolimerizável. Os testes de *soft lithography* mostraram que o PVB é um polímero versátil para a produção de réplicas positivas e que o poliacrilato também pode ser utilizado, apesar da rigidez, como uma alternativa mais rápida à produção de moldes negativos convencionais de PDMS. O cultivo hidropônico da *Colocasia esculenta* foi feito para obtenção de biotemplates, e a ação de um agente modificador de micro/nanoestrutura das folhas como o stress hídrico também foi avaliado. O software desenvolvido nesta primeira etapa para conversão de imagens de AFM em imagens imprimíveis, chamado *TopoSlicer*[®], feito em colaboração com o Prof. Silvio B. Melo, do Centro de Informática (CIn) da UFPE, foi testado com as primeiras imagens de AFM e MEV, de folhas da *Colocasia esculenta* cultivada por hidroponia, e foi utilizado na segunda etapa deste trabalho.

As MOFs ZIF-8 e HKUST foram sintetizadas, caracterizadas e submetidas a testes de adsorção e dessorção do Lapachol para avaliar a interação fármaco/carreador. Sua performance foi comparada com a HZSM-5, um aluminossilicato com estrutura semelhante, SBA-15 e MCM-48-APTES, silicatos com tamanho de poros maiores, a fim de propor o carreador mais adequado para liberação controlada do Lapachol com recobrimento hierárquico.

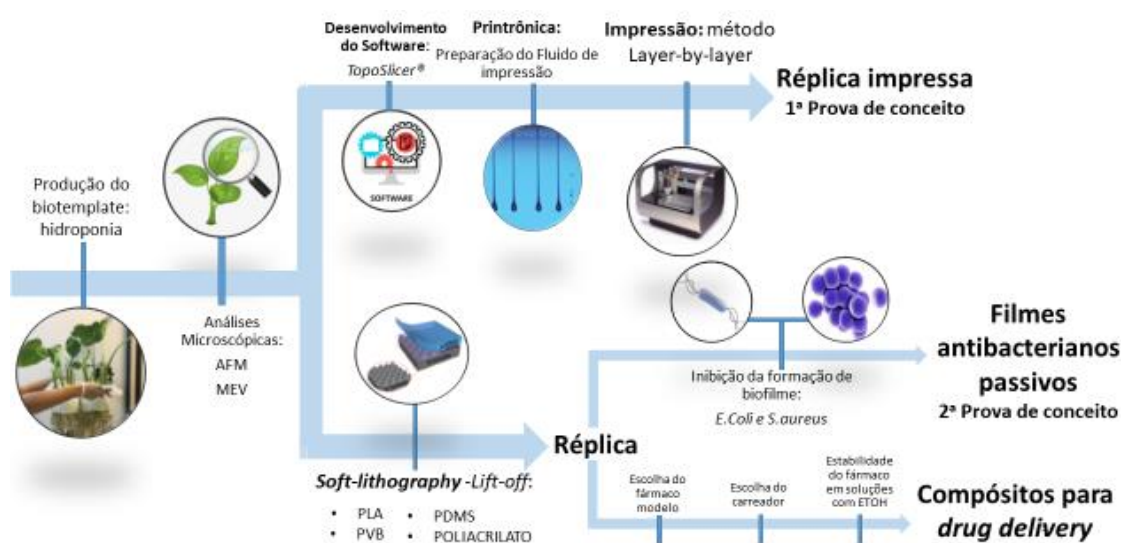
Na segunda parte deste projeto, o software previamente desenvolvido foi utilizado para reproduzir as estruturas presentes na superfície da *C. esculenta* via impressão de PVB, apesar da baixa resolução devido à limitação do hardware da impressora utilizada, foi possível observar a criação de estruturas na superfície do PVB capazes de diminuir a sua molhabilidade.

Na segunda etapa deste projeto de tese, também foi estudado o potencial de aplicação dos recobrimentos biomimetizados (via *soft lithography*) na redução da adesão bacteriana, propondo-os como antibactericidas estruturais. Para estes testes foram utilizadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, *S. aureus* e *E. coli* respectivamente por apresentarem composição da parede celular diferente e por apresentarem formatos e mecanismos de adesão distintos entre si. A taxa de adesão dessas bactérias à superfície foi utilizada como parâmetro indicador do potencial antibacteriano das superfícies devido à prevenção de formação de biofilmes.

Estas duas etapas descritas acima são apresentadas no esquema da Figura 1. Nesse esquema tem-se uma visão geral da sequência das séries de experimentos realizados e dos principais entregáveis resultantes das pesquisas aqui desenvolvidas, desde a produção dos *biotemplates* até a execução de duas provas de conceito propostas.

A principal contribuição deste trabalho de tese está na prova de conceito de uma nova maneira de biomimetização de microestruturas presentes na natureza através da técnica de impressão *layer-by-layer*, e da aplicação delas no desenvolvimento de superfícies antibacterianas passivas. Procurou-se alcançar este objetivo através do desenvolvimento das atividades aqui descritas e propor um filme modelo para uma plataforma para utilização não apenas em *drug-delivery*, mas também em tratamento de superfícies como recobrimentos antibacterianos estruturais, frente às superbactérias geradas pela evolução das espécies submetidas a agentes como antibióticos ou mesmo nanopartículas metálicas.

Figura 1 - Esquema da série de experimentos desenvolvidos



Fonte: A autora (2020).

Com isso, pretende-se avaliar a viabilidade de uma plataforma de filmes para adesivos transdérmicos e para aplicações antibacterianas que possam ser feitos a partir de diversas matrizes poliméricas híbridas, podendo conter o fármaco, potencializando sua aplicação para a indústria biomédica.

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, será apresentada a fundamentação teórica necessária para dar apoio às interpretações dos resultados desse trabalho de tese.

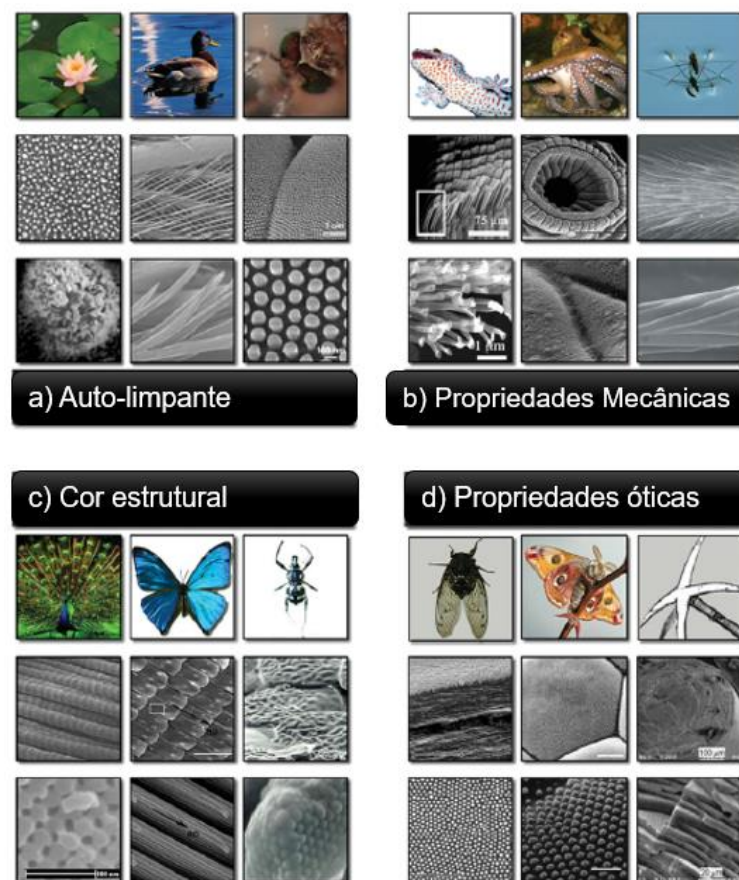
4.1 BIOINSPIRAÇÃO E BIOMIMÉTICA

A evolução da natureza ao longo de bilhões de anos vem servindo de exemplo para nos mostrar como atingir performances cada vez melhores, utilizando o mínimo possível de recursos. Muitos estudos científicos são desenvolvidos para entender a adaptação da natureza e os mecanismos por ela desenvolvidos para vencer os desafios pelo qual tem passado ao longo do seu processo evolutivo e a partir disso propor soluções cada vez mais eficazes para problemas cotidianos (BAR-COHEN, 2005). A bioinspiração, adaptação ou derivação da natureza, é a forma mais ampla da abordagem da biomimética, ou seja, de imitar a biologia ou a natureza. Ela utiliza fenômenos da biologia para estimular pesquisas em ciências não biológicas e em tecnologia. Apesar da bioinspiração ser uma denominação contemporânea, trata-se de uma estratégia de pesquisa que vem crescendo desde a antiguidade. As primeiras máquinas para voar propostas por Leonardo da Vinci no século XV foram inspiradas nos pássaros, enquanto que a inteligência artificial e as redes neurais na tecnologia foram inspiradas no desejo de mimetizar o cérebro humano, quando surgiram nos anos 80. Como a maioria dos processos encontrados na natureza se caracterizam na escala nanométrica, a expansão da nanociência e da nanotecnologia nos anos 90 tem disponibilizado ferramentas que permitem o desenvolvimento de materiais bioinspirados, através de técnicas de nanofabricação para aplicações comerciais (BHUSHAN, 2009).

De modo geral, os sistemas biológicos são sistemas híbridos, orgânico-inorgânico, que respondem a estímulos externos como por exemplo luz, umidade, som, odor, pH, pressão, temperatura, condutividade etc., tornando-se em geral sistemas extremamente complexos para se reproduzir. Apesar disso, características que apresentam um nível de complexidade menor, como as propriedades autolimpantes, adesivas e iridescentes, vem sendo cada vez mais exploradas (BHUSHAN, 2009). Essas propriedades são obtidas devido à presença de estruturas hierárquicas dispostas de maneiras diferentes em diversos sistemas e materiais biológicos (Figura 2).

Muitas das propriedades únicas encontradas na natureza são atribuídas às estruturas hierárquicas. A reprodução de modo prático das funcionalidades complexas, fruto dessas propriedades em materiais bioinspirados, depende da qualidade das estruturas em escalas múltiplas (nano, micro e macro) e da obtenção de estruturas bem ordenadas. Tais características são fundamentais para a reprodutibilidade de propriedades macroscópicas, como coloração, super-hidrofobicidade e adesividade e são obtidas através de diversos métodos físicos e químicos, como por exemplo fotolitografia, *soft lithography* ou ataque químico (CALLIES *et al.* 2005; MARTINES *et. al*, 2005; SOUZA, 2017). Como alguns desses processos já são desenvolvidos em escala industrial e com a possibilidade de utilização da nanociência, as indústrias estão cada vez mais interessadas em explorá-los.

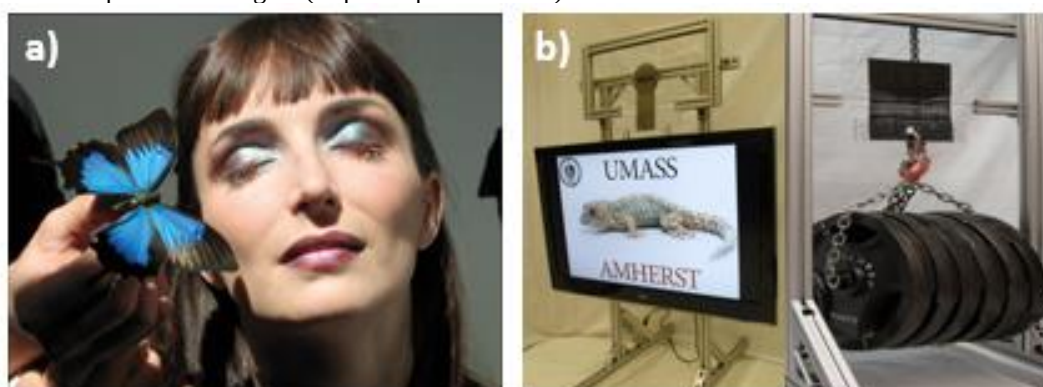
Figura 2 - Estruturas encontradas na natureza. Quatro tipos de propriedades biológicas que são encontradas na natureza. a) Propriedades autolimpantes: folha de lótus, pena de pato e olhos de mosquitos (da esquerda para a direita). b) Propriedades mecânicas: as patas do gecko, tentáculos de polvo, e strider aquático. c) Coloração devido à estrutura: pena de pavão, asa de borboleta, e carapaça de besouros. d) Propriedades Óticas: Asas de cigarra, componente dos olhos de traça, esporo de esponja. Em cada caso, primeiro é mostrado na primeira linha uma foto da característica, na segunda linha imagens de MEV da estrutura micrométrica e na terceira linha, da estrutura nanométrica.



A L'Oréal Paris e a equipe Crosby têm mostrado que trazer a bioinspiração para o cotidiano da população está cada vez mais próximo da realidade. A L'Oréal Paris lançou a linha de maquiagem chamada LUCI, que não possui pigmento (Figura 3a). Eles utilizaram materiais sintéticos inertes, inspirados na propriedade iridescente das estruturas hierárquicas de quitina presentes na asa borboleta do gênero *Morpho*, para produzir sombras sem pigmento, mas que apresentam coloração estrutural (VUKUSIC, 2018).

Já o grupo Crosby lançou o GeckSkin™, bioinspirado nas estruturas hierárquicas nano/micro de queratina presentes nas patas da lagartixa (GAO *et al.*, 2005), que ao contrário dos adesivos tradicionais sensíveis à pressão, é um adesivo produzido com materiais que podem ser moldados, criando contato conformado com uma superfície e mantendo alta rigidez elástica nas direções onde as forças serão aplicadas (Figura 3b). A principal inovação do GeckSkin™ foi a integração de um elastômero macio - como poliuretano ou PDMS- (a interface aderente da pata da lagartixa) com um tecido rígido (a pele da lagartixa), permitindo que a “interface aderente” seja colocada sobre uma superfície para maximizar o contato. Além disso, assim como nas patas da lagartixa, “a pele” do adesivo é tecida em um tendão sintético, produzindo um design que desempenha um papel fundamental na manutenção da rigidez e da liberdade de rotação (GECKSKIN, 2018).

Figura 3 - Exemplos de materiais bioinspirados em estruturas hierárquicas presentes na natureza disponíveis no mercado. a) Linha de sombras bioinspiradas LUCI da L'Oréal Paris (Fonte: LUCI-L'Oréal). b) Um adesivo GeckSkin de 43 cm² sustentando uma TV de 42 polegadas e outro adesivo GeckSkin10x10 cm sustentando um peso de 135 kg da (esquerda para a direita) ambos fixos em substrato de vidro.



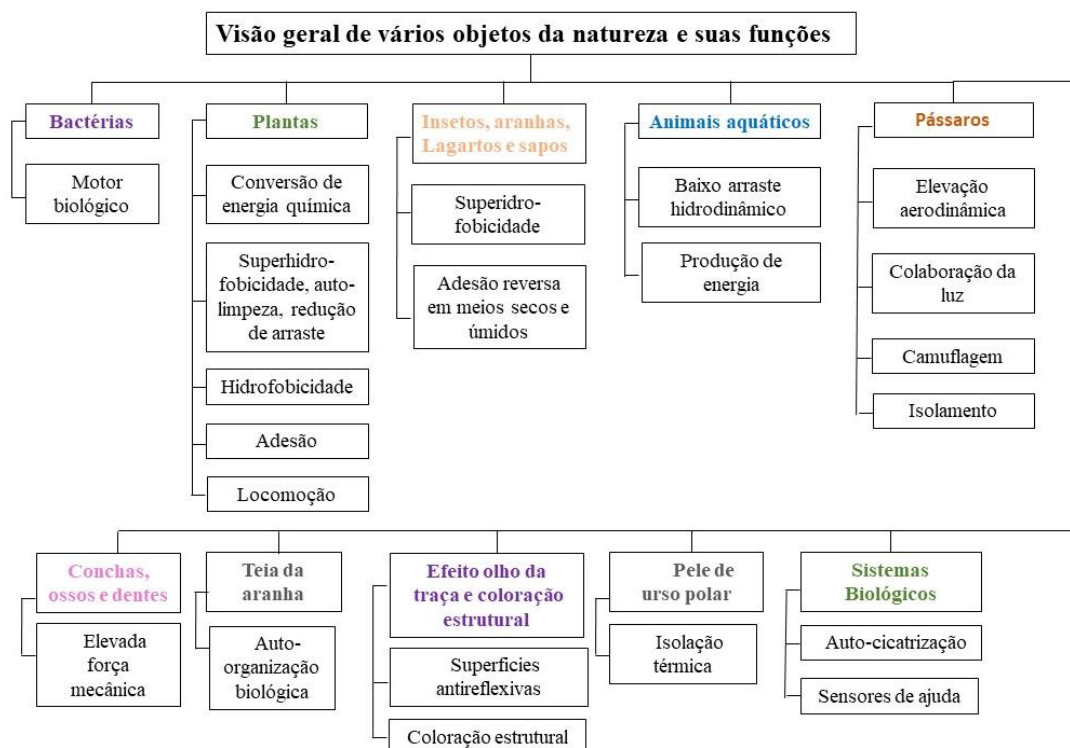
Fonte: GeckSkin (2018).

Para o desenvolvimento de produtos tecnológicos como esses, foi necessário entender como acontecem os fenômenos envolvidos, propor e explorar rotas de fabricação dos materiais bioinspirados até alcançar o produto final. Materiais bioinspirados são cada vez mais atrativos devido às suas propriedades únicas que se apresentam promissoras para diversas aplicações

industriais. Alguns exemplos são barbatanas biomiméticas, dispositivos com memória neural, superfícies autolimpantes, biossensores, nanorreservatórios inteligentes para carreamento de fármacos, polímeros inteligentes, dentre outros. (XIA, 2008). Considerando-se que o que apresenta utilidade no meio biológico também pode ser útil para outras aplicações industriais, pode-se criar materiais com propriedades particulares para uma determinada função. A fauna e a flora disponíveis têm inúmeros exemplos que podem ser modificados dependendo da localização geográfica e das condições climáticas às quais estão expostas (Figura 4). A natureza tem a característica de combinar sistemas complexos e elegantes de maneira econômica e eficiente, que muitas vezes aparentam simplicidade (WHITESIDES, 2015).

Conforme apresenta a Figura 4, as plantas são excelentes exemplos de conversão de energia química, super-hidrofobicidade, autolimpeza, redução de arraste, hidrofilicidade, adesão e locomoção (BHUSHAN, JUNG, KOCH, 2009). Dentre elas, a super-hidrofobicidade é uma característica identificada em mais de 200 espécies de plantas. A quantidade de publicações nesta área passou de 150 por ano para 1500 entre os anos 2004 e 2016, onde a folha de lótus é o principal objeto de estudo. Estas publicações confirmam que a super-hidrofobicidade da folha de lótus está intimamente ligada à presença de estruturas hierárquicas na sua superfície, como mencionado anteriormente. Apesar da cera que reveste a superfície da folha de lótus ser hidrofílica, apresentando um ângulo de contato $74 \pm 8,5^\circ$, a superfície da folha de lótus apresenta uma elevada repelência à água indicando que a topologia da superfície da folha de lótus é o principal responsável pelo ângulo de contato elevado (maior do que 150°), característico de materiais super-hidrofóbicos (CHENG & RODAK, 2005; MA *et. al*, 2017).

Ensikat *et al.* (2011) comparou diferentes espécies de plantas para entender como o formato e a densidade das estruturas presentes na superfície das folhas contribuem para a diminuição da área de contato entre as gotículas e a superfície delas. Ao comparar a folha de lótus com a *Colocasia esculenta*, ele percebeu que o formato das papilas (estruturas presentes na superfície) permite que a sua densidade aumente, ocasionando uma diminuição da área de contato superfície/gotícula de água e consequentemente, aumento do ângulo de contato. A *Colocasia esculenta* também é conhecida por sua super-hidrofobicidade e sua propriedade autolimpante devido à presença de estruturas hierárquicas formadas por uma camada densa de cristais de cera epicuticular.

Figura 4 - Visão geral de estruturas presentes na biodiversidade e suas potenciais aplicações

Fonte: Adaptado de BHUSHAN (2009)

Em um estudo desenvolvido por Sousa (2017) neste grupo de pesquisa, foram catalogadas diversas plantas da região da Caatinga, no nordeste do Brasil, que apresentam comportamento hidrofóbico. Apesar das plantas observadas serem interessantes para bioinspiração, a estrutura da *Colocasia esculenta* foi escolhida para este trabalho por apresentar uma estrutura de menor complexidade, que tem potencial para ser reproduzida via impressão ou *lift-off*. Além disso, trata-se de uma planta bastante popular e acessível no Brasil, país que abriga cerca de 19% da flora mundial e é um local que tem grande potencial para exploração da bioinspiração.

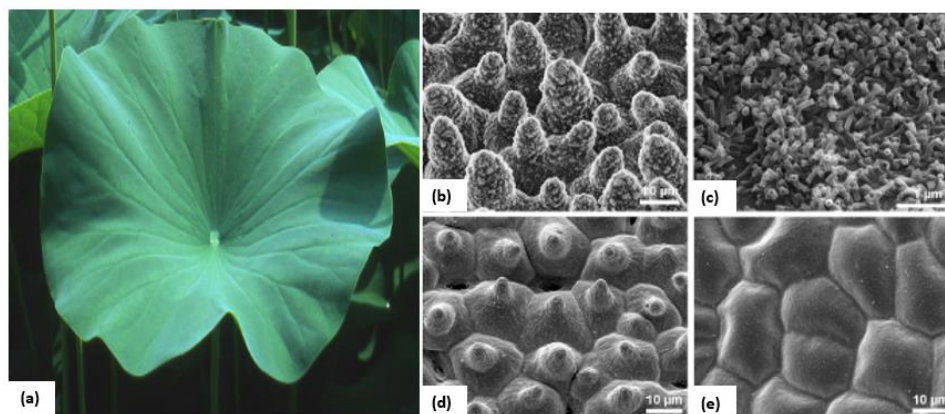
4.1.1 Colocasia Esculenta

A *Colocasia esculenta* (L.) Schott é uma planta de raiz tuberosa que pertence à família Araceae. Ela cresce em regiões úmidas de trópicos e regiões subtropicais e tem grande importância econômica em países do Sudeste Asiático e do Pacífico. Acredita-se que é de

origem indiana, entre Myanmar e Bangladesh, e que posteriormente tenha se espalhado pela Ásia, Egito, África, Caribe e nas Américas. Facilmente encontrada em todo o Brasil, ela é conhecida aqui como inhame paulista, inhame-coco ou taro e seus tubérculos e folhas são utilizados para fins alimentícios (VAJRVIJAYAN, 2016).

Assim como a folha de lótus (*Nelumbo nucifera*), a folha da *C. esculenta* desenvolveu a super-hidrofobicidade como mecanismo de adaptação às adversidades do meio no qual se encontrava. Ambas possuem seus estômatos, organela responsável pela troca de gases das plantas, majoritariamente localizados no lado da folha que fica voltado para cima. Esta superfície tornou-se super-hidrofóbica para manter os estômatos secos, já que é o lado que fica mais exposto a impactos ambientais. Sua repelência à água ocorre devido a estruturas hierárquicas micro/nano na forma de papilas, enquanto que o lado que fica voltado para baixo não apresenta essas papilas, apenas estruturas convexas e alguns estômatos, da mesma forma que na folha de lótus, mostrada na Figura 5 (RENTSCHLER, 1971).

Figura 5 - Folha de lótus. a) Imagem da superfície da folha de lótus; b) MEV da superfície da folha de lótus que fica voltada para cima, preparada por substituição de glicerol; c) Nanocristais de cera na forma tubular presentes na superfície da folha de lótus que fica voltada para cima; d) Superfície da folha de lótus que fica voltada para cima após secagem no ponto crítico; e) Superfície da folha de lótus que fica voltada para baixo após secagem no ponto crítico, com estruturas convexas

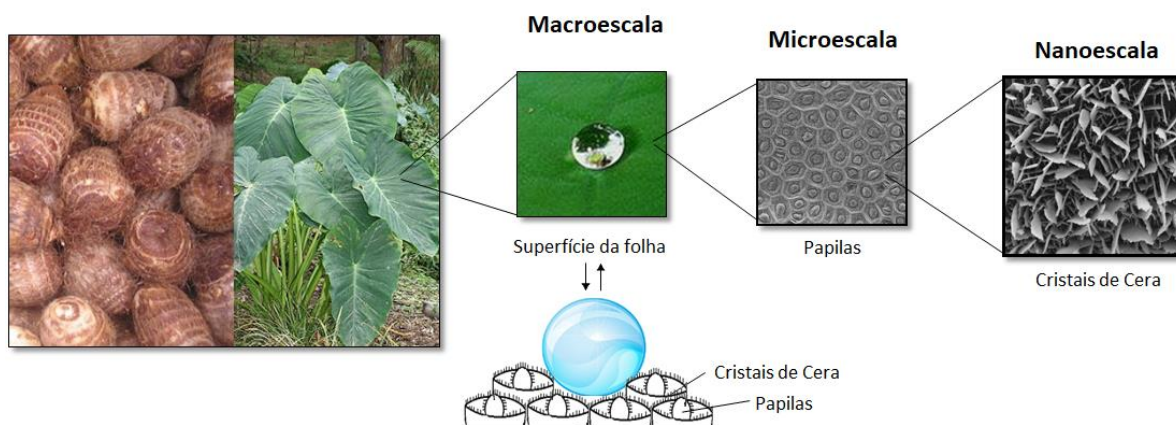


Fonte: ENSIKAT *et al.* (2011).

A super-hidrofobicidade da folha da *C. esculenta* ocorre pela sinergia da estrutura hierárquica micro, das papilas e nano dos cristais de cera com formato de plaquetas que revestem as papilas (Figura 6). Esses cristais de cera têm o octacosan-1-ol (C_{28} -1-ol) como seu principal constituinte (KOCH *et al.*, 2006). A altura e o diâmetro das papilas influenciam as propriedades de molhabilidade da folha. Diâmetros menores diminuem as forças adesivas causadas pelo contato das gotículas de água com a superfície. A variação da altura entre elas também contribui para a diminuição dessas forças, pois as gotículas tocam apenas as papilas

mais altas. Quando ocorrem impactos com as gotas da chuva a pressão aumenta, então essas gotas penetram entre as papilas formando meniscos que são super-hidrofóbicos devido à elevada tensão superficial.

Figura 6 - *Colocasia esculenta* (L.) Schott. gota d'água sobre a folha e estruturas hierárquicas mostradas em micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura



Fonte: A autora (2020).

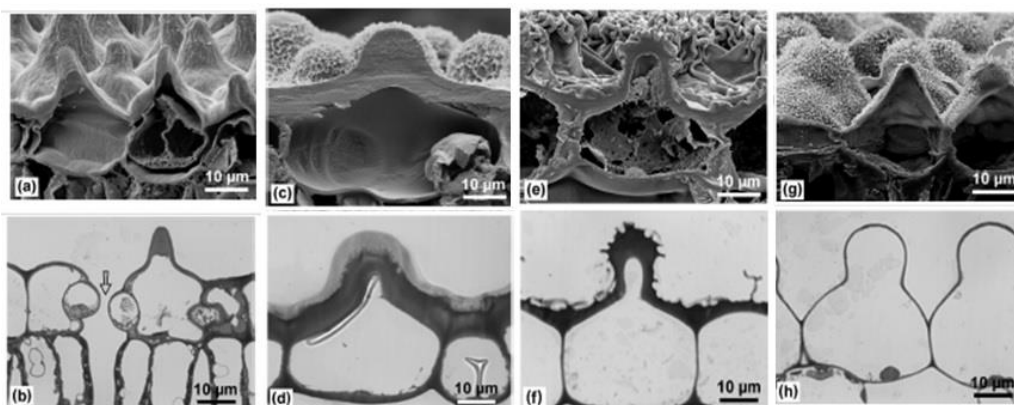
Como estas ceras de revestimento são materiais macios, folhas velhas podem apresentar áreas danificadas ou com sinais de erosão, o que acarreta um aumento da adesão das gotículas de água à superfície. Barthlott e Neinhuis (1997) perceberam que na folha de lótus as papilas protegem os cristais de cera entre eles, e quando se limpa a superfície da folha passando-se o dedo, por exemplo, apenas os cristais de cera das pontas das papilas são danificados. Como os cristais de cera são responsáveis pela hierarquia nano, sua destruição implica na diminuição ou até mesmo perda da super-hidrofobicidade, quando esses são espalhados, alterando também a hierarquia micro. A espessura da camada de cera contribui também para a robustez da superfície e conservação da super-hidrofobicidade. Ao comparar imagens de cortes longitudinais das folhas de diferentes espécies de plantas super-hidrofóbicas na Figura 7 constata-se que a camada de cera da *C. esculenta* é bem mais fina do que a média, indicando uma certa fragilidade na manutenção da super-hidrofobicidade (ENSIKAT *et al.*, 2011).

Apesar de ser considerada a espécie cuja super-hidrofobicidade é mais delicada, a *C. esculenta* tem cerca de 2662 papilas por mm², cujas forças de adesão à água são por volta de 28-55 µN. Além disso, ângulo de contato estático na sua superfície é de 165°, fazendo com que seja uma das espécies de planta que tem as características mais parecidas com a folha de lótus

quando comparada com as demais plantas que possuem folhas super-hidrofóbicas (ENSIKAT *et al.*, 2011).

Mesmo apresentando uma superfície relativamente frágil em relação às outras plantas, Sousa (2017) produziu em nosso Grupo de Pesquisa filmes bioinspirados a partir da superfície das folhas da espécie *Colocasia esculenta* ‘black magic’ com polivinyl butyral (PVB) por *soft lithography*. Através dessa técnica, as hierarquias nano e micro foram reproduzidas, mas o ângulo de contato da réplica para a água pura passou a 135°, cerca de 30° menor do que nos *templates* naturais, devido às energias de superfície que são mais elevadas no PVB do que na cera epicuticular que reveste as folhas, resultando numa superfície hidrofóbica. No mesmo trabalho, o filme bioinspirado testou o limite da super-hidrofobicidade para uma solução com 10% de NaCl, que apresentou um ângulo de contato de 150°, propondo-se assim um dispositivo para a avaliação da salinidade da água para avaliação deste parâmetro de potabilidade em função do ângulo de contato medido (SOUZA e SANTA-CRUZ, 2018), cuja patente será explorada em projeto do Edital Centelha, recentemente aprovado.

Figura 7 - Imagens de MEV e microscopia ótica de cortes longitudinais de papilas. Folha de lótus (a, b); *Euphorbia mirsynites* (c, d); *Alocasia macrorrhiza* (e,f); *Colocasia esculenta* (g, h). A seta em (b) corresponde a um estômato



Fonte: ENSIKAT *et al.* (2011).

Por apresentar todas estas características, e ser uma planta de fácil acesso no Brasil, a *C. esculenta* surge não somente como uma opção para a bioinspiração, mas como uma nova perspectiva para o aumento do ângulo de contato em matrizes poliméricas. Buscar maneiras de diminuir a energia de superfície desse polímero, bem como ajustar parâmetros como o deslizamento da gotícula de água na superfície biomimética, são desafios que estão sendo estudados para que a sua biomimetização passe a ser cada vez mais eficiente, para poder ser explorada inclusive no desenvolvimento de superfícies autodescontaminantes.

4.2 SUPER-HIDROFOBICIDADE E MOLHABILIDADE

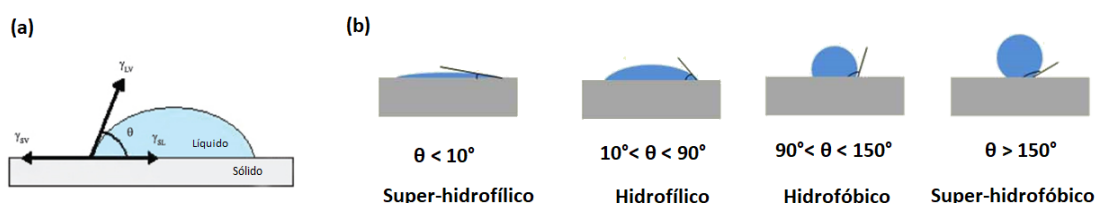
A molhabilidade é uma característica das superfícies que está relacionada à tendência que um líquido tem de manter contato se espalhando ou não sobre ela. Conhecer a molhabilidade de um material é importante quando se deseja explorar propriedades autolimpantes, por exemplo (JONHSON e DETTRE, 1993).

Para caracterizar a molhabilidade de uma superfície sólida por um determinado líquido, que geralmente é a água, são feitas medidas experimentais de ângulo de contato estático (θ). Esse ângulo é medido entre a linha que tangencia a gota na superfície e a superfície do sólido estudado. O equilíbrio das forças que atuam na deformação da gota é descrito pela equação de Young (Equação 1), que relaciona o ângulo de contato entre um líquido e uma superfície sólida e as tensões interfaciais líquido-vapor (γ_{LV}), sólido-vapor (γ_S) e sólido-líquido (γ_{SL}).

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL} \quad \text{Equação 1}$$

Conforme mostra a Figura 8, existem 4 denominações para os estados de molhabilidade que as gotículas de água podem assumir. Com base nos valores de ângulos de contato para gotículas de água, os materiais são classificados como super-hidrofílicos ou hidrofílicos quando a água se espalha em sua superfície ou hidrofóbicos ou super-hidrofóbicos, quando ela é repelida.

Figura 8 - Gotas de água em uma superfície sólida. (a) Esquema do ângulo de contato e tensões superficiais descritas na equação de Young. (b) Deformações de gota de água em função do tipo de superfície sólida



Fonte: Adaptado de THÜRMER *et al*, 2012 e ATRIA (2016).

Conforme mencionado nas seções anteriores, materiais que repelem água, ou seja, apresentam características hidrofóbicas, são cada vez mais estudados devido ao seu potencial para diversas aplicações. Conhecer o modelo de molhabilidade que se aplica à superfície

estudada é importante para que se possa descrever e entender os fenômenos estudados. Como o modelo de Young não pode ser utilizado para explicar o comportamento do líquido em superfícies rugosas, o modelo de Wenzel e de Cassie-Baxter foram propostos.

4.2.1 Modelo Wenzel

Conforme mostra a Equação 1, a energia de superfície é proporcional ao ângulo de contato, com isso pode-se dizer que o ângulo de contato de Young é resultado do equilíbrio termodinâmico de energia de superfície na interface sólido-líquido-vapor. Quando se estuda superfícies rugosas, a rugosidade da superfície modifica suas propriedades de molhabilidade, de modo que o modelo de Young (Figura 9a) não pode ser aplicado para explicar tal fenômeno (DARBAND *et al.*, 2018).

Diante disso, Wenzel propôs em 1936 uma equação onde a rugosidade e a energia de superfície estão associadas ao ângulo de contato, segundo a equação 2.

$$r(\gamma_S - \gamma_{SL}) = \gamma_{LV} \cos \theta_w^* \quad \text{Equação 2}$$

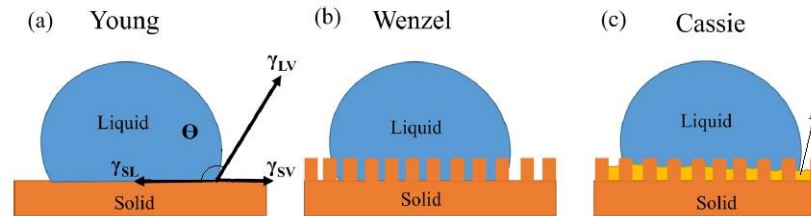
Onde θ_w^* corresponde ao ângulo de contato de Wenzel, que é diferente devido à rugosidade da superfície. Este modelo sugere que o líquido entra nas cavidades da superfície rugosa, ou seja, uma molhabilidade homogênea conforme apresenta a Figura 9b (WENZEL, 1936).

Apesar de considerar as cavidades de superfícies rugosas, o modelo proposto por Wenzel não considera superfícies heterogêneas, que contém interface com vapor, por exemplo. Por este motivo o modelo de Wenzel não se aplica ao estudo de superfícies super-hidrofóbicas obtidas a partir de materiais hidrofílicos hierarquicamente estruturados.

4.2.2 Modelo Cassie-Baxter

O modelo Cassie-Baxter surgiu em 1944 para explicar o comportamento do ângulo de contato em superfícies heterogêneas. Segundo este modelo, a gota de líquido entra em contato apenas com as pontas das estruturas responsáveis pela rugosidade e que os espaços mais internos estão preenchidos por ar, que aumenta a tensão superficial do líquido, fazendo com que estas gotas fiquem suspensas conforme a Figura 9c.

Figura 9 - Modelos de molhabilidade. (a) Modelo de Young; (b) Modelo de Wenzel; (c) Modelo de Cassie-Baxter



Fonte: DARBAND *et al.* (2018).

O modelo de Cassie-Baxter, também chamado de estado composto, tem sido amplamente utilizado para descrever o fenômeno da super-hidrofobicidade. O ângulo de contato aparente pode ser calculado através da Equação 3.

$$\cos \theta = f_1 \cos \theta_1 + f_2 \cos \theta_2 \quad \text{Equação 3}$$

Onde f_1 e f_2 são as frações associadas às espécies 1 e 2, que compõem a superfície e que possuem os ângulos de contato θ_1 e θ_2 respectivamente. Numa superfície super-hidrofóbica, a gota do líquido fica em contato com as pontas das rugosidades da superfície e o ar que se encontra nas cavidades dessas rugosidades (CASSIE e BAXTER, 1944). Como o ângulo de contato para o ar é de 180° , pode-se reescrever a Equação 3, se f_2 for considerado com a fração de ar em contato com a água (Eq. 4).

$$\cos \theta = f(1 + \cos \theta) - 1 \quad \text{Equação 4}$$

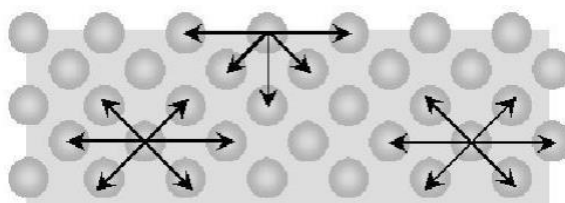
Dentre os três modelos aqui apresentados, o que mais se adequa ao estudo de superfícies super-hidrofóbicas formadas por estruturas hierárquicas das folhas utilizadas no presente trabalho é o modelo de Cassie-Baxter. Existem, porém, outros parâmetros como energia de superfície e ângulo de deslizamento, que devem ser considerados e monitorados nas análises.

4.2.3 Energia de superfície

Nos cálculos de molhabilidade, a tensão superficial está para o líquido assim como a energia de superfície está para os sólidos. O conceito de energia de superfície pode ser

explicado utilizando um líquido como exemplo. Os átomos de um líquido estão em constante movimento buscando sempre uma posição de menor energia potencial, isto é, um local onde as forças repulsivas e atrativas estão em equilíbrio. Porém, como mostra na Figura 10, os átomos da superfície estão expostos a forças dirigidas para o centro do material, de modo que a interface com o outro meio fica sob tensão pela desigualdade das forças aplicadas sobre estes átomos (WHITE, 2005).

Figura 10 - Comportamento da energia de superfície em um líquido



Fonte: BURKARTER (2010).

De acordo com a termodinâmica, a superfície é o local de maior energia quando comparado com o restante do sólido. Essa energia de superfície está diretamente ligada à adesão de um material a outro, e quanto maior a energia de superfície, maior será esta adesão. A relação entre a energia de superfície e o trabalho de adesão é descrita pela equação de Young-Dupré (Equação 5), em que W_a é o trabalho de adesão e γ_{LV} a tensão interfacial líquido-vapor.

$$W_a = \gamma_{LV}(\cos \theta + 1) \quad \text{Equação 5}$$

Por isso, superfícies com energia maior propiciam o espalhamento do líquido, sendo assim denominados hidrofílicos. No caso de superfícies hidrofóbicas, a energia de superfície do sólido é menor do que do líquido, fazendo com que haja uma repulsão e o líquido não “molhe” o sólido (BURKARTER, 2010). De acordo com o princípio da energia mínima, a natureza tende sempre a um estado de menor energia. É por esta razão, por exemplo, que uma gota de água tende à forma esférica, pois esta é a forma geométrica de mesmo volume com a menor área superficial, resultando em um estado de menor energia, em que os processos espontâneos são levados. Da mesma forma, a adesão de um material sobre outro será tanto melhor quanto maiores forem as energias de superfícies envolvidas.

Segundo Fowkes (1964) o cálculo da energia de superfície deve considerar fatores intrínsecos dos materiais estudados, como a natureza química, que gera interações dipolo/dipolo, ligações de hidrogênio e dipolo/dipolo-induzido. Estas interações atuam diretamente nas forças coesivas intermoleculares e consequentemente causam variações na

energia de superfície como forças dispersivas (γ^d) ou não dispersivas (γ^p). Com o objetivo de levar em consideração a ação dessas forças Wu (1971) propôs a Equação 6.

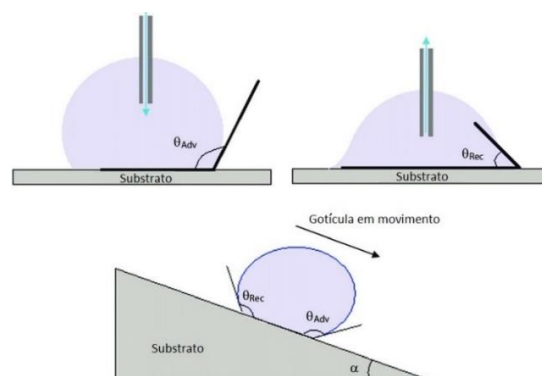
$$\gamma_{LV}(\cos \theta + 1) = \frac{4(\gamma_S^d \gamma_{LV}^d)}{\gamma_S^d + \gamma_{LV}^d} + \frac{4(\gamma_S^p \gamma_{LV}^p)}{\gamma_S^p + \gamma_{LV}^p} \quad \text{Equação 6}$$

Este método é conhecido como média harmônica e pode ser aplicado para cálculos de energia de superfície quando se deseja estudar a interface entre polímeros e líquidos, tornando-se uma excelente ferramenta para caracterização de polímeros que biomimetizam superfícies super-hidrofóbicas como propõe este trabalho (BURKARTER, 2010).

4.2.4 Ângulo de deslizamento e histerese do ângulo de contato

Durante as medidas de ângulo de contato, podem ocorrer variações de acordo com a maneira que a gota se acomoda na superfície. A equação de Young descreve apenas ângulo de contato estático, mas numa superfície real, existem vários ângulos de contato estáveis. Se o líquido é constantemente adicionado e removido de uma gotícula, inicialmente o contato permanece estático e o ângulo de contato aumenta ou diminui. O maior ângulo de contato antes do movimento é chamado de ângulo de avanço (θ_{Adv}) e o menor, ângulo de recuo (θ_{Rec}), definindo assim, uma faixa de ângulos possíveis (Figura 11). A histerese do ângulo de contato é definida como a diferença entre os ângulos de avanço e de recuo.

Figura 11 - Esquemas de histerese de ângulo de contato. (a) ângulos de contato de avanço e de recuo numa superfície plana obtidos através do aumento e diminuição do volume da gota, respectivamente; (b) em superfície inclinada com um ângulo de inclinação α



Fonte: Adaptado de TOOSI, MORADI & HATZIKIRIAKOS (2017).

O ângulo de inclinação α apresentado na Figura 11 é denominado ângulo de deslizamento, ou seja, é o menor ângulo de inclinação horizontal onde a gota começa a rolar na superfície do sólido. Ele também apresenta a força motriz e as forças adesivas do líquido. Apesar do ângulo de deslizamento e da histerese do ângulo de contato possuírem definições diferentes, eles têm natureza física similar, e os estudos desses parâmetros são fundamentais para avaliar as propriedades super-hidrofóbicas e autolimpantes das superfícies (Ma *et al.*, 2017).

4.2.5 Superfícies super-hidrofóbicas

Uma superfície é considerada super-hidrofóbica quando apresenta ângulos de contato estático maiores do que 150° , ângulo de deslizamento e histerese de ângulo de contato menor do que 10° (DARBAND, 2018). Para se obter uma superfície com estas propriedades é necessário que haja a formação do composto sólido-ar-líquido. Ela é muito importante para que se tenha uma superfície super-hidrofóbica, sendo a chave para um elevado ângulo de contato e baixos ângulos de deslizamento e de histerese que garantem a super-hidrofobicidade e propriedades autolimpantes a uma superfície.

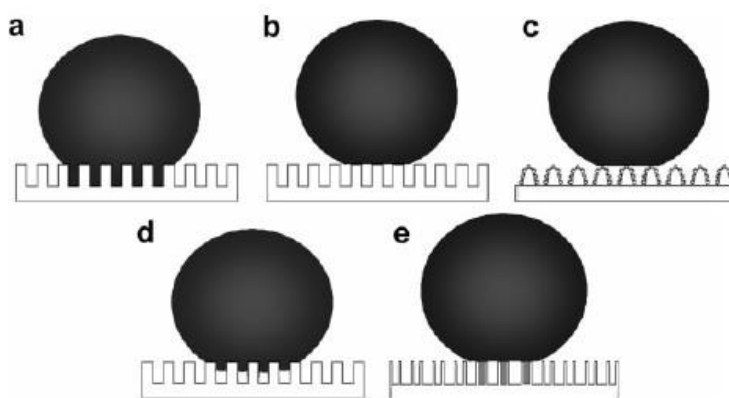
As bolsas de ar, descritas pelo modelo Cassie-Baxter, podem aumentar o ângulo de contato tanto de superfícies hidrofílicas como hidrofóbicas. Como este efeito é metaestável, fenômenos como a capilaridade causados pela condensação do líquido podem destruí-lo, fazendo com que a superfície perca suas propriedades de repelência à água. Estruturas nanométricas evitam esses processos de condensação eliminando os efeitos como a capilaridade. Por isso que a presença de estruturas hierárquicas está presente nas superfícies super-hidrofóbicas (XIA, 2008).

Apesar do modelo de molhabilidade de Cassie-Baxter ser fundamental para que uma superfície seja autolimpante, as superfícies super-hidrofóbicas apresentam 5 estados possíveis: o estado Wenzel, estado Cassie, estado “lótus”, estado de transição entre os estados Wenzel e Cassie e o estado “Gecko” (“lagartixa”) representados pela Figura 12.

No estado Wenzel, o líquido penetra nas cavidades da superfície, aumentando assim as forças adesivas e fazendo com que o ângulo de deslizamento seja maior (Figura 12a). No estado Cassie ocorre o contrário, o líquido não penetra nos poros da superfície do sólido apresentando um comportamento de não-molhabilidade, por este motivo a área de contato é menor e as forças

adesivas diminuem, fazendo com que o ângulo de deslizamento seja pequeno (Figura 12b). O “efeito lótus” é conhecido como um caso especial do efeito Cassie, que tem sua hidrofobicidade elevada devido a presença de estruturas hierárquicas (nano-micro) e apresenta propriedade autolimpante devido à baixa penetração de água entre essas estruturas hierárquicas (Figura 12c). Assim como o efeito lótus, o “efeito pétala”, Figura 12d, que recebe este nome porque é observado nas pétalas de rosas, também apresenta hidrofobicidade, porém não dispõe da propriedade autolimpante. Isso ocorre porque o “efeito pétala” trata-se de um estado de transição entre o estado Wenzel e o Cassie, onde a água penetra parcialmente nas cavidades superficiais do substrato e as forças adesivas entre ele e a água são elevadas, de modo que a gotícula de água tem dificuldade em deslizar. Finalmente, tem-se o estado “Gecko”, Figura 12e, recebe este nome devido às suas propriedades de adesão elevada. Neste estado, o ar fica selado em nanotubos, com o objetivo de induzir um ângulo de contato elevado. As forças adesivas entre o líquido e a superfície aumentam devido as interações de van der Waals, e uma força adesiva é gerada devido à pressão negativa que é induzida pelo ar selado no interior dos nanotubos dispersos na superfície (WANG e JIANG, 2007).

Figura 12 - Diferentes estados de superfícies super-hidrofóbicas. a) Estado Wenzel, b) Estado Cassie, c) Estado “lótus”, d) Estado de transição entre estados Wenzel e Cassie, e) Estado “Gecko”



Fonte: WANG & JIANG (2007).

Várias superfícies super-hidrofóbicas são produzidas em laboratório ou comercialmente. Além de se mostrar interessante para muitas aplicações, como janelas autolimpantes, tintas para casas, navios, barcos, e painéis solares, as superfícies super-hidrofóbicas também podem ser

utilizadas para conversão e conservação de energia. Por isso, as técnicas de reprodução de superfícies com essas propriedades são cada vez mais exploradas (BHUSHAN *et al.*, 2009).

Métodos como sol-gel, *electrospinning*, métodos eletroquímicos, técnicas que envolvem plasma, deposição *layer-by-layer*, PDV ou *soft lithography* são exemplos das diversas maneiras de produzir superfícies super-hidrofóbicas atualmente. Na primeira etapa deste trabalho a *soft-lithography* foi utilizada como principal técnica de reprodução de superfícies bioinspiradas (BHUSHAN, JUNG e KOCH, 2009; ZHANG, *et al.*, 2015).

4.3 HIDROFOBICIDADE E RESISTÊNCIA BACTERIANA

Diante de muitas das aplicações das superfícies hidrofóbicas, tem-se a função antibacteriana. A relação entre a molhabilidade e a prevenção do crescimento bacteriano tem sido estudada por muitos pesquisadores nos últimos anos. Em 2001 Tiller *et al.* desenvolveram lâminas de vidro estéreis por adesão covalente de poli (brometo de 4-vinil-N-hexilpiridinium) reduzindo em 94% a adesão de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. epidermidis*. Alguns anos mais tarde Vilčnik *et al.* (2009) conseguiram reduzir 100% do crescimento *E. coli* em tecidos recobertos com os compostos apolares como o diurapropyltriethoxysilane [bis (aminopropil)-polidimetilsiloxano] (PDMSU) e 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorooctiltrietoxilsilano (PFOTES). Os recobrimentos apolares utilizados por esses pesquisadores atuam diminuindo a energia de superfície do substrato, e por conseguinte diminuem o potencial de adesão bacteriana.

A adesão às superfícies associada à formação de biofilme é um dos diversos mecanismos de resistência das bactérias, sendo assim um dos fatores responsáveis pela dificuldade no combate às infecções. Como a proliferação de bactérias resistentes causa a morte de pelo menos 700 mil pessoas por ano, contribuindo com o aumento da taxa de mortalidade e elevando os gastos nos sistemas de saúde (ROCHA, 2017), encontrar maneiras de reduzir ou evitar este problema tem se tornado cada vez mais necessário.

Ao dificultar adesão bacteriana, reduz-se o potencial de formação de biofilme, que atua como uma capa protetora bloqueando a ação dos antibióticos (BARTLET *et al.*, 2018). Além de ser prejudicial para a vida humana, causando infecções, cáries ou periodontite, o biofilme pode comprometer processos industriais como por exemplo aumento da corrosão de metais,

contaminação de equipamentos da indústria alimentícia ou redução da vida útil dos cascos de navios.

Com o objetivo de entender e controlar os mecanismos de adesão bacteriana a comunidade científica propõe duas abordagens físico-químicas convencionais: a teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DVLO) e a extensão da teoria de DVLO (termodinâmica) (HORI & MATSUMOTO, 2010).

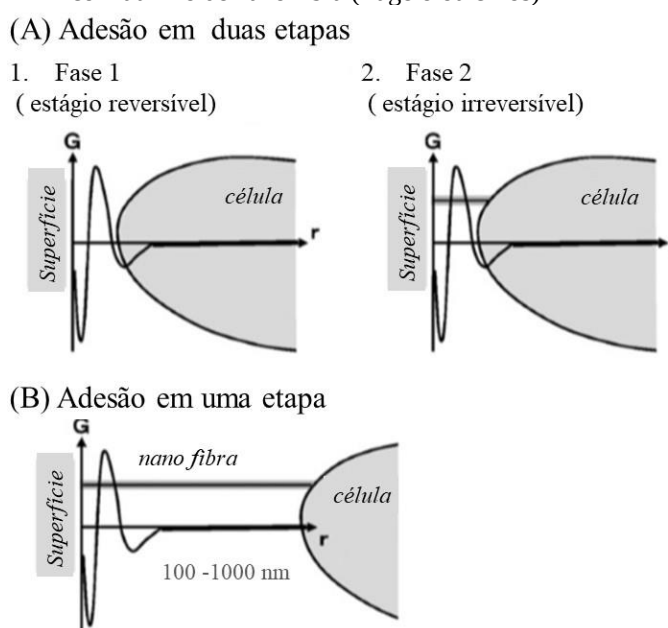
A teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), considera uma suspensão bacteriana como um coloide. Como a maioria das bactérias tem dimensão entre 0,5 e 2 μm , elas se comportam como partículas quando dispersas em líquido, e esse líquido se torna um coloide. Nessa teoria a interação total entre a superfície e a partícula (bactéria) é o somatório das interações de Coulomb e van der Waals de cada partícula. Com base na teoria de DVLO, a adesão bacteriana pode ocorrer em duas etapas: na fase inicial é um processo reversível e instantâneo (fase-física) onde bactéria se move em direção à superfície por movimento browniano e a adesão da bactéria ocorre pela diferença de cargas entre a superfície e a parede celular bacteriana. Como a força de van der Waals é predominante na vizinhança da superfície, as partículas (bactérias) não podem se separar da superfície por movimento browniano, formando assim uma adesão irreversível, como pode ser observado na Figura 13A. Já no caso da adesão por uma etapa, Figura 13B trata-se de um processo irreversível que depende do tempo que a célula se liga à superfície através de uma nano fibra de maneira irreversível. Essa fase também é chamada de fase molecular ou celular devido a utilização de flagelos/cílios (celular) ou pela produção de polímeros extracelulares (molecular), a nano fibra, que aderem à superfície (AN & FRIEDMAN, 1998).

No caso da abordagem termodinâmica, as interações entre a interfaces bactéria-superfície, superfície-meio líquido, e meio líquido-bactéria são calculadas, ajudando assim a explicar o motivo pelo qual uma bactéria hidrofóbica tem mais facilidade de aderir à uma superfície hidrofóbica, por exemplo (AN & FRIEDMAN, 1998). Com base nisso, Van Oss desenvolveu uma extensão da teoria de DVLO, onde as interações hidrofílicas/hidrofóbicas (polaridade), as interações osmóticas e as interações ácido-base também são consideradas no processo de adesão bacteriana.

Apesar da extensão da teoria de DVLO descrever bem o processo de adesão bacteriana, o cálculo teórico ainda apresenta desvios quando tenta prever comportamento das bactérias experimentalmente. As propriedades físico-químicas do filme interfacial superfície-meio

contendo suspensão bacteriana são diferentes das propriedades da superfície (SCHNEIDER, 1996). Além disso, uma suspensão bacteriana não pode ser considerada como um coloide, pois bactérias são seres vivos com características próprias. As bactérias Gram-negativas têm uma membrana externa de lipopolissacarídeos que contribuem muito para a adesão bacteriana, por exemplo.

Figura 13 - Esquema do processo de adesão bacteriana. (A) Adesão convencional, em duas etapas; (B) Adesão com auxílio de nano fibra (flagelo ou cílios)



Fonte: Adaptado de HORI & MATSUMOTO (2010).

Os lipopolissacarídeos presentes nas paredes celulares das Gram-negativas são compostos por lipídeos, polissacarídeos internos (*core*) e por uma camada periférica de antígenos. O antígeno comum é formado por unidades de 10-20 α -D-ramnose, enquanto que o serotipo específico do antígeno, é o composto por unidades repetidas de di- a pentassacarídeos (BURROWS, CHARTER & LAM, 1996). Esse serotipo forma ligações de hidrogênio com a superfície de aproximadamente 2,5 k.T J, sugerindo que em torno de 1000 ligações de hidrogênio sejam suficientes para que a célula fique aderida com firmeza à superfície (JUCKER *et al.*, 1997).

Como a presença de cílios ou de flagelos também contribuem para a diminuição da barreira energética que dificulta a adesão celular, tomou-se representantes das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas para realização dos experimentos. A *Escherichia coli* foi escolhida

como representante das bactérias Gram-negativas flageladas e o *Staphylococcus aureus* das bactérias Gram-positivas não flageladas. Estes experimentos foram feitos para comparar a influência dessas propriedades na adesão bacteriana em uma superfície que apresenta hidrofobicidade estrutural, causada pela rugosidade bioinspirada na superfície das folhas da *C. esculenta* (L.) Schott, diferindo das superfícies previamente testadas que apresentavam hidrofobicidade química por deposição de um material apolar.

4.3.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, com o formato de bastão, medindo em média 3,3 x 1,3 µm (OSIRO *et al.*, 2012). Muitas *E. coli* são encapsuladas, e suas cápsulas são compostas por polissacarídeos ácidos. Outra característica da *E. coli* é que ela não produz esporos e sua locomoção é feita por flagelos, ela também apresenta apêndices filamentosos como fímbrias e pili que colaboram para sua adesão às superfícies, (Figura 14) e como essas fímbrias são hidrofóbicas, elas têm afinidade por superfícies hidrofóbicas (PERCIVAL & WILLIAMS, 2014).

Figura 14 - *Escherichia coli*



Fonte: CLARK (2015).

Os dois componentes principais da sua parede celular são os lipopolissacarídeos, responsáveis pela antigenicidade da célula, que é a capacidade que um antígeno tem e se ligar aos componentes do sistema imune, e a mureína que determina o formato de bastão da *E. coli* (BRAUN & REHN, 1969).

Como a *E. coli* é uma bactéria de origem fecal encontrada no trato digestivo de animais de sangue quente, majoritariamente em humanos, sua detecção em água potável é um indicativo de contaminação com resíduos de excreção, sendo comumente mencionada como índice de coliformes. Alguns grupos da *E. coli* não são patogênicos, porém outros grupos como a *E. coli*

O157:H7 podem produzir a toxina Shiga que causa diarreia excessiva podendo levar à morte (CLARK, 2015).

Estudos recentes têm mostrado que a *E. coli* começa a apresentar resistência à ação de antibióticos desde o momento que se adere ao substrato e continua se tornando mais resistente à medida que o biofilme se forma (LEUNG *et al.*, 2012). Além disso, ela ainda conta com a propriedade de passar rapidamente a carga genética para que as gerações posteriores também possam se tornar resistentes a determinados antibióticos (TYERMAN, PONCIANO & HARMON, 2013). Por isso, prevenir os seus mecanismos de resistência, tem se tornado um tópico de crescentes pesquisas.

4.3.2 *Staphylococcus aureus*

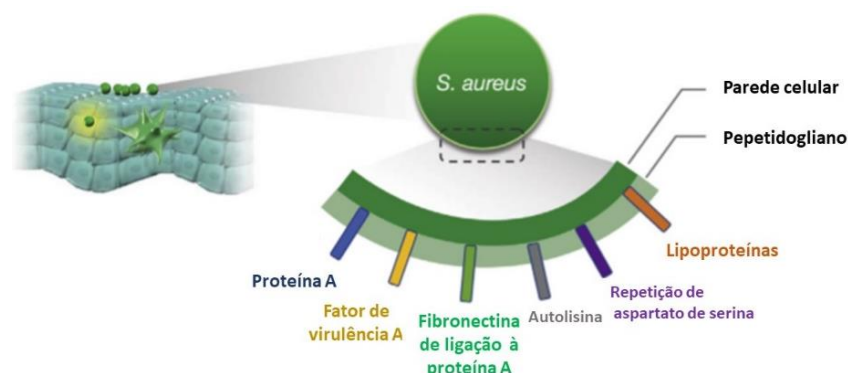
O *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva com o formato esférico de raio médio de 1 µm de diâmetro (MONTEIRO *et. al*, 2015). Em humanos saudáveis o *S. aureus* pode ser encontrado em diversos locais da pele e mucosas, porém é encontrada em maior quantidade nas mucosas nasais (HETEM, ROOIJAKKERS, EKKELENKAMP, 2017). Esta bactéria está presente em pelo menos 20% dos humanos, podendo causar infecções na superfície da pele, formação de pus e infecções em tecidos macios.

Ela pode ser transmitida de pessoa por pessoa através do contato com as mãos ou através do ar. O *S. aureus* é a causa de severas infecções hospitalares, a transmissão de *S. aureus* resistentes do tipo MRSA, por exemplo, que são menos susceptíveis à ação de antibióticos, é um risco para os pacientes.

Conforme mencionado anteriormente, uma das causas dessa resistência bacteriana é a formação de biofilme, que está diretamente ligada ao processo de adesão do *S. aureus* à superfície do substrato. A formação do biofilme pelo *S. aureus* é dividida em 3 etapas principais: adesão, acumulação e dispersão. O *Staphylococcus aureus* produz moléculas de adesão que interagem com a superfície do substrato. A fase de adesão inicial ocorre por interações hidrofóbicas, eletrostáticas e de van der Waals. Para que o biofilme se forme é necessário que as células se aglomerem em multicamadas e juntas, sejam capazes de produzir moléculas extracelulares que vão atuar como a camada “protetora” do biofilme. Em seguida para estabilizar o biofilme formado elas se dispersam através da produção de enzimas, como a autolisina (GRISTINA, 1987).

A composição da superfície do *S. aureus* tem um papel importante na adesão dela a diversos substratos, mais de 20 proteínas classificadas como matrizes celulares adesivas estão covalentemente fixadas na superfície do peptidoglicano que reveste a parede celular do *S. aureus*, conforme apresentado na Figura 15 (IWAMOTO *et al.*, 2019).

Figura 15 - Parede celular do *S. aureus*



Fonte: Adaptado de IWAMOTO, MORIWAKI, MIYAKE (2019).

Como essas proteínas funcionam como âncoras que facilitam a adesão bacteriana à superfície, propõe-se a variação da estrutura da superfície do substrato para dificultar fisicamente a adesão das mesmas.

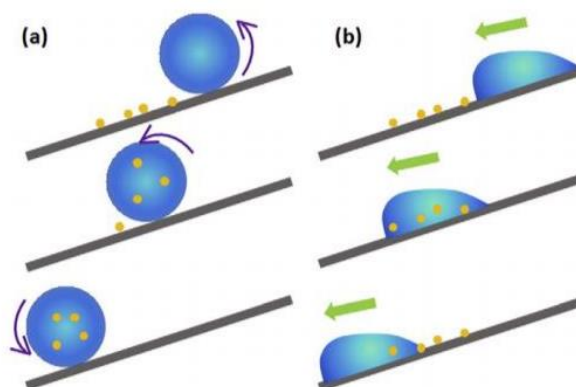
4.4 BACTERICIDA ESTRUTURAL

Conforme apresentado nos tópicos anteriores, a adesão bacteriana no seu estágio inicial imediato, pelo menos no caso da *E. coli* e do *S. aureus*, ocorre por interação eletrostática e de van de Waals. Por este motivo, muitos pesquisadores têm proposto recobrimentos de superfícies com substâncias apolares como Vilčnik *et al.* (2009) e Tiller *et al.* (2001), a fim de minimizar essas interações. Porém, poucos tem explorado reduzir a aderência bacteriana através da hidrofobicidade estrutural, causada por um estado Cassie-Baxter obtido devido a presença de estruturas hierárquicas capazes de aprisionar ar e reduzir a interface superfície-líquido, conforme apresentado no item 3.2.5.

Enquanto van den Berg (2017) desenvolvia tecidos com propriedades antibacterianas, ele propôs a criação de uma superfície antiadesiva que evitasse a contaminação por bactérias. No trabalho dele foi explorada a ideia de super-hidrofobicidade e de superfícies autolimpantes, para a produção de superfícies antiadesivas, partindo do princípio de que uma superfície

autolimpante pode ter os contaminantes facilmente removidos por lavagem ou por remoção da gota contaminada (Figura 16).

Figura 16 - Efeitos autolimpantes. (a) de uma superfície com ângulo de contato elevado e baixo ângulo de deslizamento (b) de uma superfície com ângulo de contato baixo e ângulo de deslizamento alto



Fonte: ZHANG *et al.* (2016).

Ao produzir superfícies com estruturas de diâmetro menores, maiores e do tamanho da espécie da bactéria estudada, observa-se que a quantidade de bactérias diminui consideravelmente quando os diâmetros das estruturas da superfície se aproximam das dimensões da bactéria (VAN DEN BERG, 2017).

Com base nisso, este trabalho se propôs a testar a hidrofobicidade como agente antibacteriano passivo, e a partir desses testes, foi depositada uma patente para o recobrimento imprimível híbrido de material bioativo com inibição estrutural de formação de placa bacteriana (SANTA-CRUZ *et al.*, 2019). A partir desta patente, espera-se que posteriormente seja possível desenvolver uma ferramenta que possa ajustar computacionalmente as dimensões das estruturas superficiais ao tamanho da bactéria que se deseja combater para a produção de superfícies antibioadesivas por impressão de materiais.

4.5 IMPRESSÃO DE MATERIAIS

A impressão de materiais é uma técnica de estruturação versátil que vem crescendo desde a década de 80, podendo ser feita ponto a ponto, linha por linha ou camada por camada, a partir de modelos computacionais (desde 3D CAD, comumente utilizado na impressão 3D, ou até mesmo em bitmap) (CHEN *et. al*, 2019).

Dentre as técnicas de impressão de materiais no estado fluido/líquido tem-se: a extrusão, *stereo-lithography*, projeção de luz digital, polimerização dois fótons, a impressão à jato de tinta

e a *soft lithography*. A impressão por extrusão permite a produção de estruturas complexas em 3D através da utilização de um filamento de polímero ou de um compósito polimérico que é aquecido e liberado pelo bico da extrusora de acordo com o padrão computacional em CAD. A *stereo-lithography* é um processo no qual um líquido que pode ser curado com uma luz emitida a um determinado comprimento de onda (geralmente na faixa do UV) e à medida que a camada, linha ou ponto da estrutura a ser impressa passa pelo processo de cura, os pontos, linhas, ou superfícies subsequentes são adicionados.

A projeção de luz digital é um caso particular da *stereo-lithography*, nesta técnica um material fotopolimerizável é depositado sobre uma “máscara digital” e um feixe de luz que induz a polimerização é lançado sobre o fluido. A polimerização de dois fótons foi desenvolvida recentemente para produzir estruturas 3D em escala micrométrica, e nela a polimerização é feita pela absorção de dois fótons em locais específicos de resinas fotossensíveis.

A impressão por jato de materiais é um método muito conhecido por ser utilizado nas impressoras convencionais de impressão a jato de tinta, e consiste na ejeção de um líquido de maneira contínua ou por Drop-on-Demand (DoD) (CHEN, 2019).

4.5.1 Impressão a jato de tinta

A impressão a jato de tinta é um tipo de impressão que permite que materiais dos mais diversos tipos possam ser impressos através de microfluidica. Nos últimos anos essa técnica tem sido utilizada para a impressão de materiais nas mais variadas áreas de aplicação como dispositivos para monitoramento de exposição à raios UV (SOUSA *et al.*, 2016), engenharia de tecidos (NAKAMURA, 2006), e dispositivos eletrônicos flexíveis (SIRRINGHAUS, 2000). A principal vantagem da utilização desta técnica é a impressão por DoD com gotas da ordem de picolitros garantindo precisão na impressão de padrões em vários tipos de substratos. Para que o processo de impressão pela tecnologia DoD seja preciso, as etapas de formação de gota, interação da gota com o substrato e evaporação da parte volátil do fluido de impressão devem ser bem entendidas e controladas.

A tecnologia DoD gera gotas individuais, e a formação das gotas é feita pela propagação de um pulso de pressão no fluido nos bicos de impressão. Existem dois métodos de pressurização para a ejeção do fluido de impressão, são eles a DoD térmica, onde um filme fino é aquecido por

corrente elétrica, aquecendo assim o fluido e gerando pressão capaz de ejetá-lo dos bicos de impressão; e a DoD piezoelétrica, que gera pressão através da vibração de cristais que ejetam o fluido sem que seja necessária uma variação de temperatura (DERBY,2010).

Além de escolher o modo de ejeção das gotas, os parâmetros de microfluídica devem ser otimizados para o fluido de impressão, de modo que as gotas possam ser ejetadas pelos bicos de impressão de forma controlada e se comportem como gotas estáveis e sem formação de gotículas satélites pelo impacto com o substrato. Os cálculos dos parâmetros de impressão a partir dos números de Reynolds, Weber, Ohnesorge, descritos no item 5.3.3 e apêndice C, são relacionados de modo a predizer se o fluido é imprimível ou não.

A maneira como a gota ejetada interage com a superfície do substrato deve ser considerada, assim como a velocidade mínima para ejeção da gota deve ser calculada (Eq. 7) considerando-se que quanto maior a velocidade de ejeção da gota, maior o impacto dela ao entrar em contato com o substrato, espalhando-se sobre a superfície, e diminuindo assim a resolução de impressão.

$$v_{min} = \left(\frac{4\gamma}{\rho a} \right)^{1/2} \quad \text{Equação 7}$$

v = velocidade de ejeção das gotas

a = diâmetro do bico de impressão

γ = tensão superficial do fluido

O modo com que o soluto está distribuído no fluido é outro fator que pode influenciar a qualidade de impressão, pois uma distribuição não uniforme de partículas no fluido de impressão pode gerar o efeito “borra de café”, ou seja, a taxa de evaporação da parte volátil do fluido de impressão é muito elevada, de modo que a precipitação dos sólidos ocorre na primeira linha de contato entre o fluido e o substrato. Alguns mecanismos como o controle da temperatura da base do substrato com o objetivo de reduzir a taxa de evaporação surgem como alternativas que podem ajudar a reduzir este efeito.

- Parâmetros de impressão do fluido

Para que seja possível prever se o fluido preparado é imprimível, ou seja, que ele seja capaz de gerar gotas esféricas e uniformes ao ser submetido a uma pressão de ejeção, calcula-se o parâmetro de imprimibilidade, denominado Z (DERBY,2010). O valor de Z fornece informações sobre o comportamento do fluido que se deseja imprimir por DoD. Para que haja formação de gotas estáveis os valores de Z devem estar entre 1 e 10. Valores onde $Z < 1$ correspondem a um fluido que é bastante viscoso dificultando a ejeção das gotas. Já valores de $Z > 10$ correspondem a um fluido muito pouco viscoso, que favorece a formação de gotículas satélites.

O valor do parâmetro Z é calculado pelo inverso do número de Ohnesorge (Oh) (Eq. 8).

$$Z = \frac{1}{Oh} \quad \text{Equação 8}$$

O número de Ohnesorge é calculado a partir da relação da raiz do número de Weber (We) pelo número de Reynolds (Re) conforme descrito na equação 9:

$$Oh = \frac{\sqrt{We}}{Re} \quad \text{Equação 9}$$

As equações 10 e 11 são utilizadas para os cálculos dos valores de We e de Re , respectivamente. O valor de número de Weber é obtido a partir da relação entre o quadrado da velocidade de ejeção das gotas (v), da densidade do fluido (ρ), do diâmetro do bico de impressão (a) e da tensão superficial do fluido (γ):

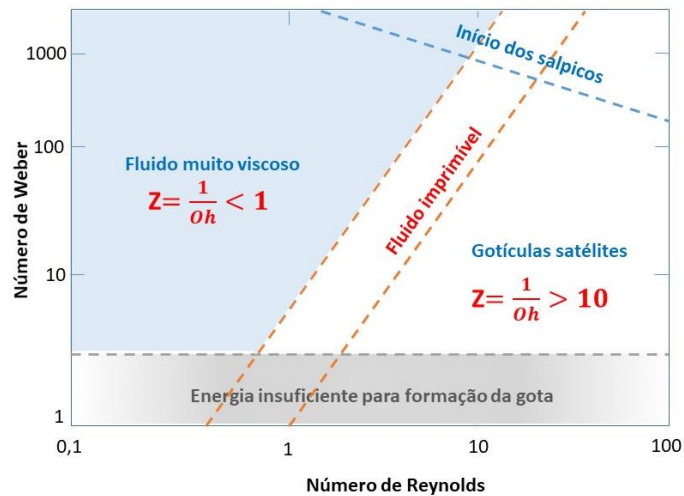
$$We = \frac{v^2 \rho a}{\gamma} \quad \text{Equação 10}$$

O valor de Re é calculado a partir da velocidade média de ejeção do fluido (v), densidade (ρ), o diâmetro do bico de impressão (a), e a viscosidade do fluido (η):

$$Re = \frac{v \rho a}{\eta} \quad \text{Equação 11}$$

Ao traçar um diagrama que tem como coordenadas os números de Weber e de Reynolds (Figura 17), conforme proposto por Derby (2010), chamado de diagrama de imprimibilidade, tem-se uma visão mais esquemática do comportamento do fluido de impressão.

Figura 17 - Regime das propriedades do fluido para impressão à jato de tinta por DoD



Fonte: Adaptado de DERBY (2010).

De acordo com o comportamento do fluido, ajustes na sua composição podem ser feitos de modo que o valor de Z encontre-se dentro do intervalo entre 1 e 10 e que o fluido possa formar gotas estáveis quando ejetado.

- Parâmetros de impressão do *hardware*

Como se trata de impressão a jato de tinta, onde a ejeção do fluido de impressão se faz pela vibração de cristais piezoelétricos, ajustes na voltagem que gera a vibração dos cristais são necessários de modo a otimizar o formato das gotas. Esses ajustes podem ser feitos no software dedicado a impressora de materiais, no presente caso a DMP-2831 (Fujifilm Dimatix, Inc.). Dentre os parâmetros de impressão do hardware tem-se:

A voltagem de ejeção das gotas - essa voltagem deve ser alta o suficiente para fazer os cristais vibrarem de modo a ejetar o fluido numa velocidade ideal em que as gotas geradas sejam estáveis, ela deve ser ajustada de acordo com a viscosidade do fluido.

Frequência máxima de ejeção – é a frequência com a qual as gotas são ejetadas.

Temperatura do cartucho – é um parâmetro importante quando se busca modificar a viscosidade do fluido de impressão sem alterar sua composição. Para isso, o cartucho pode ser aquecido e a viscosidade do fluido de impressão pode ser modificada de acordo com a variação da temperatura, de modo a favorecer a formação de gotas estáveis.

Ciclos de Limpeza – são responsáveis por remover gotículas do fluido que possam ter ficado retidas nos bicos de impressão e remover eventuais partículas que possam estar agregadas, no caso onde o fluido é uma suspensão. A frequência e o modo de cada ciclo de limpeza podem ser ajustados de acordo com a necessidade de cada fluido.

Tempo de espera para a impressão da camada subsequente – Esse intervalo é muito importante no processo de evaporação da parte volátil do fluido de impressão, intervalos muito curtos podem prejudicar a qualidade da impressão ocasionando diminuição da resolução devido ao escoamento do fluido por caminhos preferenciais sobre a camada precedente ou o substrato de impressão. Intervalos muito longos podem inviabilizar a impressão de certos materiais, por isso o ajuste da temperatura da placa onde o substrato é depositado também é um parâmetro de impressão do *hardware*.

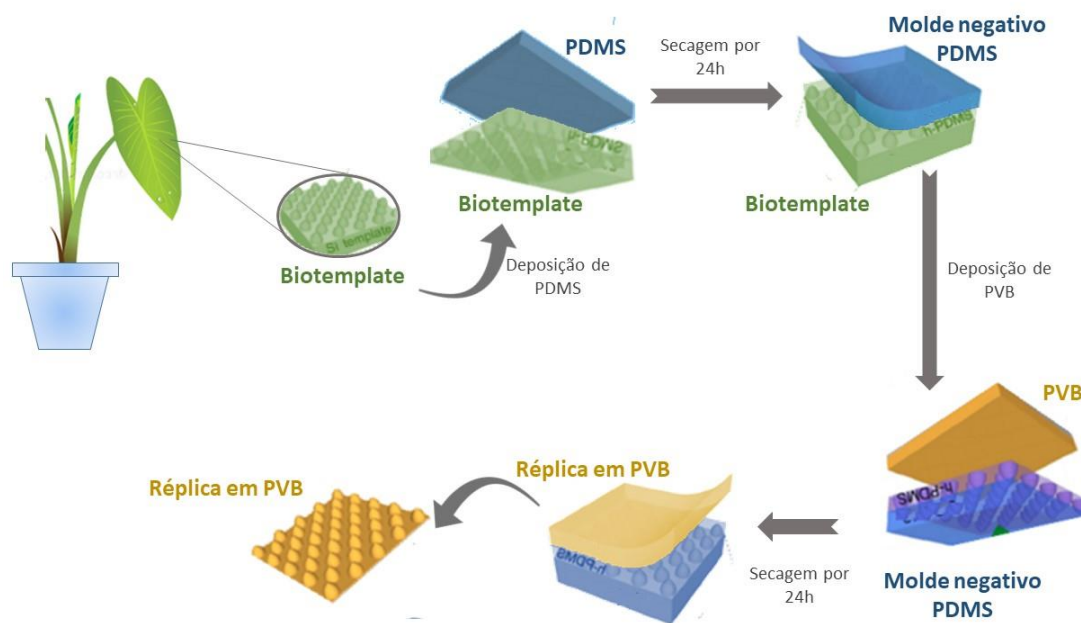
Temperatura da placa de impressão – O substrato é posicionado sobre a placa de impressão, o aumento da temperatura dessa placa favorece a evaporação da parte volátil do fluido de impressão e reduz o intervalo entre as impressões.

4.5.2 Soft lithography

A *soft lithography* é um método de reprodução de superfícies que apresenta um conceito diferente de prototipagem rápida dos vários tipos de reprodução de micro e nano estrutura e dispositivos planos, curvos, ou flexíveis, especialmente quando um baixo custo se faz necessário.

A *soft lithography*, atua como se fosse um “carimbo”, passando por contato direto com o material do molde (*template*) para produção de um “negativo” que numa segunda etapa gera a réplica em 3D. Pode-se fazer uma analogia com o processo de xilogravura (2D) utilizado por artistas regionais como J. Borges e outros. Existem diversos tipos de técnicas que formam a base da *soft lithography*, a impressão por micro contato, a moldagem para a obtenção de réplica e moldagem por micro transferência, são exemplos deles. Todas estas técnicas são baseadas na impressão, moldagem e gravura em relevo utilizando “carimbo” de elastômero (Figura 18).

Figura 18 - Esquema da replicação da superfície da folha de lótus por soft lithography



Fonte: A autora (2020).

Ela é possível graças à não-adesão entre polímeros devido às diferenças de polaridades das cadeias poliméricas. A moldagem para a obtenção de réplica que utiliza o polidimetilsiloxano (PDMS) é cada vez mais aplicada para biomimetizar estruturas presentes na natureza (SOUSA, 2017; BHUSHAN, 2009a). O contato a nível atômico/molecular entre o carimbo de PDMS e a superfície do substrato é fundamental para a obtenção de réplicas fiéis aos *templates* (QIN *et al.*, 2010).

A *soft lithography* oferece uma série de ferramentas para nano fabricação que é o tipo de processo que produz estruturas com pelo menos uma dimensão lateral menor do que 100 nm. A moldagem para a obtenção de réplica e micromoldagem assistida por solvente são técnicas que têm como princípio a moldagem de superfícies. Ambos podem produzir estruturas em nanoescala com grandes áreas e baixo custo associado (QIN *et al.*, 2010).

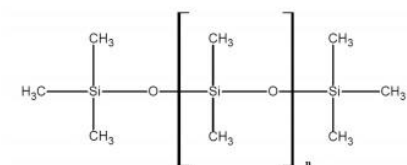
Apesar da fotolitografia (2D) ser o método dominante para a produção de dispositivos e sistemas, especialmente para semicondutores que exigem grande precisão e uniformidades nos padrões, a *soft lithography* (3D) se mostra promissora, pois permite a utilização de diversos tipos de materiais, e o processo experimental simplificado apresenta baixo custo e praticidade quando comparado com os métodos convencionais.

4.5.2.1 Materiais poliméricos para *soft lithography*

- Polidimetilsiloxano-PDMS

O Polidimetilsiloxano é um polímero que está inserido no grupo de polímeros orgânicos sintéticos. Ele apresenta silício e ligações de oxigênio em cadeia totalmente metilada, conforme mostra a Figura 19. Além de ser termicamente estável e permeável a gases, ele é facilmente manipulável à temperatura ambiente (MOREIRA,2013).

Figura 19 - Estrutura química do polidimetilsiloxano.



Fonte: MOREIRA (2013).

O Polidimetilsiloxano é o polímero mais utilizado em *soft lithography* por apresentar características únicas. Ele tem o módulo de tensão de cisalhamento (ou módulo de rigidez) de 0,25 Mpa e módulo de Young (ou módulo de elasticidade) de cerca de 0,5 MPa, característico de um elastômero rígido. Seu caráter elastomérico permite o ajuste à superfície para um contato a nível atômico. Além de não ser tóxico, ele é disponível no comércio a preços acessíveis. É opticamente transparente acima de 300 nm e hidrofóbico, apresentando ângulo de contato com a água de 110 °C. Além disso, pode se aderir reversivelmente a diversos tipos de substratos (QIN *et al.*, 2010).

- Poliacrilatos fotopolimerizáveis

Acrilatos são derivados de ácido acrílico e são muito utilizados em cosméticos para as unhas. Na maioria das vezes é comercializado em géis compostos por etil-acrilato, etil-metacrilato e metil-metacrilato, onde o etil-acrilato atua com as forças adesivas e o etil- e metil-metacrilato atuam como agentes moldadores que se ajustam à superfície à qual são aplicados.

Os acrilatos fazem parte de uma família de polímeros que são um tipo de polímero vinílicos. Os monômeros de acrilato que formam os poliacrilatos são ésteres que contêm um grupamento vinil, ou seja, dois átomos de carbono ligados entre si por uma ligação dupla, diretamente ligados à carbonila do éster. A estrutura básica dos acrilatos e do ácido acrílico é apresentada na Figura 20 (POLYMER SCIENCE LEARNING CENTER, 2018).

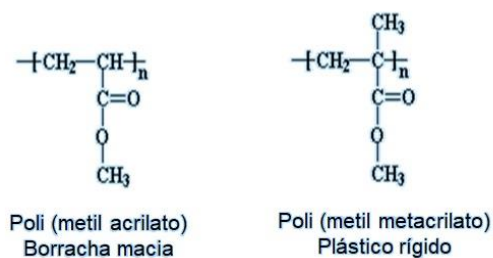
Figura 20 - Ácidos acrílicos



Fonte: Adaptado de POLYMER SCIENCE LEARNING CENTER (2018).

Uma formulação típica de um acrilato fotopolimerizável deve conter pelo menos um fotoiniciador (geralmente uma cetona aromática), um oligômero quelante, e um monômero que age como diluente reativo. A polimerização aniônica dos acrilatos e metacrilatos origina polímeros com estruturas tácticas distintas e consequentemente propriedades físicas muito diferentes entre si, como aumento de cristalinidade por exemplo. Deste modo, o poliacrilato apresenta uma estrutura de menor grau de cristalinidade, portanto, apresenta-se macroscopicamente mais macio, enquanto que o polimetacrilato, por apresentar um grupamento metila ligado ao seu monômero, apresenta características diferentes, tratando-se de um polímero rígido, pois tem maior grau de cristalinidade (DECKER, 1998) (Figura 21).

Figura 21 - Poliacrilato e polimetacrilato



Fonte: Adaptado de POLYMER SCIENCE LEARNING CENTER (2018).

Acrilatos são os tipos de resinas fotopolimerizáveis mais utilizados devido à sua reatividade e a versatilidade de oligômeros de acrilatos funcionalizados (DECKER,1998). Graças à sua propriedade de se moldar à superfície sobre a qual ele é depositado, o gel composto de acrilatos fotopolimerizáveis foi utilizado como molde negativo para produção das réplicas das folhas da *C. esculenta*.

- Polilactato PLA

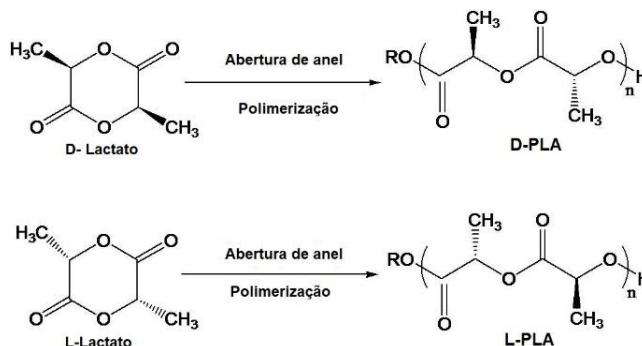
O poli(ácido láctico) ou polilactato é o poliéster alifático biodegradável, atóxico e renovável mais estudado atualmente. Ele tem um potencial comprovado para substituir polímeros de base petroquímica para aplicações industriais ou como um dos principais biomateriais para numerosas aplicações em medicina, já que é aprovado pela FDA para entrar em contato direto com fluidos biológicos (FARAH *et al.*, 2016).

O PLA é formado por monômeros de ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropiônico, LA), por se tratar de uma molécula quiral, existe como dois enantiômeros, Ácido L e D-láctico, que dão origem ao poli (L-lactato) (PLLA) e o poli (D-lactato) (PDLA) e poli (DL-lactato), conforme apresentado na Figura 22.

As propriedades do PLA dependem da proporção de PLLA e de PDLA. Um PLA com conteúdo de PLLA superior a 90% tende a ser cristalino, enquanto o inferior opticamente puro é amorfo. Sua temperatura de fusão, e de transição vítrea diminuem com quantidades decrescentes de PLLA podendo variar entre 190-250 °C. Seu módulo de tensão varia entre 0,35-

3,5 GPa. Seus produtos geralmente são solúveis em dioxano, acetonitrila, clorofórmio, cloreto de metileno, 1,1,2-tricloroetano e ácido dicloroacético (FARAH *et al.*, 2016).

Figura 22. Formação do PLA



Fonte: Adaptado de IIT-Delhi (2009).

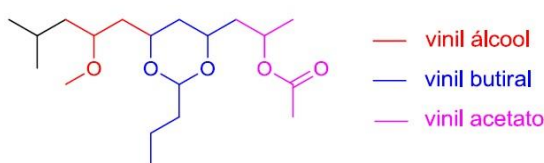
Devido à sua versatilidade de processamento, o PLA pode ser processado por extrusão de filmes ou fios, moldagem por injeção, moldagem por sopro e formação de filme, para diversas aplicações.

- Polivinilbutiral PVB

O PVB é uma resina muito utilizada em aplicações que exigem ligações fortes, transparência ótica, adesão a muitas superfícies e flexibilidade, muito utilizada em vidros laminados de indústrias automotivas, aeroespaciais ou arquitetônicas (DHALIVAL & HAY, 2002).

Ele é produzido pela reação de poli(vinil álcool) com n-butiraldeído, catalisada por um ácido. Ele é um copolímero amorfo de vinilbutiral, álcool vinílico e acetato de vinila, conforme apresentado na Figura 23 (SÔNEGO *et al.*, 2015).

Figura 23 - Estrutura química do PVB



Fonte: SOUSA (2017).

O PVB é compatível com diversos tipos de resinas e apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos como álcoois, glicol éteres e certas misturas de solventes polares e apolares. Além disso é hidrofílico, tem ângulo de contato com a água de 77° , tensão superficial entre 25 e 28 mNm^{-1} e energia de superfície de 38 mJm^{-2} (WYPYCH, 2012). Devido a essas propriedades e à facilidade de manuseio do PVB, seu potencial para a réplica positiva de estruturas biomiméticas foi explorado neste trabalho, e a qualidade estrutural dessas réplicas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura e por microscopia de força atômica.

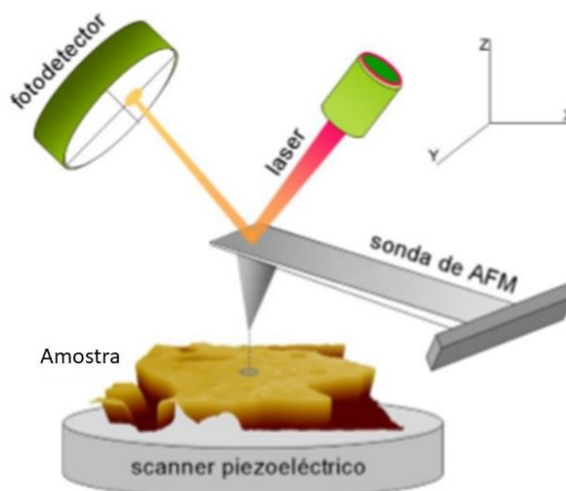
4.6 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica (AFM) é umas das técnicas de caracterização de superfícies em alta resolução, podendo alcançar uma escala de nível subnanométrico. Além de fornecer informações sobre a topologia do material analisado em escala nanométrica, também permite fazer um mapeamento químico da superfície, mecânico, elétrico, magnético e acústico e ótico (BENITEZ *et al.*, 2019).

Os princípios que o AFM utiliza para produzir imagens de uma determinada superfície são baseados nas forças de interação atrativas e repulsivas entre alguns átomos da ponta de um *cantilever* (*tip*) e da amostra. Essas interações são forças químicas de curto alcance, forças de van der Waals e forças eletrostáticas (SEO & JHE, 2008).

A força resultante dessas interações faz com que o *cantilever* se afaste ou se aproxime da amostra causando deflexões. Na parte superior do *cantilever* existe uma superfície espelhada, que reflete a luz de um feixe de laser. Essa luz refletida passa através de uma lente e incide sobre um fotodetector (matriz de fotodiodos). O sinal de saída do fotodetector é captado por um amplificador diferencial, que mede as variações de posição e da intensidade da luz produzidas pelas deflexões do *cantilever*. Desse modo, os movimentos nanométricos são detectados, e convertidos em imagens topográficas da superfície do material em resolução atômica. A amostra é conectada a um piezoelétrico para varredura, resultando nas coordenadas (x, y, z) de cada ponto da sua superfície, e o valor do eixo z corresponde a uma medida direta (BINNING, QUATE & GERBER, 1986). A Figura 24 descreve o esquema de formação da imagem por AFM.

Figura 24 - Esquema simplificado do AFM



Fonte: Adaptado de ONCINS & DÍAZ (2014).

Como o AFM foi desenvolvido para análises de alta resolução, os transdutores que controlam o deslocamento entre a amostra e a sonda (nas direções x, y e z) limitam a superfície analisada a áreas relativamente pequenas, geralmente X-Y 100 μm x 100 μm (BENITEZ *et al.*, 2019).

Existem três tipos de análise de AFM: modo “contato”, modo “não contato” e modo “intermitente”. No modo “contato” o *tip* é posicionado muito próximo da amostra (alguns angstroms), de modo que as forças atrativas entre o *tip* e a amostra deixam de atuar, sendo esse método mais indicado para análise de amostras rígidas. No caso do modo “não contato”, o *tip* é posicionado mais distante da amostra (dezenas de angstroms), de modo que as forças atrativas atuam, sendo o método mais indicado para amostras moles ou macias. No modo intermitente ocorre a vibração do *tip* com próximo à sua frequência de ressonância por um elemento piezoelétrico montado na ponta do AFM, sendo o método mais indicado para amostras maleáveis e deformáveis pela ponta (SEO & JHE, 2008).

Apesar da microscopia de força atômica apresentar alta resolução e uma relação direta entre os níveis de cinza e os valores correspondentes ao eixo z, ela apresenta uma limitação de área de análise. Como neste trabalho busca-se replicar estruturas hierárquicas presentes na superfície das folhas da *C. esculenta*, além da AFM, a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para se obter mais informações sobre a superfície estudada e para poder comparar a aplicação das duas técnicas de microscopia no software aqui desenvolvido.

4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um dos instrumentos mais versáteis para a análise da morfologia microestrutural característica de materiais sólidos. Uma de suas maiores aplicações é a análise de superfícies rugosas. Diferentemente do microscópio ótico, que utiliza a refração da luz proveniente de uma série de lentes para ampliar as estruturas, o MEV utiliza um feixe de elétrons, portanto com comprimento de onda (de De Broglie) associado muito menor, permitindo uma maior ampliação da imagem (MANNHEIMER, 2002).

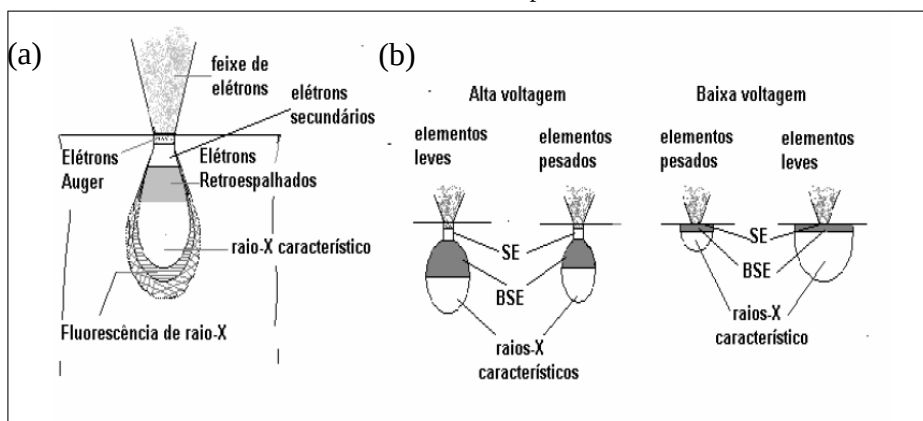
Esses feixes são gerados sob uma elevada voltagem e podem ser focados por campos eletrostáticos ou eletromagnéticos fazendo com que seja possível gerar imagens (DEDAVID, GOMES & MACHADO, 2007). Dependendo do material e da voltagem do feixe de elétrons gerado, além das interações elétron/amostra capazes de gerar imagens, diversos efeitos ocorrem simultaneamente no momento da análise, sendo eles determinados pelo grau de penetração na amostra. Esses efeitos permitem a obtenção de diversas informações sobre a amostra, tais como orientação cristalina, diferenciação entre os elementos que constituem sua superfície, potencial elétrico e campos magnéticos localizados, conforme apresentado na Tabela 1. O tipo de efeito depende da profundidade e da maneira com que ocorre esta interação conforme apresentado na Figura 25 (MANNHEIMER, 2002).

Tabela 1 - Informações obtidas por MEV

Interações	Análise	Informações sobre a amostra
Elétrons secundários	Relevo superficial	Topografia
	Carregamento eletrostático, contraste potencial	Potencial da superfície
Elétrons retroespalhados	Relevo superficial	Topografia
	Contraste de número atômico	Diferenças de composição elementar
	Contraste magnético tipo II	Campos magnéticos internos
	Contraste de orientação	Cristalinidade (amostras policristalinas)
	ECP, AS-ECP, BSED	Estrutura cristalina
Elétrons absorvidos	Catodoluminescência	Fótons
	Raios-X	Microanálise elementar

Fonte: DEDAVID, GOMES & MACHADO (2007).

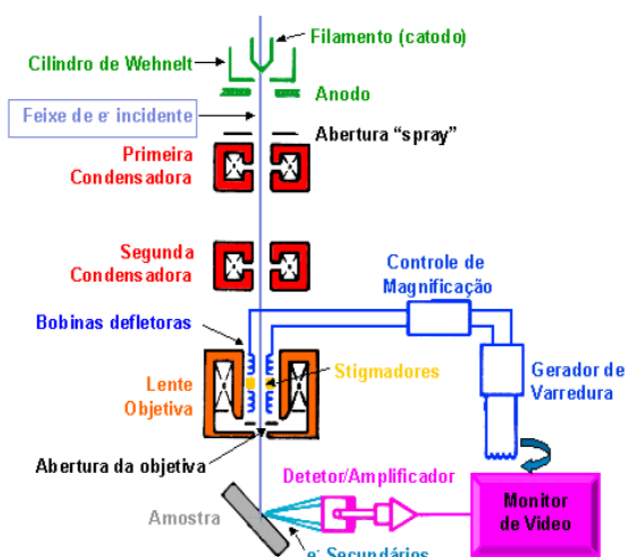
Figura 25 - Volume de interação: a) localização dos sinais emitidos pela amostra; b) relação da voltagem para elementos leves e pesados



Fonte: DEDAVID, GOMES & MACHADO (2007).

Um microscópio eletrônico de varredura é formado pelos seguintes componentes: coluna ótico-eletrônica montada sobre a câmara da amostra, câmara de amostra, sistema à vácuo (bomba turbo molecular e mecânica), detectores para capturar os sinais emitidos pela amostra, controle eletrônico e sistema de imagem, todos eles desempenham uma função específica para possibilitar a obtenção das informações desejadas, conforme mencionado anteriormente (Figura 26).

Figura 26 - Esquema dos componentes do MEV



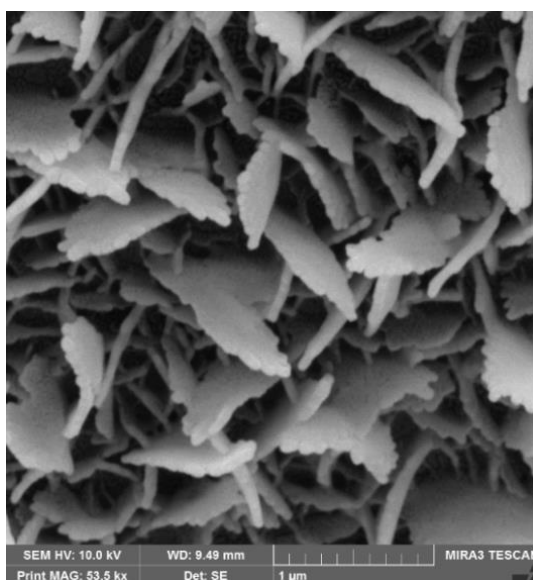
Fonte: DEDAVID, GOMES & MACHADO (2007).

A imagem no MEV é o mapeamento das interações que ocorrem entre os elétrons incidentes e a superfície da amostra. A sua alta resolução na ordem de 1-3 nm, e a praticidade

de preparação de amostras quando comparada a microscopia eletrônica de transmissão, tornando um equipamento de grande utilidade. Nesse caso as imagens de MEV foram utilizadas para acompanhar também a estrutura hierárquica (nano/micro) presente na superfície da *C. esculenta*.

A Figura 27 mostra imagem de micrografia da superfície da folha da *C. esculenta* obtidas por MEV. Uma característica importante das imagens MEV é a aparência tridimensional da amostra, que é um resultado direto da grande profundidade de foco feita pelas lentes objetivas magnéticas (GOLDSTEIN & YAKOWITZ, 1975).

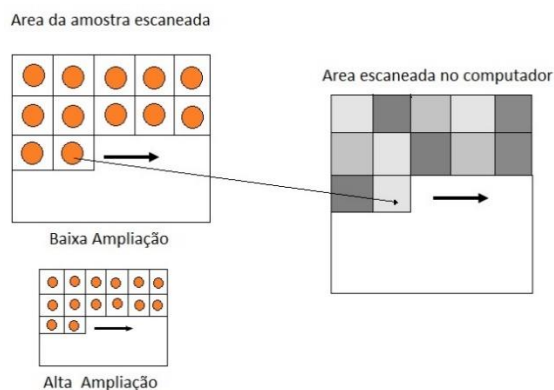
Figura 27 - Exemplo de imagem de MEV de nanocristais de cera presentes na superfície da folha da *C. esculenta* (L.) Schott



Fonte: A autora (2020).

A imagem é formada passo a passo pela varredura sequencial da amostra com a sonda de elétrons. A obtenção da imagem é feita através da aquisição de dados. O imageamento da superfície da amostra depende o sinal analisado e o contraste é dado a partir da emissão dos elétrons secundários ou dos elétrons retroespalhados (ou algumas vezes por fótons, raios-X, ou corrente absorvida, como mostra na Figura 28 (LAGRANGE, 2016).

No MEV a imagem é adquirida ponto-a-ponto, registrando a intensidade do sinal detectado de acordo com a posição da sonda incidente (um feixe de elétrons). Na projeção da imagem existe uma relação temporal, através do mapeamento ponto-a-ponto do espaço objeto no espaço imagem (MANNHEIMER, 2002). A formação da imagem por MEV é uma aplicação da teoria da transferência ótica (HOPKINS, 1953 e 1955, BORN e WOLF, 1959).

Figura 28 - Formação da imagem em MEV

Fonte: Adaptado de LAGRANGE (2016).

Como as amostras são fixadas sobre a mesa de trabalho, o que permite sua movimentação controlada em 5 graus de liberdade: X-Y, coordenada Z, inclinação e rotação, a inclinação da mesa que contém a amostra (*tilt*) permite a obtenção de imagens em diferentes perspectivas de acordo com o ângulo de inclinação. Tal característica torna possível a obtenção de imagens que podem ser aproveitadas como estereopares, utilizados para triangulação dessas imagens para produção de imagens 3D.

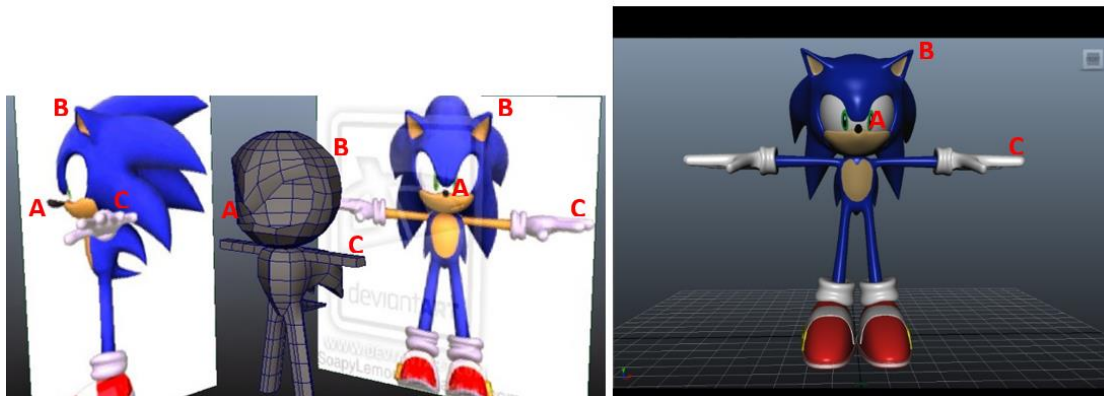
4.7.1 Estereoscopia para produção de imagem 3D

A estereoscopia é um método utilizado para reproduzir um objeto em três dimensões a partir de suas imagens em 2D. Esta projeção em 3D resultante apresenta as mesmas dimensões do objeto nas imagens 2D (BANKS *et al.*, 2012). Através das técnicas de geometria epipolar é possível correlacionar pontos das imagens do mesmo objeto por meio de triangulação e obter uma imagem 3D. Uma imagem em 3D é formada por 3 eixos que correspondem à largura, comprimento e profundidade (x, y, z) (HARTLEY & ZISSERMAN, 2004). A partir disso pode-se afirmar que a estereoscopia pode ser usada como ferramenta para gerar o terceiro eixo (z) a partir de imagens 2-D (x,y).

A reconstrução em 3-D a partir de estéreo imagens baseia-se na triangulação, que se refere ao processo de determinação de um ponto no espaço 3-D, dadas suas projeções em duas ou mais imagens (HARTLEY & ZISSERMAN, 2004). Para que isso seja possível, é necessário determinar conjuntos de pontos (um conjunto por imagem) que são as projeções do mesmo ponto físico em 3-D e estimar os parâmetros dessa projeção. Esse conjunto de pontos, chamado

de pontos de interesse são pontos estratégicos que indicam mudança de nível ou variação da morfologia, conforme mostra a Figura 29.

Figura 29 - Exemplos de pontos de interesse em um objeto que se deseja projetar em 3D



Fonte: Adaptado de CESAR (2011).

Desse modo, a estereoscopia pode ser utilizada como ferramenta para reproduzir micrografias de MEV 2D em imagens em 3D por exemplo. Um trabalho desenvolvido por Oveisi *et al.* (2018) apresenta um algoritmo para reconstrução em 3D de objetos, de maneira precisa e direta, de estruturas curvilíneas vistas em um microscópio eletrônico de transmissão. Usando este algoritmo, que faz uso de uma abordagem de triangulação, a configuração real de uma estrutura curvilínea pode ser reconstruída com base nas estereoisagens adquiridas de diferentes perspectivas devido a variação da posição angular da amostra (*tilt*).

Diante disso, a estereoscopia foi explorada neste trabalho para que possa ser utilizada como uma ferramenta para gerar o eixo z das imagens de MEV e com isso prover uma segunda opção como *input* para o software *TopoSlicer*[®], desenvolvido nesta tese para gerar biotemplates digitais a partir de imagens AFM. Como software MEX 6.0 Alicona[®] é capaz de gerar imagens 3D de MEV por estereoscopia, ele foi utilizado como ferramenta para tentar viabilizar a utilização de imagens de MEV como *input* para o *TopoSlicer*[®], inicialmente produzido para utilizar imagens de AFM como input, pelo fato dos níveis de cinza nesta técnica variarem linearmente com o eixo z.

4.8 COMPÓSITOS PARA LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS POR VIA TRANSDÉRMICA: PARTE ESTRUTURAL

Sistemas para carreamento de fármacos por via transdérmica, conhecidos como “*patches*”, são formas de administração de medicamentos numa quantidade terapeuticamente ativa através da pele. Dentre os diversos tipos de carreamento de fármacos por via transdérmica, a utilização de adesivos é um exemplo de dispersão do fármaco em uma camada aderente que fica em contato direto com a pele. Tal método de administração de fármaco, além de ser mais confortável e indolor para o paciente, reduz a frequência de aplicação de horária para diária ou semanal, não é invasivo, como ocorre metabolização por ingestão, a sua biodisponibilidade aumenta e evita efeitos colaterais como problemas gástricos (AHAD, 2010).

O desenvolvimento de adesivos para a liberação de fármacos por via transdérmica envolve conhecimentos em farmácia, ciência de materiais, engenharia e biologia, pois trata-se de um sistema que combina o fármaco e um dispositivo (matriz) para liberá-lo em um determinado local biológico. Nesse caso a maneira como a matriz disposta é determinada aqui como fator estrutural, e o carreador que compõe essa matriz, fator funcional.

Dentre as matrizes utilizadas para a produção desses adesivos estão os materiais poliméricos, onde cada um desempenha um papel específico para que o produto final seja capaz de alcançar seu objetivo: aderir à pele, reter e liberar uma quantidade terapêutica do fármaco no local de atuação específico. Cada polímero utilizado na construção da matriz tem uma função que depende da aplicação, como por exemplo o poliuretano é utilizado para dar elasticidade, polisiloxanos pela impermeabilização, polimetilacrilato pela transparência e para dar resistência física e polivinilalcool pela hidrofiliabilidade e força (LISA, 1997). Uma propriedade que não deve ser negligenciada na escolha dos materiais que compõem os adesivos é a biocompatibilidade.

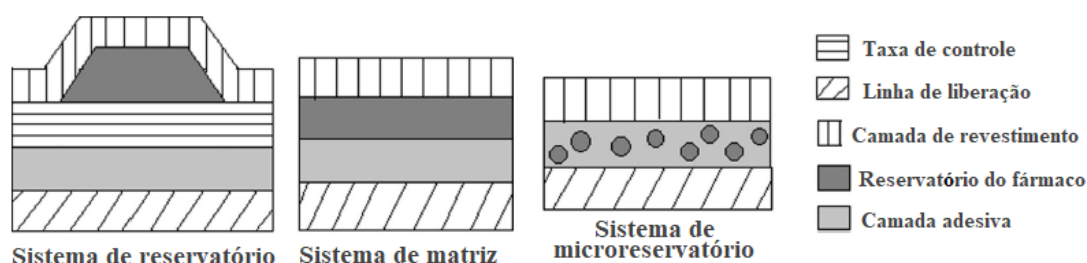
Fatores como a permeabilidade do fármaco na pele também devem ser considerados, pois problemas como cristalização do mesmo durante a sua liberação ou no interior do adesivo podem afetar sua difusão, diminuir sua taxa de permeabilidade e consequentemente sua biodisponibilidade no local de atuação reduzindo sua eficácia (VARIANKAL, 1999).

Os sistemas utilizados para carreamento de fármacos são fabricados por múltiplas camadas poliméricas que contém um reservatório de fármaco ou por uma matriz que forma um sanduiche o fármaco e o polímero, ambos revestidos por uma camada externa que previne a

perda do fármaco para o meio e a penetração de água ou a exposição do fármaco a intempéries que poderiam afetar sua funcionalidade. Desse modo, de acordo com a Figura 30 os adesivos transdérmicos são divididos em três: sistemas de reservatório, sistema de matrizes (matriz do fármaco dispersa em sistema polimérico) e sistema de micro reservatórios (BANERJEE *et al.*, 2014).

O sistema de reservatório é formado por três componentes majoritários, o reservatório, uma membrana que controla a taxa de liberação do fármaco e o adesivo. O fármaco contido no reservatório pode estar em solução, suspensão, gel ou disperso em uma matriz polimérica sólida.

Figura 30 - Tipos de sistemas de adesivos transdérmicos



Fonte: Adaptado de BENERJEE (2014).

No sistema de matrizes, uma matriz semissólida contendo uma solução ou suspensão do fármaco estão dispersas no adesivo. A camada de adesivo desempenha um papel de dispersante do fármaco. Sistemas de micro reservatórios são combinações do sistema de reservatório e do sistema de matriz onde o fármaco é encapsulado em microrreservatórios que são posteriormente dispersos na porção de polímero majoritária que constitui o adesivo (NAOHIRO, 2010).

O sistema de microrreservatórios visa a segurança e eficácia do fármaco nele contido, por isso micro e nanorreservatórios de fármacos têm recebido atenção especial nos últimos anos. Eles aumentam a estabilidade do fármaco bem como sua eficiência, e contribuem para diminuição da sua toxicidade. Dentre os nanorreservatórios/carreadores mais eficientes destacam-se as micelas, nanopartículas poliméricas, hidrogéis, micro esponjas e sólidos porosos como os silicatos mesoporosos, as zeólitas e as MOFs.

4.9 PARTE FUNCIONAL: CARREADOR DO FÁRMACO (ADSORÇÃO/DESSORÇÃO)

4.9.1 MCM-48

O MCM-48 é um material mesoporoso a base de sílica da família dos adsorventes M41S da Mobil Oil (KUMAR *et al.*, 2001). Ele tem um sistema poroso cúbico bi contínuo, com cavidades grandes e uniformes da ordem de (2-10nm) (ALFREDSON & ANDERSON, 1996).

Estudos feitos por WANG *et al.* (2013) mostram que a aplicação de MCM-48 para carregamento de fármacos em dispersões sólidas, de fármacos como o cilostazol, é promissor devido ao seu elevado poder adsorativo.

4.9.2 SBA-15

O SBA-15 é um material mesoporoso a base de sílica que faz parte da família SBA. Ele foi sintetizado pela primeira vez por Zhao *et al.* (1998) na Universidade da Califórnia- Santa Barbara, nos Estados Unidos (FERNANDES *et al.*, 2016). Esse material tem grande potencial de aplicação em adsorção, pois apresenta área superficial elevada, a estrutura de poros altamente ordenada, com diâmetro médio de poro variando entre 2-30nm e grande estabilidade térmica e hidrotérmica (GU *et al.*, 2004). Ele possui uma estrutura unidirecional e número elevado de poros ordenados hexagonalmente e interligados por microporos.

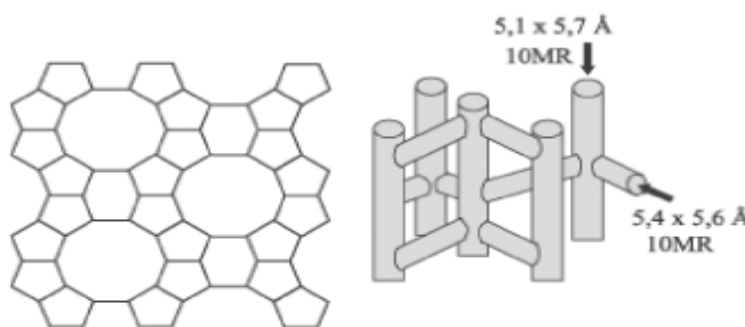
A potencial aplicação do SBA-15 como adsorvente tem chamado a atenção de pesquisadores para diversas áreas como catálise para a produção de biocombustíveis e até mesmo para adsorção de fármacos (AHUJA & PATHAK, 2009). No caso da adsorção de fármacos fatores como toxicidade e acumulação do material no corpo devem ser levados em consideração para evitar o surgimento de outros problemas. Estudos realizados por Garcia (2005) mostram que o SBA-15 se acumula em macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos, sugerindo o desenvolvimento de estudos mais detalhados antes da sua aplicação para carregamento de fármacos.

4.9.3 ZSM-5

A ZSM-5 é um alumino-silicato que tem seu nome derivado de Zeolite Socony Mobil-5 e o número 5 corresponde ao tamanho médio da abertura de seus poros em angstrom (Å). Há muitas aplicações em processos petroquímicos industriais, como craqueamento, hidrocrackeamento, reações de isomerização e reforma catalítica, devido a sua alta acidez, potencial seletividade, elevada área superficial e estabilidade térmica (SMITH, 1984; GROGG, 2013).

Estudos feitos por Gonçalves et al. (2006) mostram que a acidez da ZSM-5 depende da temperatura de calcinação deste material e que sua alta seletividade é conferida por sua estrutura. Na Figura 31 tem-se a estrutura da ZSM-5, que é composta por dois tipos de sistemas de canais formados por anéis de oxigênio, canais retos ($5,4 \times 5,6$ Å) e canais sinusoidais ($5,1 \times 5,7$ Å) que se interceptam perpendicularmente entre si com tamanho de cavidade de intersecção de $8,9$ Å.

Figura 31 - Estrutura da ZSM-5



Fonte: MIGNONI, DETONI, PERGHER (2007).

Devido às suas propriedades estruturais e químicas, não somente a ZSM-5 mas outras zeólitas possuem metodologia de síntese cada vez mais estudada e otimizada para obtenção de materiais com propriedades mais específicas para as aplicações às quais são destinadas. Durante a constante otimização das zeólitas, outra classe de materiais foi desenvolvida: as estruturas organometálicas ou MOFs, que ao invés de apresentarem apenas grupamentos inorgânicos como as zeólitas, apresentam ligantes orgânicos em sua estrutura (CHEETHAM *et al.*, 1999).

4.9.4 MOFs

De acordo com a definição da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), as MOFs (*metal organic frameworks*) são redes de coordenação com ligantes orgânicos contendo cavidades potencialmente vazias. Essas redes são extensões de compostos de coordenação, formadas a partir de entidades de coordenação, com ligações cruzadas entre duas ou mais cadeias individuais ou cadeias cíclicas, que se repetem, estendendo-se para 1, 2 ou 3 dimensões. Os compostos de coordenação que compõem as MOFs são quaisquer compostos que contêm uma entidade de coordenação. Uma entidade de coordenação é um íon, ou uma molécula neutra que é composta por um átomo central, normalmente um metal, ao qual se liga a uma matriz de átomos ou grupos, onde cada um desses grupos é chamado de ligante (BATTEN *et al.*, 2013).

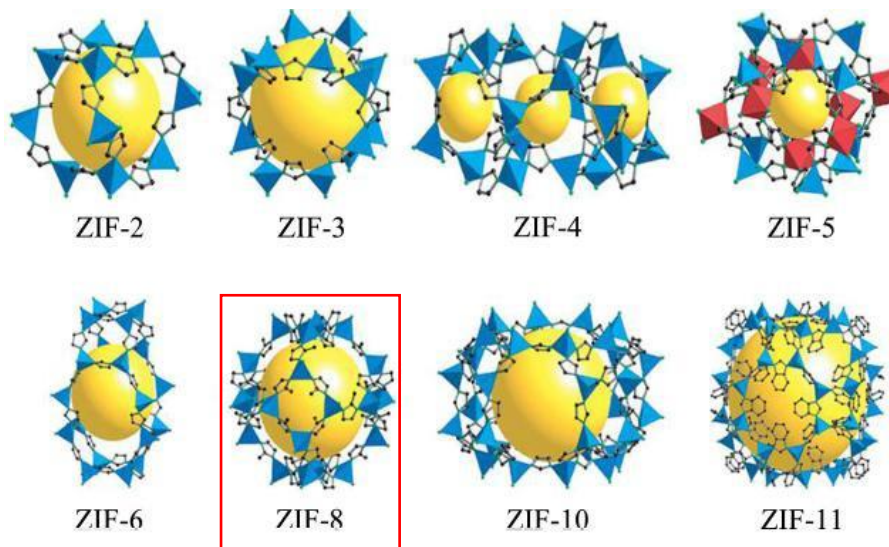
Elas têm recebido atenção especial devido à sua versatilidade (possibilidade de ser moldada para determinadas aplicações de acordo com a escolha dos ligantes) e biocompatibilidade. Dentre as principais MOFs biocompatíveis destacam-se a ZIF-7, ZIF-8 e ZIF-9.

As ZIFs (*zeolitic imidazolate frameworks*) são estruturas zeolíticas de imidazolato que combinam as propriedades das MOFs com a elevada estabilidade térmica e química das zeólitas, apresentando uma estrutura muito similar a das zeólitas. Nelas o zinco (ZIF-8) ou cobalto (ZIF-67) são ligadas aos átomos de nitrogênio do imidazol.

4.9.4.1 ZIF-8

A ZIF-8 é uma estrutura zeolítica de zinco e de imidazolato. Considerada como uma subclasse de MOFs, ela é construída por unidades tetraédricas formadas pelo cátion bivalente Zn^{2+} e quatro ânions imidazolato (Im^-). Esta estrutura, apresentada na Figura 32 é análoga à dos tetraedros SiO_2 em zeólitas, sendo um material que apresenta tanto características das MOFs convencionais (por exemplo, poros e cavidades facilmente acessíveis) como das zeólitas (por exemplo, alta estabilidade aquosa) (GOMAR & YEGANEHI, 2017).

Figura 32 - Diferentes tipos de ZIFs (Zeolitic Imidazolate Frameworks), com destaque para a ZIF-8



Fonte: PHAN et al. (2010).

A ZIF-8 é uma MOF que exibe uma área superficial elevada, de cerca de $1400 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, e poros que medem cerca de $11 \text{ \AA}$ de diâmetro, além de ser termicamente estável, podendo suportar temperaturas de até $420 \text{ }^\circ\text{C}$ (HUANG *et al.*, 2006).

A ZIF-8 é uma excelente plataforma para entrega de fármacos, não somente pela sua elevada área superficial, mas também pela estabilidade e facilidade de acesso às cavidades dos poros, mas principalmente pela sua biocompatibilidade, que como foi citado anteriormente, é fundamental para o carregamento de fármacos no sistema de micro reservatório em adesivos para liberação de fármacos por via transdérmica.

4.9.4.2 H-KUST

A H-KUST é uma MOF que foi sintetizada pela primeira vez em 1999 por Chui *et al.*, na Universidade de Ciência e Tecnologia de Hong Kong. Ela é composta por ligantes 1,3,5 bezenitricarboxilato (BTC) coordenados por íons de cobre e sua estrutura é composta por poros quadrados que medem $9 \times 9 \text{ \AA}$ (LIN *et al.*, 2012).

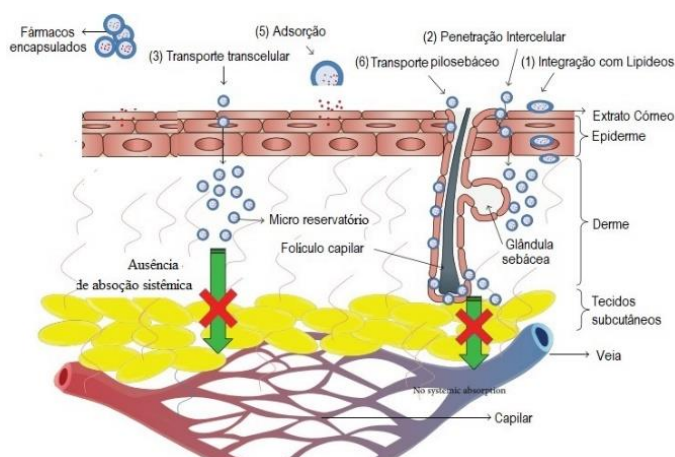
A HKUST pode ser sintetizada de modo a obter nano HKUST com base em polímeros de coordenação porosos de ácidos carboxílicos apresentando potencial aplicação para carreamento de fármacos (LIN *et al.*, 2012).

4.10 FÁRMACO MODELO PARA PROVA DE CONCEITO

A administração de fármacos através da pele é uma prática antiga, pois a pele sempre foi vista como um acesso fácil e amplo para a administração de medicamentos. Como injeções hipodérmicas são métodos invasivos, apresentam riscos de infecção e que causam desconforto aos pacientes, a via tópica, além de ser indolor, não submete o fármaco a nenhum sistema metabólico. Por oferecer graus mais elevados de biodisponibilidade, a administração de fármacos por via tópica pode ser usada como uma ferramenta para promover a liberação controlada do fármaco (ECONOMODOU *et al.*, 2018).

A principal limitação desta rota vem da própria natureza da barreira da pele, a sua camada mais externa, o extrato córneo. É o principal responsável pela barreira da impermeabilidade, sendo muito denso e possui baixo percentual de hidratação (15-20%) o que dificulta o processo difusivo. Hoje em dia, a mudança para um atendimento mais personalizado ao paciente é uma tendência nas ciências medicinais e farmacêuticas. Neste contexto, a fabricação tradicional vem sendo cada vez mais adaptada às necessidades dos pacientes. (ECONOMODOU *et al.*, 2018)

Fármacos administrados topicamente são absorvidos pela rota de absorção corneana (Figura 33) onde moléculas de fármacos com alta permeabilidade córnea (por exemplo, pequenas moléculas com um grupo hidroxila) penetram. Este percurso começa com difusão passiva de fármaco através do epitélio, estroma e endotélio até alcançar o local onde exercerá sua função farmacológica (BERTENS, 2018).

Figura 33 - Mecanismos de penetração de fármaco por via cutânea

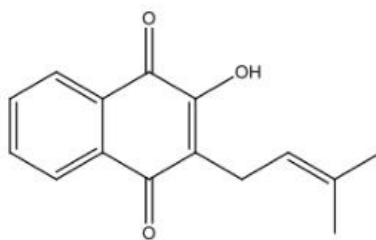
Fonte: RAZA et al. (2014).

Dentre os fármacos que são administrados por esse método, o salicilato de metila é o exemplo mais antigo. Utilizado comercialmente em adesivos transdérmicos como Salonpas[®] desde 1934 no Japão, só nos últimos 20 anos a Hisamitsu Pharmaceutical Co. Inc. vendeu mais de 20 bilhões de unidades nos cinco continentes, o triplo da atual população mundial. Antibióticos, medicamentos para o tratamento de câncer e anti-inflamatórios já podem ser ministrados por via transdérmica. Para o presente trabalho, pretende-se utilizar o Lapachol como fármaco modelo (LEE *et al.*, 2017).

4.10.1 Lapachol

O Lapachol (2-hidroxi-3(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona) é um produto natural, quimicamente identificado como uma naftoquinona, é uma molécula pequena, de 10,5 Å (Figura 34) que possui ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e anti-neoplásica.

Quando isolado a partir de diversas técnicas de extração, o Lapachol se apresenta como um pó amarelo bastante solúvel em etanol, acetona, metanol, clorofórmio, benzeno e ácido acético, podendo apresentar uma coloração amarelo- alaranjada ou vermelha, quando em solução. Ele é fracamente ácido, altamente lipofílico, com solubilidade limitada em água, mas muito solúvel em soluções alcalinas (ARAÚJO, 2002). A absorção máxima do ultravioleta ocorre em 251,5, 278 e 331 nm (FONSECA, BRAGA & SANTANA, 2003)

Figura 34 - Estrutura do Lapachol

Fonte: A autora (2020).

Ele foi isolado pela primeira vez a partir do tronco da árvore argentina “*lapacho*”, *Tebebuia avellanadae* Lor (Bignoniaceae), por E. Paterno em 1882. Em 1956, Gonçalves de Lima e Colaboradores, do Departamento de Antibióticos da UFPE, perceberam que no tronco Ipê-roxo, que é uma árvore nativa da flora brasileira, existia uma substância de coloração amarela com ação antimicrobiana, que foi mais tarde confirmado ser Lapachol.

Além da ação microbiana, o Lapachol também apresenta ação anti-inflamatória, que foi testada clinicamente de forma pioneira no Brasil, no Departamento de Antibióticos da UFPE. Em 1970, Wanick fez testes clínicos com portadoras de cervicites e cervicovaginites. Além de eficaz, com índice de cura superior a 90% em sinusites, otites, bursites e tendinites, o baixo custo, tornou-o promissor para tratar doenças inflamatórias tópicas (LOPES & SILVA, 1988).

Aqui no Brasil, ele é normalmente comercializado em cápsulas gelatinosas para administração por via oral, que é utilizada para combater neoplasias malignas no trato bucal e gástrico. Sua administração também já foi avaliada na forma de emulsões em gel, para aplicação cutânea. Segundo Lira (2008), o Lapachol apresentou uma elevada taxa de permeabilidade e atividades antiedematogênicas e antinociceptivas quando utilizado na forma de emulsões em gel.

A passagem percutânea do Lapachol foi estudada *in vitro* por Sester (1996), que se propôs a otimizar a concentração do fármaco em diferentes pHs, mostrando que ele apresenta boa difusibilidade quando administrado por via tópica em pH 8,0 em géis de carbopol contendo apenas 0,5% do princípio ativo.

Uma outra rota que visa aumentar o potencial de penetração e de retenção do Lapachol por via transdérmica, é dispersá-lo em formulações de microemulsão de ácido oleico e uma mistura de Cremophor EL, Tween 20 e água, por exemplo (TABOSA *et. al*, 2018).

Mais recentemente vem se considerando a utilização de nanocarreadores à base de Pluronic® P123 para uma liberação controlada de Lapachol, o que favorece a durabilidade do fármaco, ampliando assim as possibilidades de aplicação e administração dele (CAMPANHOLI *et. al*, 2018).

Diante dessas alternativas que contribuem para o aumento da taxa de absorção do Lapachol por via transdérmica, sugere-se sua utilização em um sistema de microrreservatório, testando diferentes tipos de carreadores, para o desenvolvimento de adesivos transdérmicos onde o Lapachol atua como princípio ativo.

5 EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1 CULTIVO E PRODUÇÃO DE BIOTEMPLATES

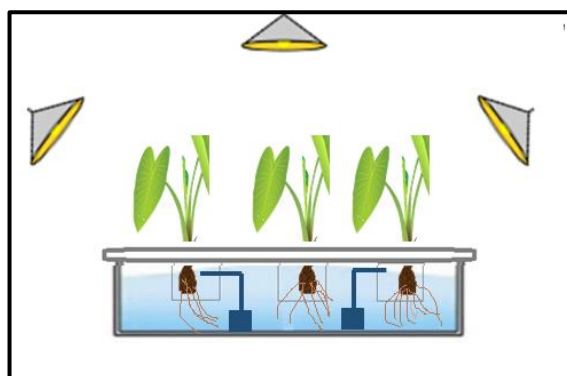
O cultivo por hidroponia da espécie *Colocasia esculenta* (L.) Schott foi desenvolvido para a obtenção de uma biofábrica de templates para produção dos filmes bioinspirados. As folhas retiradas das plantas assim cultivadas foram utilizadas como *templates* para a *soft lithography* e para os modelos virtuais por imageamento, que foram utilizados na segunda etapa do projeto, através da técnica de printrônica. Com o domínio do cultivo hidropônico das plantas, busca-se estudar o efeito da adição de agentes modificadores no seu meio de cultivo na nano/microestrutura hierárquica das suas folhas.

O cultivo hidropônico foi feito na Ponto Quântico Nanodispositivos (Positiva-UFPE), hub de inovação do laboratório do nosso Grupo (LandFoton), segundo a metodologia proposta por Nhut, Huong e Khiem (2004), onde tubérculos orgânicos de *Colocasia esculenta* (L.) Schott são colocados em cestos suspensos em uma banheira de 28 L, contendo 15 L de água conforme é apresentado na Figura 35. Neste sistema a circulação de água é forçada por 4 bombas submersíveis (HBO-300) com vazão individual de 220 L/h, que despejam água à meia altura dos cestos que contém os tubérculos, fazendo circular todo o volume da banheira a cada 1,5 minuto. A exposição à luz é controlada por 3 lâmpadas (Grow Led) de 20 W cada, com 6 LEDs SMD emitindo em 450 nm (azul) e 12 LEDs SMD em 625 nm (vermelho), correspondente às bandas do espectro de absorção da clorofila, para estimular o crescimento das plantas após abertura das folhas. A cada 7 dias a água é trocada e a cada 15 dias os nutrientes à base de nitrogênio, fósforo e potássio (FORTH) são adicionados para manutenção do desenvolvimento das plantas.

A superfície das folhas obtidas a partir da biofábrica foi caracterizada por MEV, AFM e medidas de ângulo de contato.

As plantas com 16 dias de cultivo já apresentavam folhas grandes, (em média de 10 cm) e efeito lótus característico da *Colocasia esculenta* (L.) Schott, conforme apresentado na Figura 36.

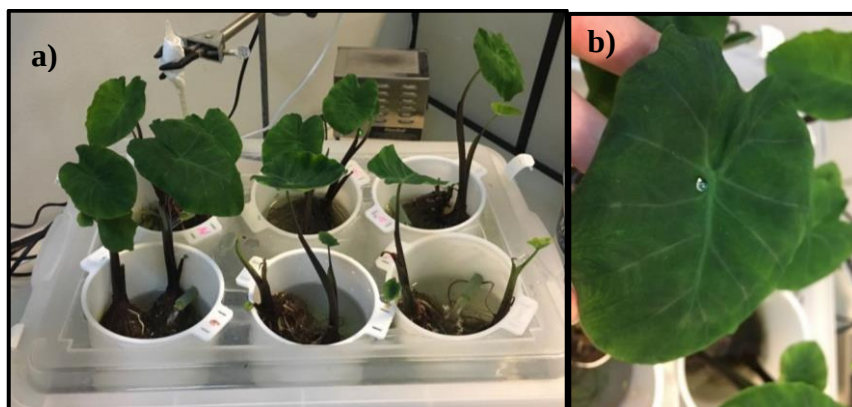
Figura 35 - Esquema de cultivo hidropônico utilizado na biofábrica de biotemplates na Ponto Quântico Nanodispositivos. (Positiva-UFPE/LandFoton)



Fonte: A autora (2020).

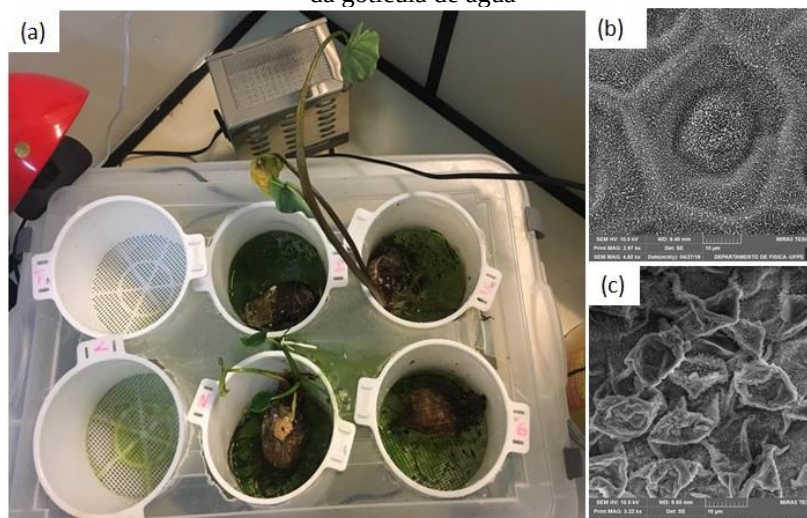
Em um dos testes de hidroponia, as plantas foram submetidas a condições de stress hídrico, e tal condição resultou em plantas raquíticas com folhas amareladas Figura 37(a). As regiões amareladas das folhas também apresentaram o comportamento super-hidrofóbico, mas sem o efeito lótus, ou seja, sem a propriedade autolimpante, em que o ângulo de contato para deslizamento da gotícula de água foi maior do que para uma folha retirada de uma planta cultivada em condições normais, sem escassez de água. A Figura 37 mostra as plantas raquíticas, em que as folhas apresentam 4 cm em média, após 42 dias de cultivo.

Figura 36 - Sistema de cultivo hidropônico. a) plantas com 16 dias de cultivo sob condições controladas; b) Efeito lótus das folhas cultivadas



Fonte: A autora (2020).

Figura 37 - *C. esculenta* cultivada por hidroponia sob condições de stress hídrico. (a) Sistema de cultivo sob condições de stress hídrico. (b) Micrografia da superfície da folha cultivada sob condições normais, que apresenta o efeito lótus (c) Micrografia da superfície da folha cultivada sob stress hídrico, que apresenta adesão da gotícula de água



Fonte: A autora (2020).

Apesar de ainda manter as nanoestruturas provenientes dos cristais de cera depositados na superfície da folha, as calotas côncavas e convexas características da *C. esculenta* desapareceram, mas as novas estruturas micrométricas mantêm a super-hidrofobicidade, conforme as medidas de ângulo de contato apresentadas na Tabela 2, apesar de precisarem de um ângulo de inclinação maior para que a água possa rolar na sua superfície. Os ângulos de contato foram medidos pelo analisador de forma de gota CAM100 (KASVI). Para as medidas de ângulo de contato estático foi depositada 1 gota de 10 μL de água destilada na superfície da folha e sucessivas medidas foram realizadas, cada amostra foi analisada 5 vezes. As medidas de ângulo de deslizamento foram realizadas no mesmo equipamento onde foi depositada 1 gota de 10 μL de água destilada na superfície da folha e o suporte que contém a amostra com a gotícula de água foi lentamente inclinado até que essa gotícula rolasse na superfície da folha, cada amostra foi analisada 5 vezes. O ângulo mínimo necessário para provocar o deslocamento da gotícula corresponde ao ângulo de deslizamento.

Tabela 2 - Ângulos de contato e de deslizamento para gota de 10 μL de água na superfície da folha da *C. esculenta*

Tipo de <i>C. esculenta</i> (L.)	Ângulo de contato (°)	Ângulo de deslizamento (°)
Schott		
Normal	157,7 $\pm$ 0,2	7,1 $\pm$ 1
Submetida a stress hídrico	125,5 $\pm$ 0,2	14,9 $\pm$ 2

Fonte: A autora (2020).

Estes resultados mostram que existe a possibilidade de modificar as propriedades de molhabilidade da *C. esculenta* através da utilização de agentes modificadores externos, com análise numa segunda etapa deste trabalho.

5.1.1 Efeito dos cristais de cera na super-hidrofobicidade da *C. esculenta* (L.) Schott

Conforme descrito na sessão 3.2.5, a super-hidrofobicidade da *C. esculenta* (L.) Schott depende das estruturas hierárquicas nano-micro presentes na superfície das suas folhas. Como as estruturas nanométricas que contribuem para esse efeito são cristais de cera epicuticular, foram feitos testes de dissolução desses cristais com clorofórmio, para entender o efeito deles na propriedade super-hidrofóbica da superfície das folhas da *C. esculenta*. Caso a destruição dos cristais de cera acarretasse uma alteração significativa na hidrofobicidade da folha, a utilização de materiais para moldes negativos que pudessem contribuir para a destruição desses nano cristais de cera, como por exemplo PLA dissolvido em clorofórmio, seria descartada.

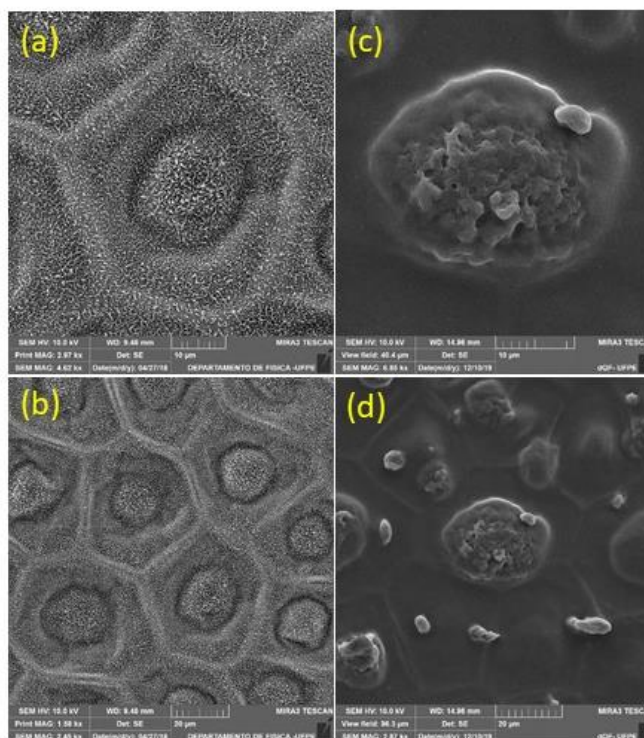
Desse modo, três amostras das folhas medindo 2x1 cm foram recortadas, sobre duas delas foram depositadas 4 gotas de clorofórmio puro, em uma amostra o clorofórmio foi retirado imediatamente, e na outra, o clorofórmio permaneceu até evaporar completamente. Na terceira amostra não foi depositado clorofórmio. As amostras expostas ao solvente foram metalizadas e analisadas por MEV.

O efeito da deposição de gotas de clorofórmio na superfície da folha pôde ser claramente observado ao se comparar o formato de gotículas de água depositadas nessas superfícies logo em seguida. A folha que não entrou em contato com o solvente orgânico manteve suas propriedades super-hidrofóbicas e autolimpantes de modo que as gotículas de água escorreram para as bordas ao tocar a superfície da folha. Já as amostras de folha que foram expostas ao clorofórmio, perderam sua propriedade autolimpante, e no caso da amostra que ficou exposta até a evaporação do solvente, a superfície tornou-se hidrofílica.

Tal comportamento sugere que o clorofórmio destrói os nanocristais de cera epicuticular, e para confirmar esta hipótese a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada. Nela, pode-se observar que os nanocristais de cera, presentes nas folhas da *C. esculenta* (Figura 38.a e 38.b) foram destruídos, e que apenas a hierarquia na escala micrométrica característica dessa planta pode ser observada (Figura 38c e 38.d). As superfícies que entraram em contato

com o clorofórmio também apresentam alguns aglomerados que provavelmente correspondem a cera que foi lixiviada pelo clorofórmio e se aglomerou aleatoriamente ao longo da superfície da folha.

Figura 38 - Microfotografias da superfície da folha da *C. esculenta* (L.) Schott. (a) e (b) superfície da folha sem modificação (c) e (d) superfície da folha exposta à Clorofórmio até evaporação do solvente



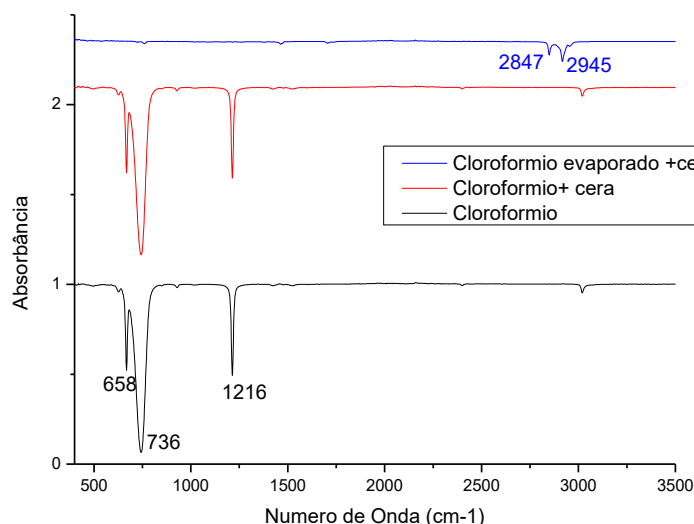
Fonte: A autora (2020).

Outra característica interessante que pode ser observada a partir desses resultados é que a propriedade hidrofóbica da cera epicuticular não é fundamental para a super-hidrofobicidade e a propriedade autolimpante da *C. esculenta*, mas sim a maneira que ela se distribui na superfície da folha: em forma de nano cristais capazes de gerar o estado de molhabilidade de Cassie-Baxter, descrito na sessão 3.2.5.

Outro teste foi feito depositando 3 mL de clorofórmio na superfície de uma folha, de modo que, após espalhá-lo pela superfície para lixiviar a cera, o clorofórmio foi removido da folha e analisado por espectroscopia de infravermelho no espectrômetro Bruker FT-IR Alpha II. Conforme apresentado no espectro de infravermelho do clorofórmio utilizado para lixiviar a cera da superfície da folha, na Figura 39, observa-se que as bandas correspondentes à cera epicuticular aparecem em 2847 e 2945 cm^{-1} . As vibrações na faixa de 2800-3000 cm^{-1} correspondem a cadeias alifáticas longas com ramificações alifáticas, correspondendo à

composição característica da cera epicuticular presente na superfície de diversas plantas conforme a literatura (HEREDIA-GERRERO *et. al*, 2014).

Figura 39 - Espectro de Infravermelho do clorofórmio e da cera epicuticular removida da superfície da folha da *C. esculenta* (L.) Schott



Fonte: A autora (2020).

Devido à baixa concentração de cera lixiviada pelo solvente, as bandas correspondentes a ela só foram observadas após a evaporação do clorofórmio para concentrar o soluto. Por esse motivo foram feitos espectros do clorofórmio puro, do clorofórmio com a cera epicuticular removida da superfície da folha e em seguida a análise dessa cera após evaporação do solvente no equipamento.

5.2 SOFT LITHOGRAPHY

Utilizou-se, para replicar a estrutura hierárquica da *Colocasia esculenta* (L.) Schott, o método de *soft lithography* em duas etapas, com a produção de um *template* negativo (molde negativo) a partir do *biotemplate*. Os polímeros comerciais PDMS (Silicone acético w-max incolor, WURTH) e o polímero fotopolimerizável poliacrilato (Chu Jie) e o PLA (3Dprime) foram testados para produção dos moldes negativos, para avaliação do mais adequado. Para a produção do molde negativo, foi depositado PDMS de maneira uniforme sobre as folhas a *Colocasia esculenta* (L.) Schott (biotemplate) e deixado à temperatura ambiente para secagem.

Após 24 h o polímero foi removido da superfície da folha e utilizado como molde negativo para deposição da resina polivinyl butyral, PVB (BUTVAR B-18).

Os moldes de poliacrilato foram preparados através da deposição de uma camada uniforme sobre a superfície da folha e posterior cura após exposição ao UV por 10 minutos. Para a deposição do PLA, foi utilizada uma caneta de impressão 3D onde o mesmo foi fundido a 190 °C e depositado sobre a superfície da folha até que resfriasse.

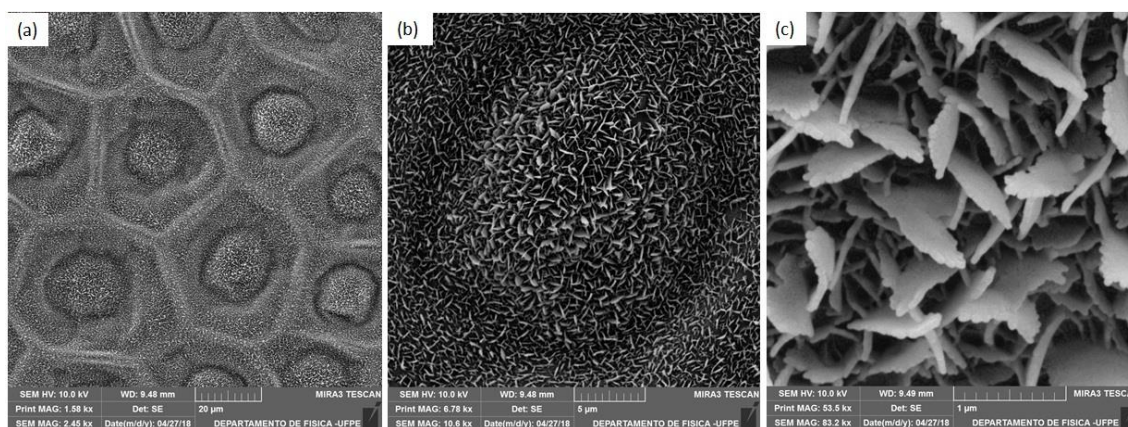
Ao analisar os resultados observados nas microscopias, os moldes de PDMS e de poliacrilato foram selecionados para reprodução das réplicas positivas. Para a deposição do PVB, preparou-se uma solução de 20% PVB em etanol, que foi homogeneizada com a utilização de ultrassom. A solução foi depositada uniformemente sobre os moldes de PDMS e de poliacrilato. Os conjuntos molde-réplica foram secos por 24h à temperatura ambiente para evaporação do solvente, e as réplicas obtidas foram destacadas dos seus respectivos moldes.

As réplicas obtidas foram caracterizadas por medidas do ângulo de contato, ângulo de deslizamento e microscopia eletrônica de varredura.

5.2.1 MEV

As micrografias obtidas por MEV apresentadas na Figura 40 mostram ampliações da superfície do lado que fica voltado para cima de uma folha da *C. esculenta* (L.) Schott, onde é possível visualizar nitidamente a estrutura hierárquica formada por calotas côncavas e convexas (micrométricas) e por cristais de cera (nanométricos). A amostra da folha foi cortada 4 horas antes da análise, fixada em um porta amostras com fita de carbono e foram colocadas em um dessecador sob vácuo por 1h. Em seguida foi metalizada com uma camada de 18-20 nm de ouro, no SC 701 *Quick Coater*, e mantida em um dessecador sob vácuo até o momento da análise de MEV. As análises de MEV foram feitas em microscópio MIRA3 LMH FE-SEM Tescan, com uma tensão de 10 kV e filamento emissor de tungstênio, sob diferentes magnificações.

Figura 40 - Micrografias da superfície do lado superior de folha da *C. esculenta* (L.) Schottt. (a) 2450x, mostrando a microestrutura presente na superfície das folhas. (b) 10500x, mostrando estrutura hierárquica nanométrica de uma calota ampliada. (c) Ampliação de 53.000x, mostrando os nanocristais de cera

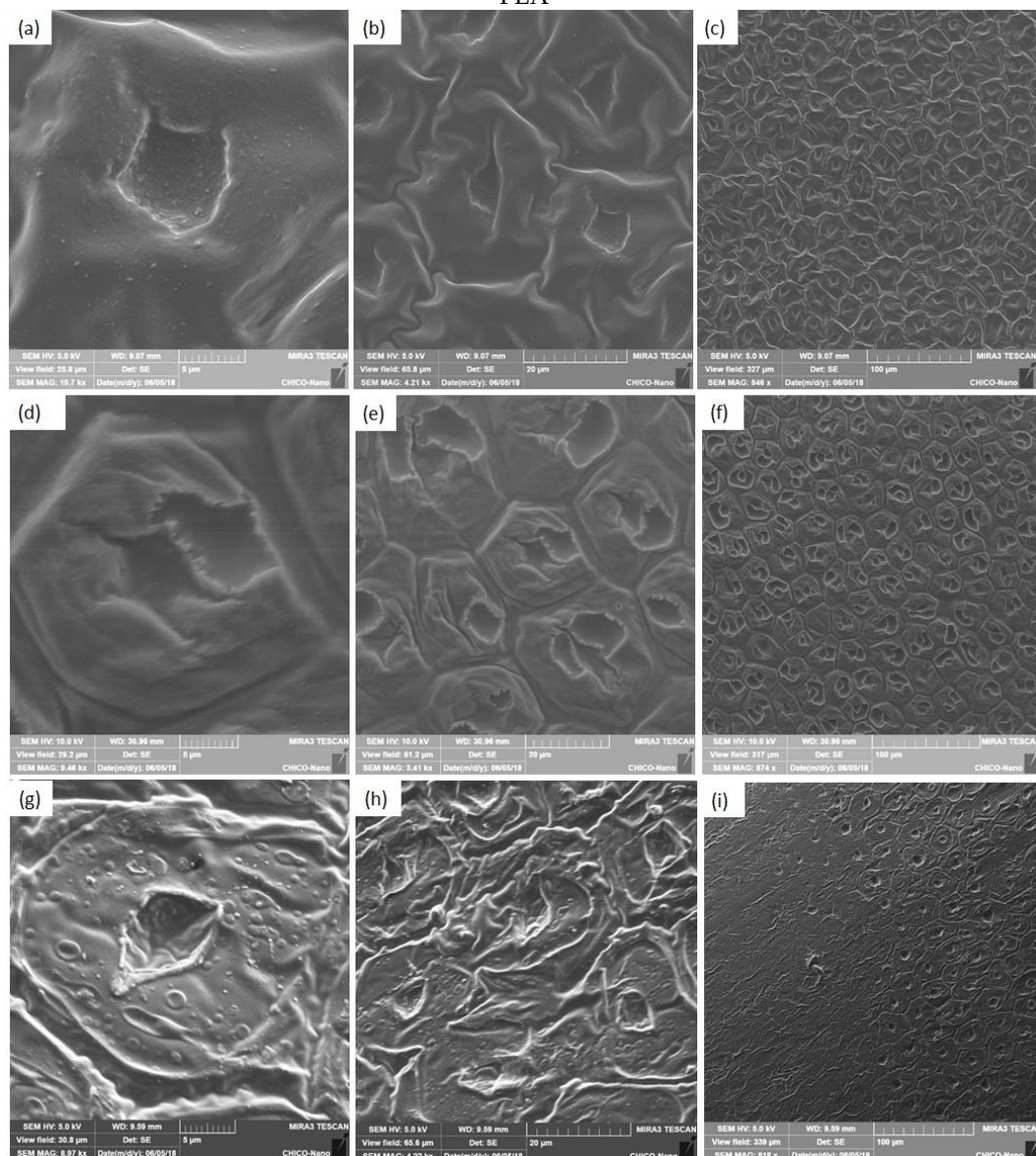


Fonte: A autora (2020).

A partir do lado superior da folha, mostrada na Figura 40, foram feitos os moldes negativos para a *soft lithography* com o PDMS, poliacrilato fotopolimerizável e o PLA, conforme mostra a Figura 41. As imagens da Figura L* são diferentes ampliações dos moldes negativos para observar a conformação do material a áreas pequenas ($625 \mu\text{m}^2$) e sua extensão por superfícies maiores (90 mm^2).

Os moldes negativos de PDMS (Figura 41 (a)-(c)) mostram cavidades com formato característico das folhas apresentadas na Figura 40. De acordo com as imagens, percebe-se que o PDMS, conforme reportado na literatura (BHUSHAN, 2009; SOUSA, 2017), moldou-se à morfologia da superfície a ser replicada e não apresentou deformação após o processo de secagem/cura, nem perda de material ao ser destacada do biotemplate.

Figura 41 - Moldes negativos obtidos a partir da *C. esculenta* (L.) Schott sob diferentes ampliações. (a)-(c) Molde negativo de PDMS. (d)-(f) Molde negativo de poliacrilato fotopolimerizável. (g)-(h) Molde negativo de PLA



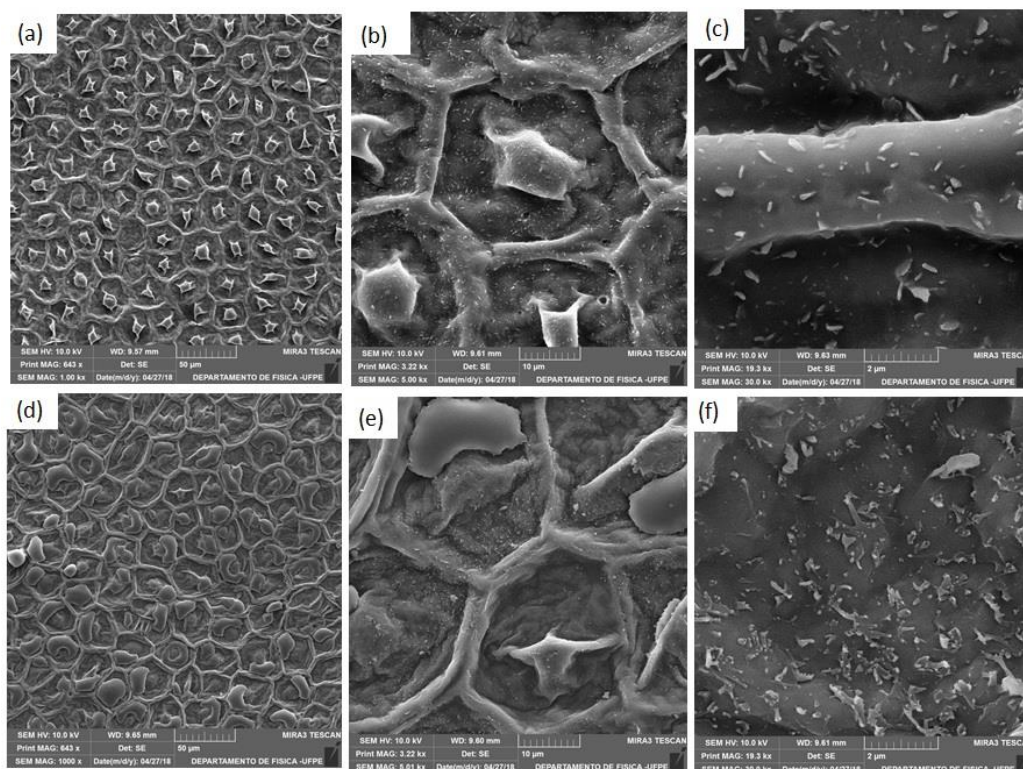
Fonte: A autora (2020).

Os moldes negativos de poliacrilato fotopolimerizável (Figura 41 (d)-(f)) também mostram cavidades com formato característico das cavidades presentes nas folhas, bem como os molde de PDMS, porém, mostrando sinais de fratura de material após ser destacado do biotemplate. Essas quebras podem ser explicadas devido ao elevado teor de metil metacrilato na mistura de poliacrilatos utilizada, o que confere um caráter rígido ao polímero após a cura sob radiação UV (DECKER, 1998).

O molde negativo de PLA (Figura 41 (g)-(i)), apresenta baixo grau de conformidade às estruturas da superfície da folha, sendo deformado por algumas estruturas e não apresentando uma deposição homogênea. Tal comportamento pode ser explicado pela baixa fluidez do PLA quando ejetado da caneta extrusora ou deformação da estrutura da folha ao entrar em contato com o PLA fundido a temperaturas superiores a 190 °C.

Por este motivo, apenas os moldes de PDMS e de poliacrilato fotopolimerizável foram selecionados para preparação das réplicas positivas da *C. esculenta* (L.) Schott. As réplicas positivas de PVB, apresentadas na Figura 42, mostram que o PDMS e o poliacrilato são moldes negativos capazes reproduzir a superfície da *C. esculenta* no PVB de modo fiel ao biotemplate, inclusive com algumas das muitas nanoestruturas (Figura 42 (c) e (f)). O poliacrilato fotopolimerizável, porém, apresentou mais uma vez o comportamento frágil (Figura 42 (d) e (e)), de modo que ficam aderidos ao PVB, podendo vir a comprometer as propriedades que se busca reproduzir através deste método.

Figura 42 - Réplicas positivas de PVB sob diferentes ampliações. (a)-(c) obtidas a partir e moldes negativos de PDMS incolor. (d)-(f) obtidas a partir e moldes negativos de Poliacrilato fotopolimerizável



Fonte: A autora (2020).

5.2.2 Medidas de Ângulo de contato

As folhas de *C. esculenta* (L.) Schott fornecidas pela biofábrica tiveram o ângulo de contato medido para a água pelo analisador de forma de gota CAM100 (KASVI), conforme descrito no item 5.1. O ângulo de contato da folha utilizada como template foi de $157,7^\circ \pm 0,2$, caracterizando-a como super-hidrofóbica. As réplicas de PVB obtidas a partir de moldes de PDMS e de poliacrilato apresentam $125,5^\circ \pm 0,2$ e $123,6^\circ \pm 0,2$ respectivamente, conforme apresenta a Tabela 3.

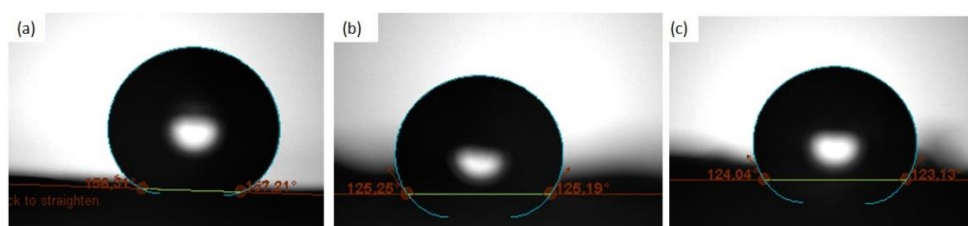
Tabela 3 - Ângulos de contato para gotas de água de 10 μL na superfície da folha e das réplicas positivas de PVB

Material	Ângulo de contato ($^\circ$)
<i>Colocasia esculenta</i> (L.) Schott	$157,7 \pm 0,2$
Réplica de PBV – Molde de PDMS	$125,5 \pm 0,2$
Réplica de PVB – Molde de Poliacrilato	$123,6 \pm 0,2$

Fonte: A autora (2020).

Conforme observado por Sousa (2017), existe uma perda de aproximadamente 30° do ângulo de contato quando a superfície da *C. esculenta* (L.) Schott é replicada, e tal diminuição do ângulo de pode ser explicada pela energia de superfície do PVB. O PVB apresenta energia de superfície maior quando comparada com a energia de superfície das folhas utilizadas como biotemplates naturais. A Figura 43 apresenta o ângulo de contato das folhas *in natura* e das réplicas obtidas por *soft lithography*.

Figura 43 - Formato de gotas de 10 μL de água em diferentes superfícies. (a) Superfície da *Colocasia esculenta* (L.) Schott *in natura* com 18 dias de cultivo. b) Superfície da réplica de PVB obtida partir do molde de PDMS. c) Superfície da réplica de PVB obtida partir do molde de Poliacrilato



Fonte: A autora (2020).

Apesar do molde negativo de Poliacrilato fotopolimerizável aderir ao material ao qual é utilizado para produção da réplica positiva, conforme mostra a Figura 43, as medidas de ângulo de contato da sua réplica positiva de PVB indicam que ele também pode ser utilizado como uma alternativa aos moldes negativos convencionais, de PDMS para *soft lithography*.

5.3 PRINTRÔNICA

5.3.1 Preparação dos *templates* digitais para printrônica

5.3.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

O MEV foi utilizado para gerar as imagens que foram posteriormente usadas como *templates* digitais para impressão. As micrografias permitem a caracterização de materiais sólidos fornecendo informações sobre a superfície em alta resolução da amostra, através de um feixe de elétrons que interage com a superfície da amostra. Apesar de fornecer uma imagem com profundidade, a terceira dimensão (z) não varia linearmente com o contraste da imagem.

Nesta parte do trabalho, foram feitas imagens de MEV das folhas da *C. esculenta* para utilização como *input* para um software desenvolvido neste projeto, para fatiamento da imagem para impressão em 3D camada por camada na impressora de materiais, além da caracterização por imagem dos moldes das réplicas positivas e negativas produzidas por *soft lithography*.

A amostra da folha foi coletada um dia antes da microscopia. A folha foi cortada, fixada em um porta amostras com fita de carbono e seca por 1 h à temperatura ambiente sob vácuo. Em seguida foi metalizada com ouro no SC 701 *Quick Coater*, com camada de metalização de aproximadamente 20 nm de espessura. As amostras das réplicas, assim como a ZIF-8, foram submetidas ao mesmo processo de preparação, porém a espessura da camada de ouro foi menor (18 nm) para evitar a formação de artefatos.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em microscópio MIRA3 LMH FE-SEM Tescan, com uma tensão de 10 kV e filamento emissor de tungstênio, sob diferentes magnificações.

5.3.1.2 Microscopia de Força Atômica AFM

A microscopia de força atômica (AFM) é um método de caracterização de superfícies que fornece informações quantitativas sobre a superfície do material, através das forças de interação entre uma ponteira (tip) que funciona como sonda e a superfície da amostra, onde a terceira dimensão (z) corresponde linearmente ao contraste (níveis de cinza) da imagem.

As amostras da folha de *C. esculenta* foram limpas com jato de N₂ e fixadas em porta-amostras. As imagens de AFM foram obtidas com o microscópio EasyScan-55 (Nanosurf), indicado para a análise de áreas de até 10x10 µm e estruturas de até 1,8 µm de altura, com resolução nominal de até 1,5 Å no plano (x-y), e 0,3 Å em altura (z), operando no modo estático. As imagens de AFM foram utilizadas como *input* para o software *TopoSlicer*[®], desenvolvido neste projeto de tese para produção dos templates digitais e registrado no INPI.

5.3.2 Desenvolvimento do software *TopoSlicer*[®]

Com o objetivo de transformar cada micrografia 2D em um conjunto de imagens imprimíveis (pelo método *layer by layer*) em 3D numa impressora de materiais DoD, um software de conversão de imagens que foi chamado de *TopoSlicer*[®] foi desenvolvido em Delphi em uma cooperação científica com o departamento de Informática¹ (SANTA-CRUZ *et al.*, 2018).

O aplicativo converte as coordenadas 2D (x,y, tonalidade de cinza) das imagens de micrografia em coordenadas 3D (x,y,z), em que cada valor de Z corresponde a uma imagem (fatia) nesta cota, determinada pela intensidade dos níveis de cinza das imagens originais. A impressão final em 3D é obtida a partir da impressão do fluido imprimível, camada por camada, a partir da imagem fatiada em n planos paralelos horizontais, denominados cotas.

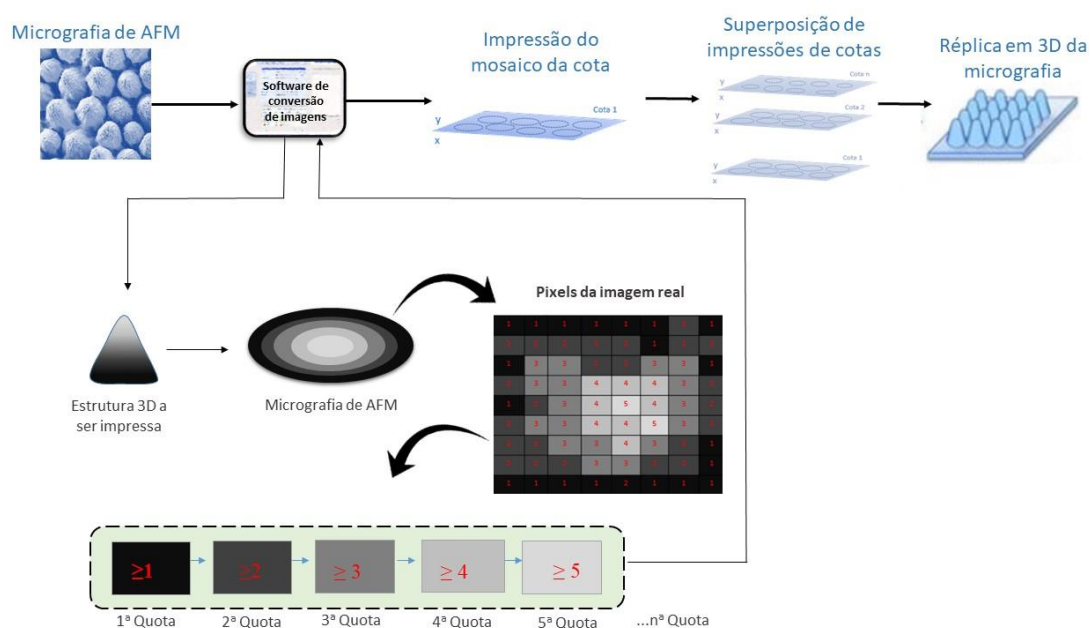
Neste software, imagens no formato bitmap com 24 bits são utilizadas como imagens de entrada, elas foram obtidas por MEV e AFM. Essas imagens obtidas por MEV e por AFM apresentam uma escala de cinza onde o nível mais claro corresponde ao topo da amostra e o preto corresponde à parte mais baixa. Conforme apresentado na Figura 44, o *TopoSlicer*[®] faz uma varredura na imagem separando os *pixels* dela em níveis elegíveis para cada cota, ou seja, os *pixels* mais escuros são caracterizados como constituintes da base da amostra, então eles

¹ Parceria com Professor Silvio B. Melo, CIn, UFPE-Recife

serão agrupados na primeira cota, que será enviada para ser impressa no início. Os *pixels* que apresentam o tom de cinza mais próximo do preto são agrupados para formar a segunda cota, que deve ser impressa após a primeira, e assim sucessivamente. Conforme a escala de cinza varia para os tons mais claros, novas cotas sucessivas são geradas até que toda a imagem de AFM ou de MEV seja “fatiada” em n quotas. Como a imagem de AFM corresponde a uma parte micrométrica da superfície que se deseja mimetizar, o software também faz um mosaico a partir da micrografia em cada cota, gerando imagens para a impressão de uma superfície da dimensão macroscópica desejada.

Os bitmaps de saída dessas cotas são de 2 bits (preto e branco), onde o preto representa os locais onde a impressora deve depositar gotas do fluido e o branco, os espaços vazios que não devem ser impressos. A imagem de cada cota é impressa m vezes, para compor o intervalo em Z que cada cota deve ter ao ser impressa. O valor de m depende da espessura da camada impressa, visto que no caso de impressão de materiais cerca de 75-93% do fluido de impressão é composto pela parte volátil, apenas 25-7% do volume da gota ejetada pelos bicos de impressão permanece no substrato para compor a superfície 3D impressa. Tal condição reduz a espessura das camadas impressas e sugere a impressão de cada cota m vezes para que o intervalo em Z delas esteja correto na impressão 3D.

Figura 44 - Proposta do software *TopoSlicer*[®], para fatiamento de imagens 2D em um conjunto de imagens separadas por cotas para impressão 3D em impressora DoD de materiais



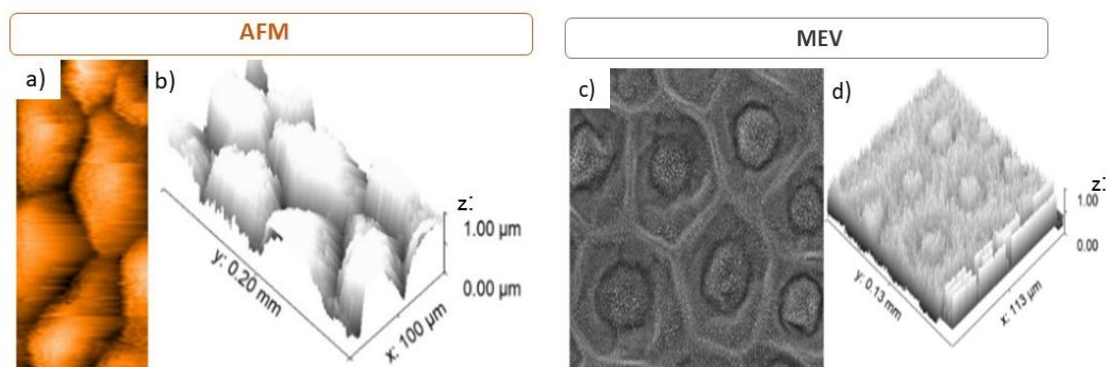
Fonte: A autora (2020).

A linearidade na variação da escala de cinza no eixo Z com a cota é fundamental para que o software possa gerar o conjunto de imagens nas cotas corretas para impressão 3D. Como esta linearidade foi observada apenas nas micrografias obtidas por AFM, como era de se esperar, já que nesta técnica, a cor é gerada exatamente pelo eixo Z, as imagens de AFM foram utilizadas como *input* para esta primeira versão do *TopoSlicer*[®].

Na versão mais atualizada do software, é possível determinar o número n de cotas com base no cálculo teórico da espessura da camada de polímero a ser impresso, e o número m de repetições de cada camada. Um dos fatores que contribuem para esta não-linearidade é a variação de densidade eletrônica de cada material, resultando em contrastes diferentes numa mesma cota.

As imagens de AFM e de MEV foram utilizadas como *input* para o *TopoSlicer*, uma projeção em 3D utilizando o software Gwydion foi feita conforme apresentado na Figura 45 para verificar a linearidade entre a escala de cinza e o eixo z. Conforme apresentado nas imagens de MEV, os níveis de cinza não estavam relacionados linearmente com o eixo z, então apenas as imagens de AFM foram utilizadas para validar o software desenvolvido para gerar as imagens das camadas para impressão 3D *layer-by-layer* (LbL) por impressora *DoD*.

Figura 45 - Utilização do software Gwydion para testar e comparar a linearidade do contraste com os valores de profundidade do eixo Z. (a) Imagem de AFM da superfície da *C. esculenta*; (b) Projeção 3D da imagem 2D de AFM; (a) Imagem de MEV da superfície da *C. esculenta*; (b) Projeção 3D da imagem 2D de MEV



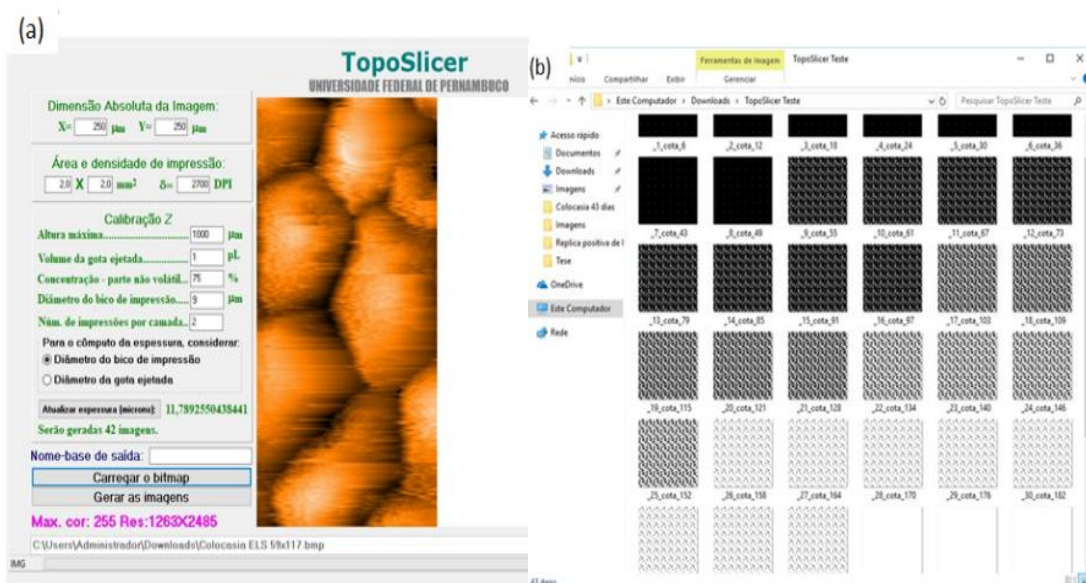
Fonte: A autora (2020).

O fato do microscópio de força atômica ser um instrumento utilizado para registrar topologia, onde a variação das forças de interação entre a superfície e a ponteira são medidos pelo deslocamento da ponteira no eixo Z, gerando esta coordenada que é convertida em valores

correspondentes à variação de contraste de cor na escala desse eixo, permite a utilização direta do *TopoSlicer*®, sendo essa, a forma mais adequada de imageamento para *input* do aplicativo. Apesar de ser possível correlacionar o contraste de níveis de cinza com a profundidade nas imagens de MEV, esses valores também são dependentes de outras variáveis, como a variação de densidade eletrônica do material analisado, o que torna a escala de cinza não-linear com a cota. Por este mesmo motivo, não se deve utilizar imagens de AFM no modo de contraste de fase.

Na Figura 46 (a) tem-se a interface do software com uma imagem de AFM utilizada como *input*, e o fatiamento desta imagem em um conjunto das imagens geradas pelo *TopoSlicer* em função das cotas é apresentada na Figura 46 (b).

Figura 46 - *TopoSlicer*® (a) Interface com imagem AFM mostrada como exemplo. (b) conjunto de imagens em função das cotas, geradas pelo software a partir do fatiamento da imagem de entrada



Fonte: A autora (2020).

Para o *TopoSlicer*® proceder com o correto fatiamento da imagem de entrada, faz-se necessário informar: a dimensão absoluta da imagem de entrada obtida na microscopia; a área que se deseja imprimir para que o software monte um mosaico a partir da imagem de entrada; a densidade de impressão em DPI, que está diretamente ligada à resolução, definida pelo número de gotas impressas por polegada, e limitada pelo diâmetro mínimo da gota ejetada, definida pelos bicos de impressão (que nos cartuchos

utilizados é de 254 μm); a altura máxima da imagem, também obtida por AFM como o maior valor em Z; o volume da gota ejetada pelos bicos de impressão; a concentração da parte não-volátil do fluido de impressão; o diâmetro dos bicos de impressão (nesse caso foram utilizados bicos de impressão de 9 μm de diâmetro); o número de vezes que cada camada será impressa e a espessura de cada camada impressa.

Com base nessas informações de entrada, o software fornece: o ângulo de inclinação do cartucho para obter a resolução de impressão, a espessura de cada camada, o número de camadas que serão produzidas e um conjunto de templates digitais produzidos para a imagem de AFM selecionada.

Esse conjunto de templates digitais são arquivos que a impressora Dimatix DMP-2831, utilizada neste trabalho, reconhece e imprime. Assim, através da sobreposição de camadas impressas (*LbL*), a microestrutura 3D bioinspirada pode ser reproduzida em outros materiais.

5.3.3 Impressão da réplica a partir das cotas geradas pelo TopoSlicer®

A réplica da *C. esculenta* impressa foi produzida pela impressora de materiais *Dimatix Materials Printer* DMP-2831. O método de impressão utilizado foi o *Layer-by-Layer* (camada por camada) através da tecnologia *Drop-on-Demand* (DoD). Na DoD utilizada neste trabalho o fluido de impressão é ejetado através de vibrações de cristais piezoelétricos, garantindo uma melhor precisão no volume de gotas ejetado e gerando gotas mais estáveis. Todo o processo de formação da gota foi avaliado para que o fluido preparado para impressão estivesse dentro dos limites de imprimibilidade, ou seja, nem tão viscoso que não possa ser ejetado, e nem tão fluido que forme gotículas satélites que prejudicam a precisão e qualidade de impressão.

Para isso, o fluido de impressão foi preparado de maneira a otimizar seu comportamento micro fluídico, ajustando viscosidade, tensão superficial e densidade a partir da proporção etanol:etilenoglicol de modo que os números de Reynolds (Re), Weber (We), Ohnesorge (Oh) convergissem para que o seu fator de imprimibilidade (Z), estivesse entre 1 e 10. Como demonstrado na Equação 8, Z é o inverso do número de Ohnesorge, e o número de Ohnesorge é a relação entre a raiz do número de Weber e de Reynolds Equação 9, os números de Weber e de Reynolds foram calculados de acordo com as equações 12 e 13, reescritas abaixo:

$$We = \frac{v^2 \rho a}{\gamma} \quad \text{Equação 12}$$

$$Re = \frac{v \rho a}{\eta} \quad \text{Equação 13}$$

v = velocidade de ejeção das gotas

ρ = densidade do fluido

a = diâmetro do bico de impressão

γ = tensão superficial do fluido

η = viscosidade do fluido.

Os valores de viscosidade do fluido, de tensão superficial foram estimados de modo a prever qual a proporção etanol:etilenoglicol que resultaria em um fluido imprimível. O fluido utilizado para a impressão do PVB foi composto por 0,7% de Polivinilbutiral (BUTVAR[®]) dissolvidos em etanol (QUIMICA MODERNA, 99,3%)/ etilenoglicol (QUIMICA MODERNA, 99,5%) 95:5. Os valores da densidade, da tensão superficial e da viscosidade do fluido, foram calculados a partir dos valores do etilenoglicol e do etanol, e são apresentados na Tabela 4. Os valores em preto estão nas unidades do Sistema internacional (SI) e os valores em azul, nas unidades do diagrama de imprimibilidade.

Tabela 4 - Características físicas dos solventes usados e do fluido de impressão

Solvente	Viscosidade a		Tensão superficial a		Densidade a	
	20°C		20°C		20°C	
	(Pa.s)	(cP)	(N.m ⁻¹)	(dyn.cm ⁻¹)	(kg.m ⁻³)	(g.cm ⁻³)
Etanol	1,095x10 ⁻³	1,095	0,0223	22,3	0,789x10 ³	0,789
Etileno glicol	16,2x10 ⁻³	16,2	0,0477	47,7	1,11x10 ³	1,11
Fluido de Impressão	1,8510 ⁻³	1,85	0,02357	23,57	0,80510 ⁻³	0,805

Fonte: A autora (2020).

Como a resolução da imagem impressa precisa ser elevada para que seja possível reproduzir as microestruturas presentes na superfície da folha da *C. esculenta*, foram utilizados cartuchos compostos por 16 bicos de impressão que liberam um volume de gota de 1 pL (DMC-11601), cujo o diâmetro de cada bico de impressão é de 9 µm. Cada bico de impressão foi submetido a uma tensão de 20 V. A velocidade mínima calculada para a ejeção das gotas foi de 3,6 m.s⁻¹, considerando esses dados, a Tabela 5 apresenta o número de Reynolds e de Weber e

de Ohnesorge que foram calculados para determinar o valor de Z e traçar o diagrama de imprimibilidade, conforme o diagrama da Figura 47. Os cálculos estão detalhados no apêndice C.

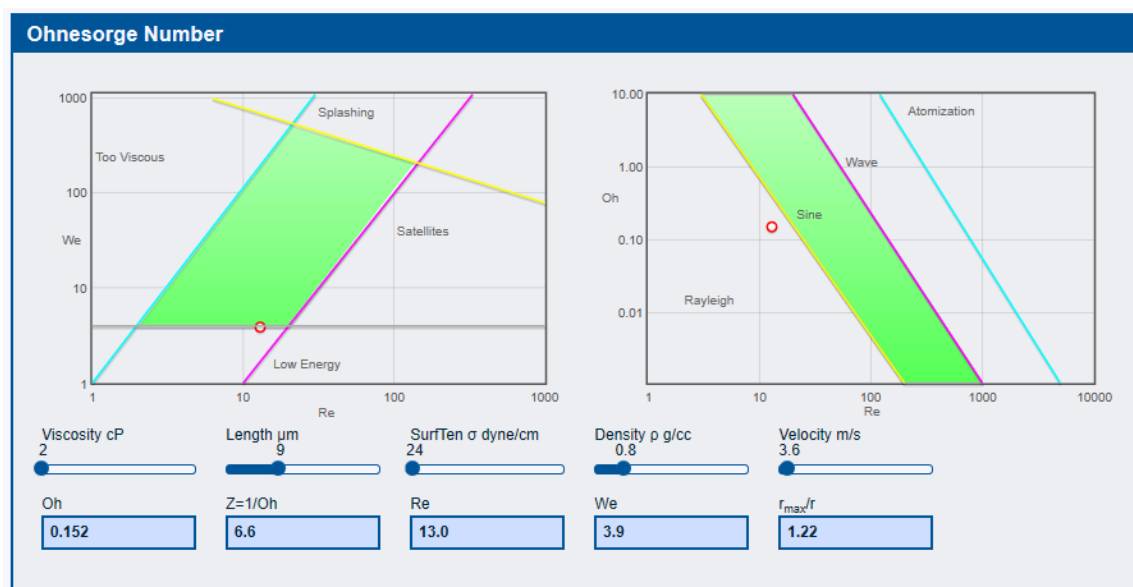
Tabela 5 - Número de Reynolds, Weber, Ohnesorge e fator de imprimibilidade (Z) do fluido imprimível

Coeficientes	Re	We	Oh	Z
Fluido de impressão	14,12	3,99	0,1416	7,06

Fonte: A autora (2020).

Conforme observado, o valor de Z é 7,06, classificando-o como um fluido imprimível ($1 < Z < 10$). O diagrama de imprimibilidade abaixo foi traçado com ajuda de um website (ABBOTT, 2019) que apresenta a aplicação do número de Ohnesorge para impressões DoD.

Figura 47 - Diagrama de imprimibilidade do fluido utilizado para impressão das réplicas



Fonte: A autora (2020).

Apesar do fluido estar no limite de imprimibilidade entre a formação de gotas satélites e baixa energia para ejeção, conforme apresenta o diagrama, o processo de formação das gotas também foi acompanhado com câmeras estroboscópicas *in situ* que permitem acompanhar a ejeção das gotas e verificar o formato delas. Como todos os bicos de ejeção liberaram gotas estáveis, o fluido preparado foi utilizado para a impressão das superfícies.

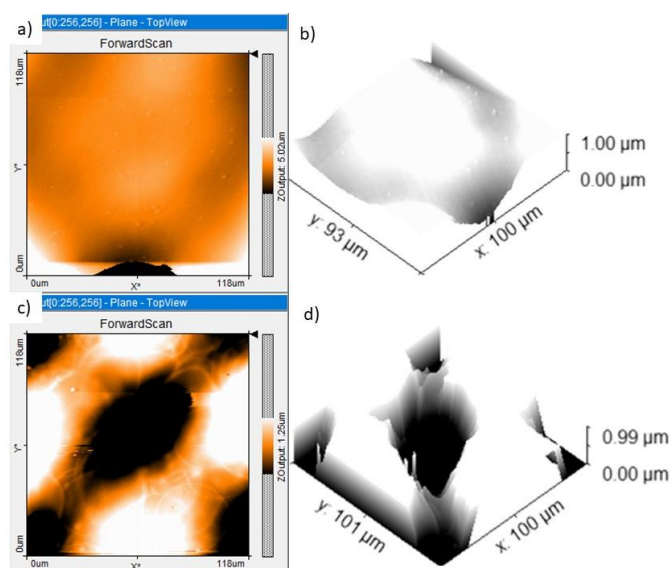
O substrato utilizado para essas impressões foi uma lâmina de vidro de 26 x 76mm (Precision glass line), e a área impressa foi de 1x1 cm. Como o software gerou 45 cotas cada cota foi impressa 4 vezes e o tempo de secagem do solvente entre as impressões aumentou de acordo com o aumento do número de camadas (por exemplo: 1 a 7 camadas 180 s; > 8 camadas, 270 s; >16 camadas, 360 s; > 24 camadas, 410 s; > 32 camadas, 500 s; > 40 camadas, 590 s; > 48 camadas, 600 s). O número de camadas impressas no total foi de 144. Da mesma maneira que a réplica da *C. esculenta* foi impressa, uma superfície lisa também foi, mas ao invés de utilizar imagens de AFM como *input* e usar o *TopoSlicer*® para geração de cotas, a imagem de um quadrado perfeito 1x1 cm foi impressa 144 vezes, de modo a obter uma superfície lisa através da superposição dos quadrados de mesma altura *z* da superfície bioinspirada e observar se os bicos de impressão geravam uma rugosidade intrínseca.

As superfícies impressas (lisa e bioinspiradas) foram analisadas por medidas de ângulo de contato e por AFM. Ao comparar as imagens de AFM (Figura 48) das superfícies impressas, lisa e bioinspirada, é possível perceber que a rugosidade intrínseca da impressora é muito pequena comparada à rugosidade gerada pela superposição dos templates digitais fornecidos pelo *TopoSlicer*®, a projeção 3D das imagens de AFM facilita esta visualização. A Figura 48b apresenta uma leve depressão nas laterais devido à rugosidade gerada pela interface das linhas de impressão (chamada aqui de rugosidade intrínseca), já na Figura 48d é possível perceber a rugosidade gerada pela superposição dos templates gerados pelo *TopoSlicer*® replicando as estruturas semelhantes as observadas na imagem de AFM da Figura 48a.

Apesar da baixa rugosidade criada pela impressão dos templates digitais, um aumento no ângulo de contato do PVB foi observado, passando de $76,5^\circ \pm 0,2$ na superfície lisa para $88,5^\circ \pm 0,2$ na superfície bioinspirada.

Conforme esperado, o aumento no ângulo de contato da superfície bioinspirada impressa foi bem menor do que o ângulo de contato da superfície obtida via *Soft lithography*. Isso é explicado pela limitação de *hardware* encontrada no decorrer do trabalho. No momento em que estes experimentos foram realizados não havia impressora de maior resolução disponível para reproduzir as estruturas hierárquicas da *C. esculenta*.

Figura 48 - Imagens de AFM das superfícies impressas de PVB. a) AFM da superfície lisa impressa; b) Projeção 3D do AFM da impressa superfície lisa; c) AFM de superfície bioinspirada; d) Projeção 3D do AFM da impressa superfície bioinspirada



Fonte: A autora (2020).

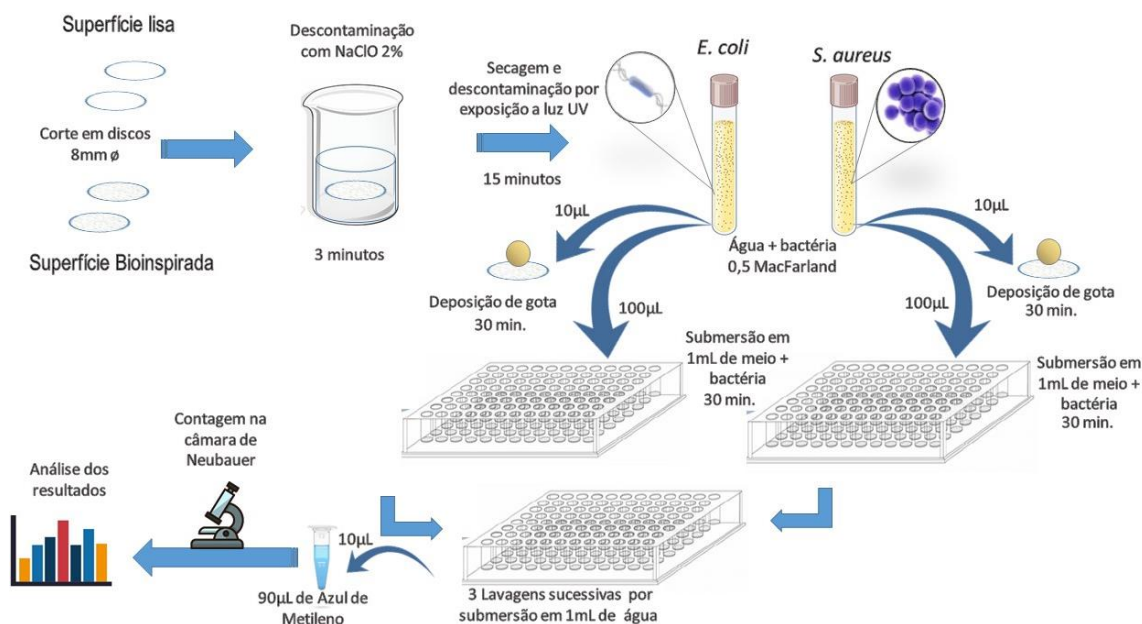
Apesar de poder obter imagens de alta resolução geradas pelo *software* que são utilizadas como templates digitais pela impressora de materiais, este trabalho foi desenvolvido no limite do estado-da-arte. Este método pode ser utilizado em impressoras de materiais de maior resolução, como por exemplo a *superfine inkjet* (SIJ Technology, Tóquio, Japão) que é capaz de ejetar gotas de 0,1 fentolitro (10^{-16} L), aumentando assim a resolução impressão e possibilitando a reprodução de micro/nano estruturas. Impressoras de resinas fotopolimerizáveis tipo DLP (Digital Light Processing) foram recentemente adquiridas pelo Grupo (Anycubic Photon-S e WanhaoD7-Plus), e apesar da precisão em x-y da D7-Plus ser nanométrica (~ 10 nm) a espessura mínima de cada camada impressa é de 30 μm , muito grande para reproduzir por esta técnica as estruturas desejadas, sendo a impressora SIJ ainda a mais promissora para este objetivo.

5.4 BACTERICIDA ESTRUTURAL A PARTIR DE SUPERFÍCIE BIOINSPIRADA

Com o objetivo de avaliar o potencial efeito antibacteriano das estruturas bioinspiradas foi feita uma adaptação da metodologia proposta por van den Berg (2017) e foram feitos testes de adesão com bactérias gram-positiva e gram-negativa, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia Coli* respectivamente. Nestes experimentos foram utilizados filmes de PVB de superfície lisa e de superfície bioinspirada, produzidos via *soft lithography* onde o PDMS (Silicone acético basic branco, WURTH) foi utilizado como molde negativo para produção das réplicas. Os filmes utilizados nos testes foram cortados em discos com 8 mm de diâmetro. Os discos foram esterilizados por submersão em solução 2% de hipoclorito de sódio durante 3 minutos, em seguida foram expostos à radiação UV por 15 minutos. Após esterilização, a superfície dos discos foi colocada em contato com as suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus* com turbidez de 0,5 na escala de McFarland. Estas suspensões foram preparadas com cepas das bactérias, repicadas no dia anterior aos experimentos, em meio de cultura Mueller-Hinton sólido e em seguida incubadas à 30 °C por 24 h. Além do tipo de bactéria, a forma de exposição à suspensão bacteriana também foi avaliada das seguintes maneiras: (a) Depositando gotas de 10 µL de suspensão bacteriana na superfície dos discos e (b) Submergindo os discos em poços de microplacas ELISA contendo 1,1 mL de meio de cultura Mueller-Hinton dos quais 0,1 mL do volume total corresponde à suspensão bacteriana. Após 30 minutos de contato bactéria/superfície, os discos foram lavados 3 vezes por submersão em água destilada estéril e de cada uma das três das “águas de lavagem” foi retirada uma alíquota de 10 µL. Esta alíquota foi adicionada a 90 µL de azul de metileno para contagem das bactérias desprendidas das superfícies utilizando a câmara de Neubauer no microscópio ótico. A Figura 49 apresenta um esquema do procedimento realizado para avaliação da adesão da *E. coli* e do *S. aureus* às superfícies lisas e bioinspiradas.

Os testes foram feitos em triplicata e a quantidade de bactéria encontrada nas “águas de lavagem” foi utilizada para comparar a adesão das bactérias nas superfícies, sendo que quanto maior o número de bactérias presente nelas, menor o potencial de adesão bacteriana às superfícies.

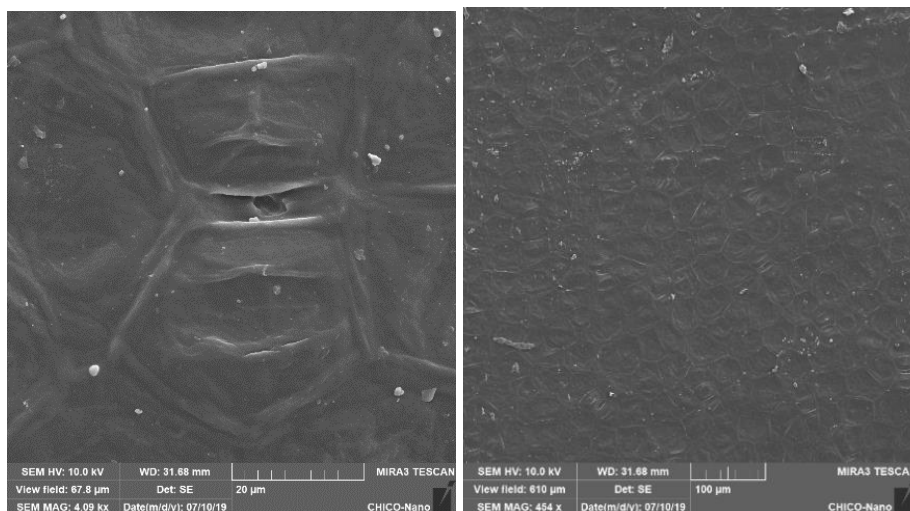
Figura 49 - Esquema de testes de adesão bacteriológica nas superfícies lisa e bioinspirada



Fonte: A autora (2020).

As superfícies bioinspiradas utilizadas nestes testes provocaram um aumento de 17° no ângulo de contato do PVB. Os ângulos de contato da *C. esculenta*, da superfície bioinspirada e do PVB liso foram $157,70^\circ \pm 0,02$, $116,32^\circ \pm 0,02$, e $98,83 \pm 0,02$ respectivamente. As imagens de MEV, Figura 50, mostram que a rugosidade na escala micrométrica foi reproduzida na réplica de PVB, mas que as estruturas na escala nanométrica não estavam presentes na réplica, justificando assim a diminuição de 41° no ângulo de contato, passando de um estado de molhabilidade de Cassie-Baxter para Wenzel. A não-reprodução via *soft lithography* das estruturas nanométricas pode ser explicada pelo tipo de PDMS (silicone) utilizado como molde negativo para produzir as réplicas de PVB. O silicone branco contém aditivos que modificam sua viscosidade e sua resistência à tração, diminuindo seu potencial de deformação para se ajustar às nanoestruturas presentes na superfície das folhas da *C. esculenta*, quando comparado com o silicone incolor.

Figura 50 - Réplicas positivas de PVB obtidas a partir de molde negativo de PDMS branco sob diferentes ampliações



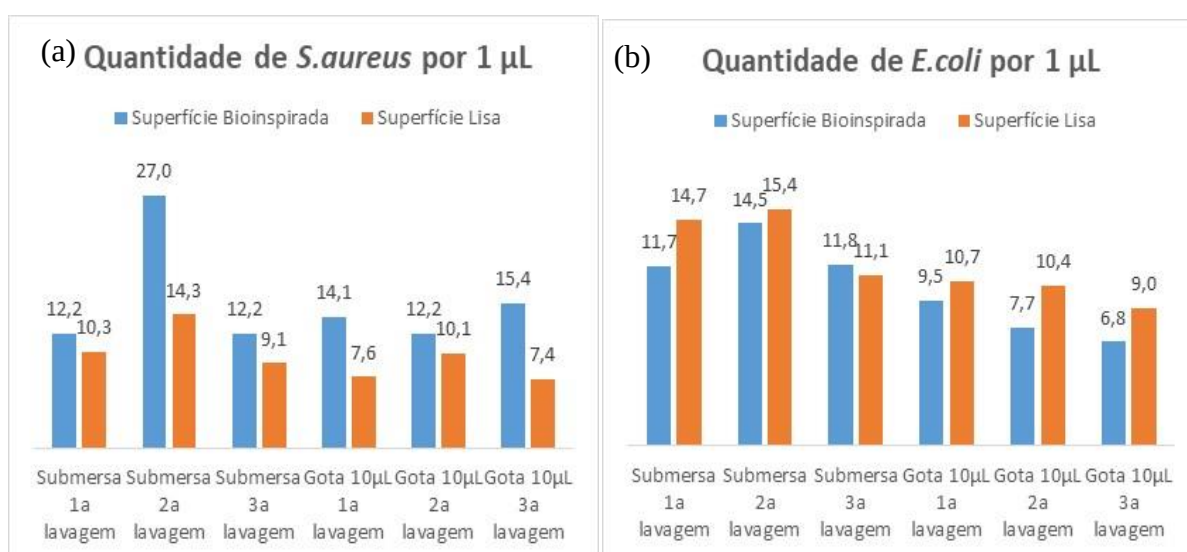
Fonte: A autora (2020).

Apesar da pequena diferença de ângulo de contato entre as superfícies bioinspiradas e lisa, o efeito da rugosidade pode ser observado nos histogramas da Figura 51, neles é apresentado o número de bactérias presentes nas águas de lavagem (1ª, 2ª e 3ª) das superfícies que foram colocadas em contato com as suspensões bacterianas de *E. coli* e *S. aureus*. Quanto maior número de bactérias encontradas nas águas de lavagem, menor o potencial de adesão delas às superfícies e maior a facilidade de removê-las. Conforme observado na Figura 51a superfície bioinspirada reduz a adesão de *S. aureus*, visto que o número de bactérias presentes na água de lavagem é maior para a superfície bioinspirada do que para a superfície lisa. No caso da *E. coli* um comportamento diferente é observado, a quantidade de bactérias presente nas águas de lavagens da superfície lisa é maior do que a encontrada nas águas de lavagens das superfícies bioinspiradas. Tal comportamento pode ser explicado pelo mecanismo de adesão e pelo formato das bactérias.

O *S. aureus* apresenta um formato arredondado de aproximadamente 1 µm de diâmetro (MONTEIRO *et. al*, 2015), aproximadamente, este formato reduz a área de contato entre a bactéria e o substrato (superfície de PVB) dificultando sua adesão, outro fator a ser considerado é que o mecanismo de adesão do *S. aureus* é feito pela produção de polissacarídeos (O'RIORDAN & LEE, 2004) que atuam como “adesivos” no momento em que a bactéria entra em contato com a superfície.

Apesar do líquido que contém a suspensão bacteriana não se encontrar no estado de molhabilidade de Cassie-Baxter, onde a interface superfície-líquido seria a menor possível, a rugosidade presente na superfície bioinspirada é suficiente para reduzir este contato e atuar como outro fator que dificulta a adesão do *S. aureus* à superfície bioinspirada quando comparada à superfície lisa.

Figura 51 - Histogramas da quantidade de bactéria contada nas águas utilizadas para lavar as superfícies após 30min de contato com suspensão bacteriana. (a) Quantidade de *S. aureus* por 1 μ L (b) Quantidade de *E.coli* por 1 μ L



Fonte: A autora (2020).

Já no caso da *E. coli*, contrariamente à *S. aureus*, seu formato de bastonete de dimensões 3,3 x 1,3 μ m (OSIRO *et al.*, 2012) associada à sua forma de adesão que conta com o auxílio dos seus flagelos e ocorre de maneira imediata, atuam como facilitadores para adesão bacteriana. Além de contar com uma área de contato maior para adesão, os flagelos fazem com que a *E. coli* consiga se aderir ao substrato imediatamente partir do momento que a célula é colocada em contato com a superfície.

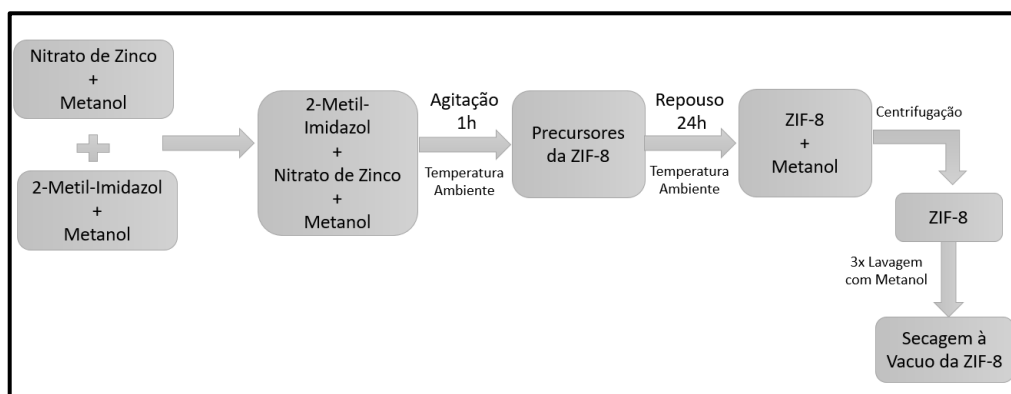
5.5 CARREADORES DO FÁRMACO

5.5.1 ZIF-8

5.5.1.1 Síntese da ZIF-8

Os nanocristais de ZIF-8 sem ligante modulador foram sintetizados segundo a metodologia descrita por *Cravillon et al.* (2011), em que 2,469 mmol de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Dinâmica, 96%) e 9,874 mmol de 2-Metil-Imidazol (Aldrich, 99%) foram utilizados, cada um dissolvido separadamente em 50mL de Metanol (Dinâmica, 99,8%). Em seguida, as duas soluções foram transferidas para um Erlenmeyer, e a solução resultante ficou sob agitação com agitador magnético à temperatura ambiente por uma hora. A agitação foi interrompida e a solução ficou em repouso por 24 h à temperatura ambiente. A dispersão coloidal foi centrifugada a 6000 rpm por 15 min. O precipitado foi lavado com metanol, ressuspendido e centrifugado 3 vezes para remoção do material que não reagiu. Finalmente, o material foi seco em dessecador à temperatura ambiente. O esquema da síntese é representado pela Figura 52.

Figura 52 - Esquema da síntese da ZIF-8



Fonte: A autora (2020).

5.5.1.2 Caracterização da ZIF-8

- Difração de raios-X

Difração de Raios-X (DRX) foi utilizada aqui para verificar se a estrutura da ZIF-8 sintetizada está de acordo com a literatura e para avaliar se a ZIF-8 teve sua estrutura alterada após a adsorção do fármaco. A amostra foi analisada por difração de raios X pelo método do pó, em equipamento Rigaku, modelo SMART LAB, com fonte contínua de radiação K_{α} do Cobre, tensão 30 kV e corrente 20 mA. A faixa de varredura foi de 5-100° e passo de 0,02°.

- Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura das ZIF-8 sintetizadas foi feita para verificar a dimensão e o formato dos nanocristais sintetizados.

A amostra foi fixada em um porta-amostra com fita de carbono, seca por 24 h à temperatura ambiente sob vácuo, em seguida foi metalizada com ouro no SC 701 Quick Coater, com camada de metalização de aproximadamente 20 nm de espessura. As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em microscópio MIRA3 LMH FE-SEM Tescan com uma tensão de 10 kV e filamento emissor de tungstênio, sob diferentes magnificações.

- Testes de Adsorção

Os testes de adsorção do fármaco no adsorvente são feitos para avaliar a capacidade de “armazenamento” do fármaco nos seus poros, bem como a dessorção, ou seja, facilidade que o fármaco tem de ser gradualmente “liberado” do interior desses poros através de difusão para o meio.

Os testes de adsorção de Lapachol foram feitos com a ZIF-8 para avaliar seu potencial adsorativo e o comportamento do fármaco antes e depois da adsorção. A proporção adsorvente/fármaco foi de 1:3, a mistura foi dissolvida em etanol, de modo que a concentração final de fármaco foi de 10 mg.mL⁻¹. A mistura foi deixada sob agitação por 48 h onde alíquotas foram retiradas com 2 h, 4 h, 19 h, 24 h e 48 h para acompanhamento da cinética de adsorção.

As amostras foram analisadas por espectroscopia no UV-vis, e a concentração de fármaco foi calculada com base na curva de calibração do Lapachol feita neste equipamento.

Devido a uma mudança de cor característica do Lapachol ao entrar em contato com a ZIF-8 dispersa em etanol, de amarelo para vinho, testes adicionais de dessorção do sistema ZIF-8-Lapachol foram realizados. Nestes testes, 20 mg de ZIF-8 com Lapachol adsorvido foram dispersos em 1 mL de etanol. A mistura foi agitada por 30 minutos e em seguida centrifugada, e o sobrenadante foi retirado e o sólido foi submetido ao mesmo processo de lavagem por mais 3 vezes. Todos os sobrenadantes recolhidos foram filtrados com filtros de 45 µm, diluídos e analisados por espectroscopia de absorção UV-vis.

Testes de comparação entre a ZIF-8-Lapachol e as soluções Lapachol/Nitrato de Zinco, Lapachol/Imidazol e apenas Lapachol em etanol foram também feitos por UV-vis para avaliar a causa da mudança de cor da dispersão ZIF-8-Lapachol.

Devido ao Lapachol apresentar tal comportamento frente à ZIF-8, conforme observado na Figura 57, onde um os picos correspondentes à absorção do Lapachol no UV-Vis desaparece, decidiu-se realizar testes com a zeólita ZSM-5, que foi cedida pelo Laboratório de Tecnologias Limpas (Departamento de Engenharia Química – UFPE). Como a ZSM-5 possui estrutura muito semelhante à ZIF-8, testes de adsorção do Lapachol foram feitos para verificar se seu comportamento se repete quando disperso em etanol na presença da ZSM-5.

5.5.2 H-KUST

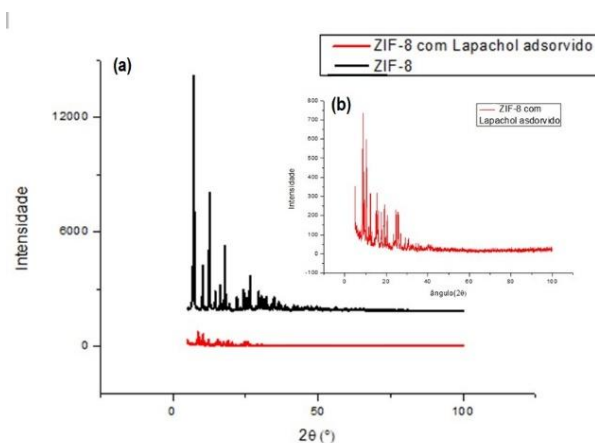
A síntese da H-KUST foi feita de acordo com a metodologia proposta por Li *et al.*, 2017. Para esta síntese foram utilizados dois béqueres, um contendo 0,3g de acetato de cobre ($\text{Cu}(\text{OAc})_2$, Merck, 99%) e 4 g de ácido benzoico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$, Merck, 99,9%) dissolvidos em 30 mL de álcool butílico (Dinâmica, 99,4%); e outro contendo 0,8 g de ácido trimésico (H_3BTC , Aldrich, 95%) dissolvido em 30 mL de N, N-dimetilformamida (DMF, Dinâmica, 99,8%) e agitado. A mistura contendo acetato de cobre e ácido benzoico foi adicionada ao béquer, contendo H_3BTC e DMF, por gotejamento à 25° C por 30 min.

Enquanto as gotas foram adicionadas, a solução foi mantida sob agitação com agitador magnético, quando houve formação de um sedimento azul, a solução foi agitada por mais 30 min. O líquido resultante foi centrifugado 10.000 rpm por 15min e os sólidos foram lavados

com etanol 3 vezes, em seguida o precipitado foi seco à temperatura ambiente até que todo o solvente evaporasse. O sólido obtido a partir dessa síntese foi macerado e utilizado para testes de adsorção do Lapachol.

A ZIF-8 obtida após a síntese é um pó branco cristalino, que quando caracterizado por DRX apresenta os picos de Bragg característicos de seus cristais, de aproximadamente 65 nm (Cravillon *et al.*, 2011), conforme pode-se observar no difratograma apresentado na Figura 53. Ao comparar o DRX da ZIF-8 pós- síntese com o DRX da ZIF-8 após adsorção do Lapachol, percebe-se que houve alterações dos seus picos característicos, podendo indicar alguma mudança na sua cristalinidade.

Figura 53 - Difratogramas da ZIF-8: Comparação entre (a) ZIF-8 pós-síntese e (b) ZIF-8 após adsorção com Lapachol



Fonte: A autora (2020).

Apesar do Lapachol ter elevado grau cristalino, conforme observado no difratograma da Figura 53, apresentando picos finos e de elevada intensidade, que poderiam mascarar os picos da ZIF-8 (Figura 53 (a)), acredita-se que a ZIF-8 pode ter sido degradada pela presença do Lapachol em solução etanólica.

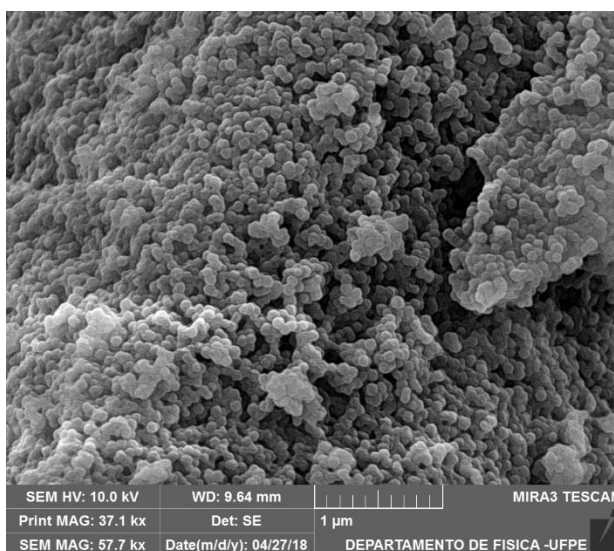
- Microscopia Eletrônica de Varredura

A ZIF-8 sintetizada apresenta nanoestruturas de aproximadamente 55 nm, conforme mostra a micrografia na Figura 54. Apesar de aglomerados, os cristais apresentam um tamanho uniforme, correspondendo bem à síntese de ZIF-8 nanométrica desenvolvida por Cravillon *et*

al. (2011). O excesso do ligante 2-metil-imidazol (Hmin) com relação à fonte de Zn (II) em soluções metanoicas é o principal fator para a obtenção da ZIF-8 nano. Ele atua como unidade ligante quando está desprotonado e como unidade estabilizante quando está neutro.

Segundo o mecanismo proposto por Cravillon *et al.* (2009), ao considerar o $pK_{a1}= (7.1)$ e o $pK_{a2}= (14.2)$, os valores de imidazol em metanol, espera-se que o equilíbrio das formas catiônicas (protonadas) e neutras existam em solução, e que a desprotonação do Hmim seja direcionada apenas pela cristalização da ZIF-8. Uma quantidade suficiente de Hmin neutra também deve estar dispersa no meio para estabilizar os nanocristais carregados positivamente, e assim garantir a obtenção de cristais na escala nanométrica.

Figura 54 - ZIF-8 nanométrica sintetizada pelo método de Cravillon *et al.* (2001)



Fonte: A autora (2020).

A ZIF-8 nanométrica é mais indicada para aplicação para adsorção de fármacos do ponto de vista de transporte de massa e de energia. Como o caminho difusional que as moléculas de fármaco devem fazer no interior das cavidades dos seus poros é menor, aumenta-se assim a velocidade de adsorção/dessorção, quando comparada com a ZIF-8 micrométrica tradicional.

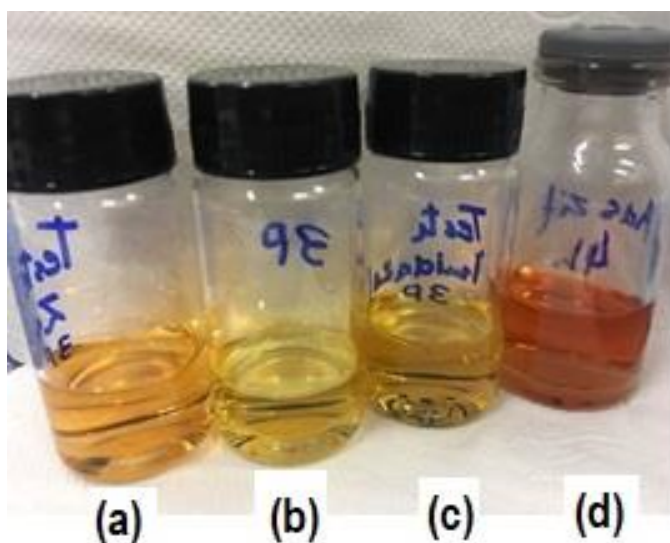
- Testes de Adsorção

O teste da adsorção do Lapachol utilizando a H-KUST como adsorvente, foi realizado segundo a metodologia descrita no item 4.5.2.3, feita com ZIF-8, porém a proporção adsorvente:fármaco utilizada foi de 1:1. As análises do sobrenadante para verificar a interação

do fármaco com a H-KUST, foram feitas por UV-vis, conforme descrito no item 5.5.1.2, em “testes de adsorção”. Como houve variação de cor e do espectro UV-vis do Lapachol, a H-KUST não foi desconsiderada para ser utilizada como adsorvente para o Lapachol, e os testes com os precursores da síntese H-KUST não foram realizados.

A adsorção do Lapachol não pôde ser quantificada, pois a mudança da cor, de amarelo (Figura 55(b)) para a cor vinho (Figura 55 (d)) da dispersão etanoica de ZIF-8 e Lapachol e da mudança dos picos no espectro UV-vis, indicaram uma possível degradação. Ao comparar as soluções ZIF-8-Lapachol Figura 55 (d) e as soluções Lapachol/Nitrato de Zinco Figura 55 (a), Lapachol/Imidazol Figura 55 (c) e apenas Lapachol Figura 55 (b) percebe-se que há uma variação de cor para rósea na presença de nitrato de zinco. Foram feitas análises de UV-vis para avaliar a relação entre a mudança de cor e a degradação do Lapachol.

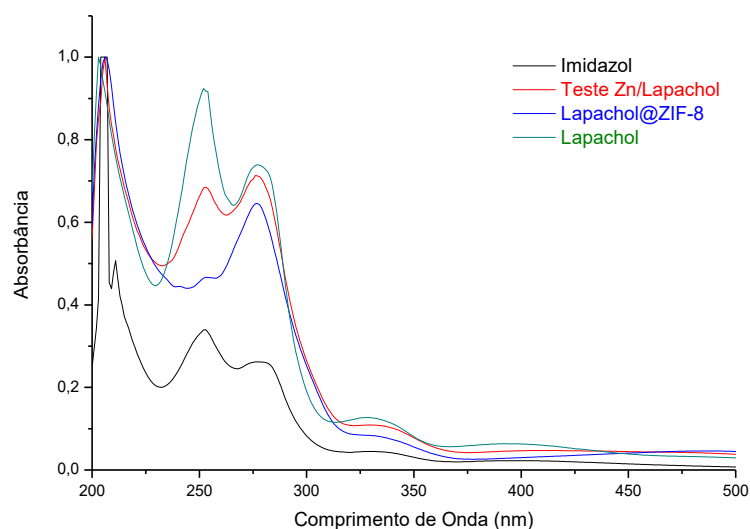
Figura 55 - Sistemas contendo Lapachol. (a) Lapachol/Nitrato de Zinco. (b) Apenas Lapachol. (c) Lapachol/Imidazol. (d) ZIF-8-Lapachol



Fonte: A autora (2020).

Os espectros UV-vis da Figura 56 mostram que as bandas características do Lapachol em 203 nm, 252 nm e 277 nm diminuem ou desaparecem, sugerindo que ocorra alguma reação química durante a adsorção do Lapachol na ZIF-8.

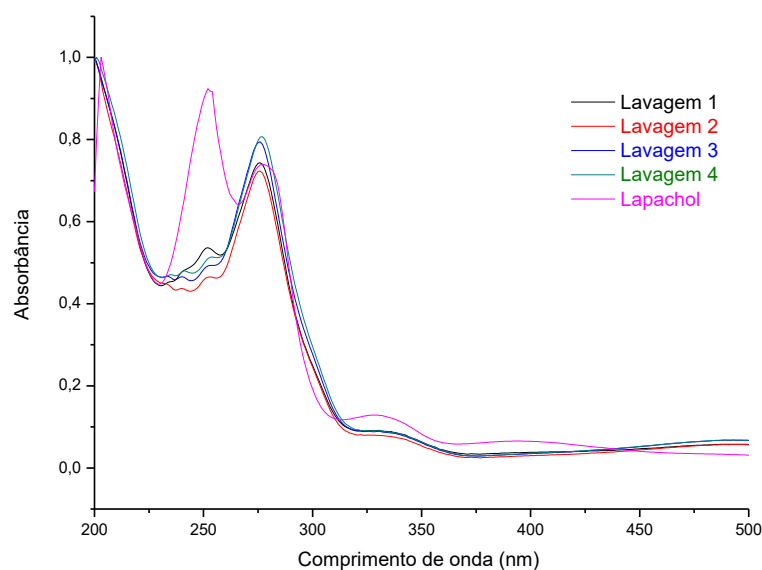
Figura 56 - Comparação do espectro UV-Vis de soluções de Lapachol, Lapachol e ZIF-8, Lapachol e Imidazol, Lapachol e Nitrato de zinco dissolvidos em etanol



Fonte: A autora (2020).

Para confirmar que realmente houve reação química e que a variação de cor não estivesse relacionada com um possível estado conformacional do Lapachol ao interagir com o zinco da ZIF-8, foi registrado o espectro UV-Vis dos testes de dessorção do Lapachol com sucessivas lavagens, que mostram que o composto que é dessorvido da MOF é outro composto químico, conforme mostra a Figura 57, confirmando a degradação do fármaco.

Figura 57. Espectros UV-vis dos compostos dessorvidos da ZIF-8 após sucessivas lavagens.



Fonte: A autora (2020).

5.5.3 ZSM-5

5.5.3.1 Síntese da ZSM-5

A ZSM-5 utilizada foi sintetizada através da metodologia descrita no site da Associação Internacional de Zeólitas IZA. Esta metodologia é composta por duas principais etapas: na primeira, o gel com cristais pequenos é formado usando TPAOH como direcionador, e a segunda corresponde ao crescimento desses cristais, que foi conduzida na ausência de direcionador.

Para produzir o gel da primeira etapa, os reagentes utilizados foram: 144 mL de água destilada; 2,76 g de hidróxido de sódio NaOH (Chimie Plus, 99%); 23,4 g de hidróxido de tetrapropilamônio TPAOH (SACHEM, 40%) e 30,38 g de sílica precipitada SiO₂ (Evonik Sipernat 320, 91%). Primeiro uma solução foi preparada dissolvendo o NaOH e o TPAOH 40% em água a temperatura ambiente. Em seguida, a sílica foi adicionada aos poucos à solução sob agitação, a nova mistura foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação durante 1 h. O gel formado foi transferido para uma autoclave de teflon, e levado à estufa onde permaneceu por 16 h sob 100 °C para promover o início do crescimento dos cristais.

Para a segunda etapa desta síntese, foram usados 1574 mL de água destilada, 15,84 g de NaOH (Chimie Plus, 99%), 16,09 g de aluminato de sódio, NaAlO₂ (Problabo, 99%) e 194,58 g de sílica precipitada SiO₂ (Evonik Sipernat 320, 91%) como reagentes. Inicialmente a solução foi preparada dissolvendo o NaOH e o NaAlO₂ em água a temperatura ambiente. Após dissolução dos reagentes, o SiO₂ foi adicionado aos poucos e lentamente à solução sob agitação. Essa suspensão foi mantida sob temperatura ambiente e agitação durante uma hora. Então, 50 mL do gel preparado na primeira etapa foram adicionados e a nova mistura foi agitada à temperatura ambiente por mais uma hora.

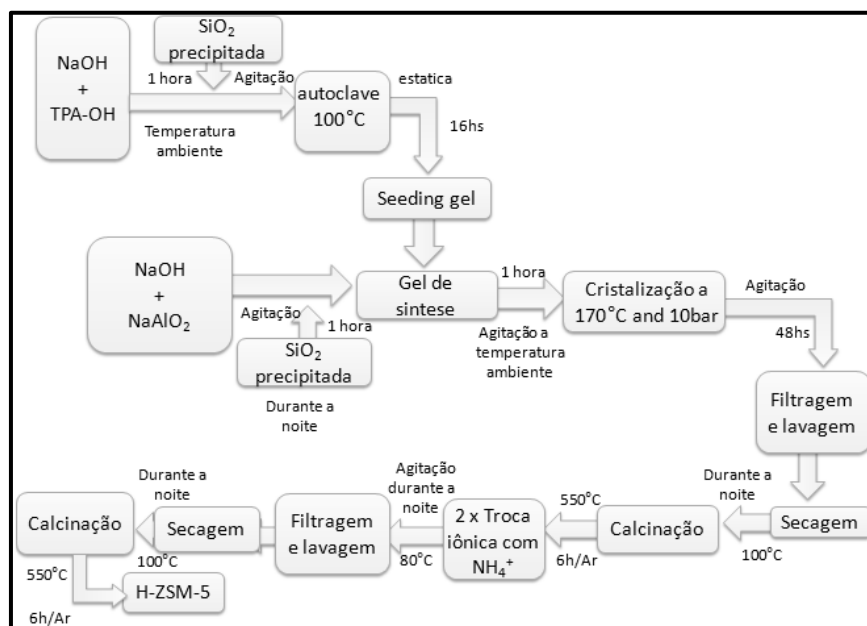
O crescimento dos cristais ocorreu em uma autoclave de aço de 2,4 L de capacidade, aquecida a uma taxa de 2 °C·min⁻¹ e mantida a 170 °C sob agitação durante 48 h e sob pressão de 10 bar.

Após o crescimento dos cristais, a ZSM-5 foi filtrada e lavada várias vezes com água destilada até neutralizar o pH. Então, o material foi seco na estufa a 100 °C por uma noite, e calcinado sob uma taxa de aquecimento de 1 °C·min⁻¹ a 550 °C durante 6 h sob atmosfera de ar. Para obter a forma ácida da ZSM-5, foram feitas duas trocas iônicas com solução de Nitrato de amônio NH₄NO₃ (Sigma Aldrich, 99%) como uma solução de 2 M e proporção de 1 g de

catalisador para 10 mL de solução. Em cada troca a mistura foi agitada durante uma noite sob 80 °C, a zeólita foi separada da solução por filtração e lavada com água destilada até neutralizar o pH. O material obtido, NH₄-ZSM-5, foi seco em estufa a 100 °C durante uma noite e calcinado sob uma taxa de aquecimento de 1°C·min⁻¹ a 550 °C durante 6 h sob atmosfera de ar e finalmente foi obtido o H-ZSM-5. O esquema desta síntese pode ser acompanhado no diagrama apresentado na Figura 58.

Esta síntese foi posteriormente submetida a um tratamento térmico com vapor de água a 600 °C para promover a remoção do Alumínio presente na estrutura, aumentar o tamanho dos poros e aumentar a razão Si:Al, ou seja, diminuição dos sítios ácidos na superfície do material adsorvente.

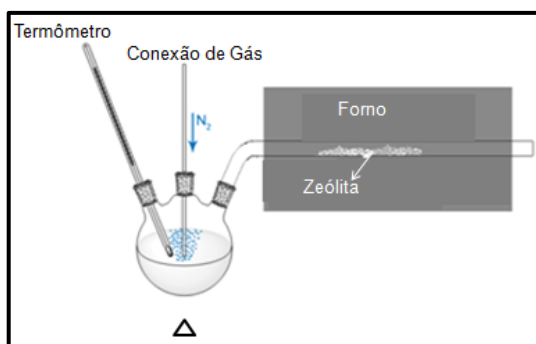
Figura 58 - Esquema de síntese de H-ZSM-5 pelo método da semente



Fonte: QUEIROZ (2013).

A metodologia usada foi descrita por Triantafillidis *et al.* (2001). As amostras foram tratadas com uma mistura de N₂, usado como gás de arraste, a 100 mL·min⁻¹, saturado com água. Para fazer esse procedimento foi necessário um forno com um tubo de quartzo. Foram pesados 10 g de material e colocados dentro de uma barqueta de quartzo. A barqueta foi colocada exatamente no centro do forno, como mostra a Figura 59.

Figura 59 - Representação do sistema de tratamento com vapor d'água



Fonte: QUEIROZ (2013).

O forno foi aquecido numa taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até a temperatura do tratamento. Quando o forno chegou à temperatura desejada, um sistema de saturação a $97\text{ }^{\circ}\text{C}$ (0,9 bar de pressão de vapor d'água de acordo com a literatura) foi conectado ao tubo de quartzo. A amostra foi tratada a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob o fluxo de nitrogênio e vapor d'água.

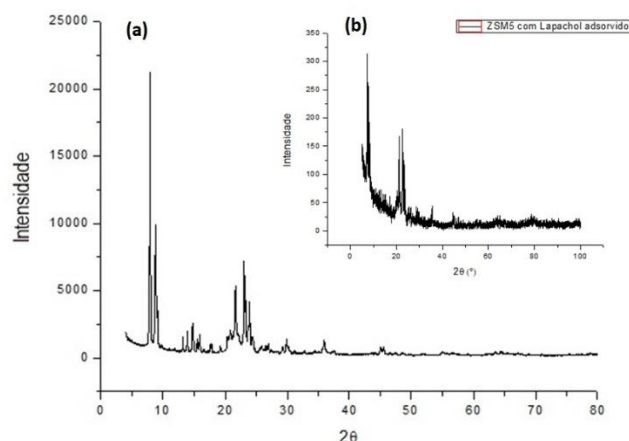
5.5.3.2 Caracterização da ZSM-5

- Difração de Raios X

A difração de raios X da ZSM-5 foi feita para verificar se a estrutura sintetizada estava de acordo com a literatura e para avaliar se houve alguma alteração da sua estrutura após a adsorção do fármaco. A amostra foi analisada por difração de raios X pelo método do pó, em equipamento BRUKER D8, com fonte contínua de radiação K_{α} do Cobre. A faixa de varredura foi de $4\text{-}70^{\circ}$ e passo de $0,02^{\circ}$.

Ao comparar os difratogramas da ZSM-5 antes e depois da dessorção do Lapachol, mostrados na Figura 60, percebe-se que houve uma diminuição do grau de cristalinidade e surgimento de regiões amorfas, sugerindo que mais uma vez a interação do Lapachol com o adsorvente modifica sua estrutura cristalina.

Figura 60 - Difratomogramas da ZSM-5: (a) pós síntese e (b) após adsorção do Lapachol



Fonte: A autora (2020).

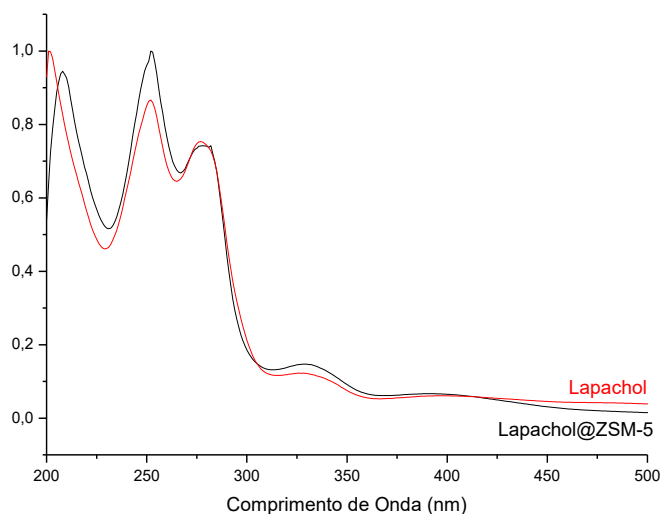
Apesar de apresentar uma pequena alteração na sua fração cristalina, a dispersão contendo ZSM-5 não apresentou variação da coloração, permanecendo amarelada durante os experimentos.

- Testes de Adsorção

O teste da adsorção do Lapachol realizado com a ZSM-5 foi realizado segundo a metodologia descrita no item 5.5.1.2, feita com ZIF-8. As análises do sobrenadante para quantificação do Lapachol adsorvido também foram feitas por UV-vis, conforme descrito no item 5.5.1.2. Como não houve variação de cor nem do espectro UV-vis, os testes com os precursores da síntese da ZSM-5 não foram realizados.

O espectro de UV-vis, Figura 61, comprova que não houve reação química durante o processo adsorativo, sugerindo que efeitos como a interação do fármaco com o adsorvente precisam ser melhor compreendidos, como se pretende fazer nos trabalhos decorrentes desta tese.

Figura 61 - Espectro de UV-vis de adsorção do Lapachol em ZSM-5 e do Lapachol puro



Fonte: A autora (2020).

5.5.4 SBA

O SBA utilizado foi cedido pelo Laboratório de Tecnologias Limpas da UFPE. Ele foi sintetizado pela metodologia descrita por Zhao *et al.* (1998). Inicialmente pesou-se 2,45 g de Pluronic® P123 em um Becker de 250 mL, adicionou-se 11,9 mL de HCl e 79,55 mL de água destilada ao Becker, o mesmo foi conduzido sob agitação à 50 °C. Após 2 h de agitação, adicionou-se 5,7 mL de TEOS à mistura, sem variar suas condições de temperatura e agitação. A mistura foi mantida sob agitação por 24 h. Passadas as 24 h, o material foi transferido para um frasco de teflon (autoclave), onde foi mantido em repouso por 48 h sob 100 °C num sistema digestor. O gel de síntese foi mantido no sistema digestor por mais 24 h à 100 °C. Após completar o tempo de permanência na autoclave, o gel de síntese foi filtrado. Com o fim de filtração o material foi lavado com etanol, onde o sólido retido foi separado desprezando-se o líquido. Após a lavagem, o material sólido disposto em um vidro de relógio para secar à temperatura ambiente por 48 h. O sólido obtido a partir dessa síntese foi calcinado a 550 °C, macerado e utilizado para testes de adsorção do Lapachol.

- Testes de Adsorção

O teste da adsorção do Lapachol utilizando a H-KUST como adsorvente, foi realizado segundo a metodologia descrita no item 5.5.1.2, feita com ZIF-8, porém a proporção de

adsorvente: fármaco utilizada foi de 1:1. As análises do sobrenadante para verificar a interação do fármaco com a H-KUST, foram feitas por UV-vis, conforme descrito no item 5.5.1.2. Como não houve variação de cor nem do espectro UV-vis do Lapachol, os testes com os precursores da síntese da H-KUST não foram realizados.

5.5.5 MCM-48-APTES

O MCM-48-APTES testado neste trabalho como adsorvente foi cedido pelo Laboratório BSTR (DQF/UFPE) (AZEVEDO, 2019) de acordo com a síntese proposta por Kim, Chung e Lin (2010), e as etapas dessa síntese são descritas a seguir.

Inicialmente foram misturados, por agitação mecânica, 0,5 g de Brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB, Sigma Aldrich, 98%), 2,05 g de Pluronic® F-127 (F-127, Sigma Aldrich) essa mistura foi diluída em 96 mL de água destilada, 43 mL de etanol absoluto (Merck, 99,9%, P.A) e 11 mL de solução de hidróxido de amônio a 29% (Sigma Aldrich). Após a dissolução dos reagentes foram adicionados 2 mL de Tetraetil Ortosilicato (TEOS, Sigma Aldrich 98%) mantendo a agitação por cerca de 5 minutos até que a mistura se tornasse translúcida. Essa mistura resultante ficou sem agitação à temperatura ambiente por 24 h para que as reações de condensação da sílica acontecessem. Em seguida a suspensão resultante foi centrifugada à 6000 rotações por minuto (rpm) durante 10 min e lavada 4 vezes com água destilada. O precipitado branco obtido a partir dessa mistura foi levado a uma estufa de aquecimento a 70 °C por 24 horas e então calcinado à 550 °C sob atmosfera de ar por 4 horas.

Após a síntese, o MCM-48 foi funcionalizado com o agente silano aminopropil 3-(trietoxisilano) (APTES, Sigma Aldrich, 95%) conforme descrito a seguir:

Uma amostra de 10 mg do MCM-48 sintetizado foi dispersa em 10 mL de tolueno, em seguida 3 mL de APTES foram adicionados por gotejamento e a mistura resultante ficou em refluxo por 24 h à 120 °C. Após esta etapa, a suspensão resultante foi centrifugada a 6000 rpm e lavada várias vezes com tolueno. O sólido precipitado após a etapa de centrifugação foi seco à 60 °C por 6 h obtendo assim o MCM-48-APTES (AZEVEDO, 2018).

- Testes de Adsorção

O teste da adsorção do Lapachol utilizando o MCM-48-APTES como adsorvente, foi realizado segundo a metodologia descrita no item 4.5.1.2, feita com ZIF-8, porém a proporção

de adsorvente: fármaco utilizada foi de 1:1. As análises do sobrenadante para verificar a interação do fármaco com o MCM-48- APTES, foram feitas por UV-vis, conforme descrito no item 4.5.1.2. Apesar da leve variação de cor da suspensão e da variação do espectro UV-vis, os testes com os precursores da síntese do MCM-48-APTES não foram realizados.

5.5.6 Adsorção do Lapachol em MCM-48, H-KUST e SBA-15

Como o único adsorvente que não interagiu com o Lapachol foi a ZSM-5, e a utilização desse material não é indicada para o desenvolvimento de biomateriais que entram em contato direto com o corpo devido a presença de alumínio na sua composição, que é um dos principais elementos que contribuem para o desenvolvimento de doenças como o Alzheimer, novos testes de adsorção foram feitos com MCM-48-APTES, H-KUST e SBA-15.

Durante a adsorção, houve mudança de cor nas suspensões contendo H-KUST e SBA- 15 (Figura 62), porém as análises de UV-Vis onde o espectro dos sobrenadantes de 24 h de adsorção foi comparado com o espectro do Lapachol puro, conforme apresentado no gráfico da Figura 64.

Figura 62 - Adsorção do Lapachol em MCM-48-APTES, HKUST e SBA-15 respectivamente

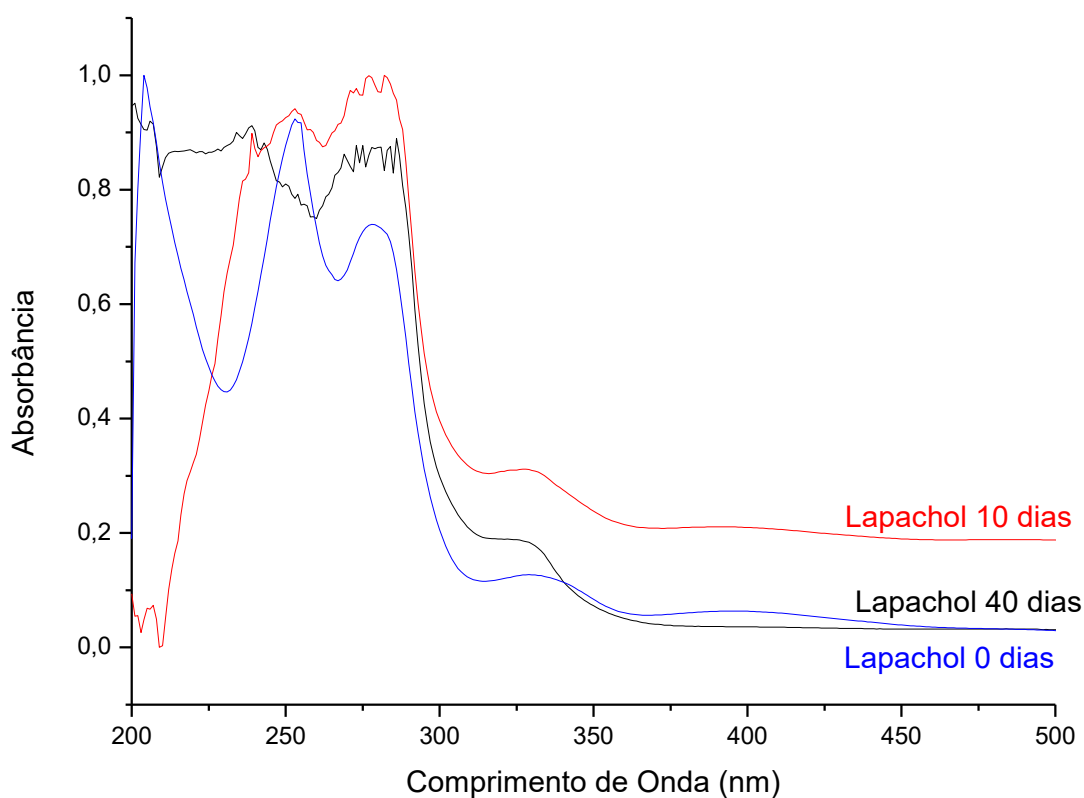


Fonte: A autora (2020).

5.6 DEGRADAÇÃO DO LAPACHOL

Como foi observada uma variação do perfil do espectro de UV-Vis do Lapachol, foi realizado um teste de degradação do Lapachol dissolvido em etanol e armazenado em frascos de vidro à temperatura ambiente. Na Figura 63, tem-se o espectro do UV-Vis do Lapachol preparado no mesmo dia, após 10 dias de preparação e após 40 dias.

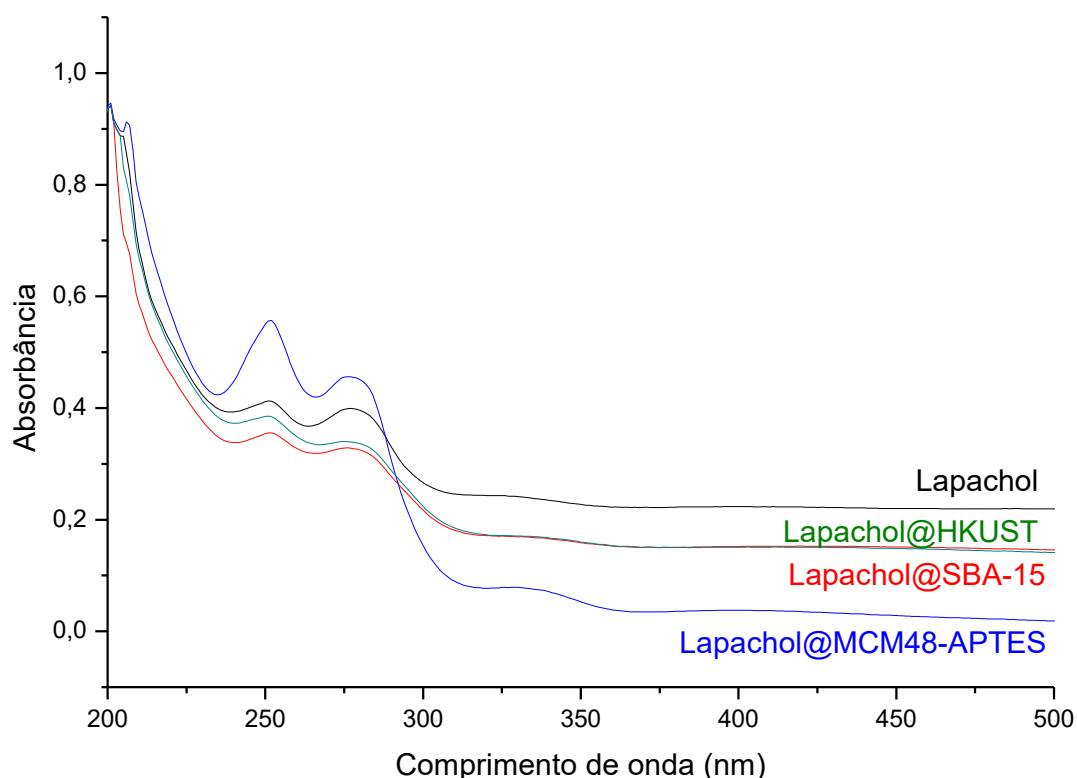
Figura 63 - Espectros UV-Vis do Lapachol puro dissolvido em etanol com 0, 10 e 40 dias



Fonte: A autora (2020).

Como foram propostas provas de conceito neste trabalho, e o Lapachol apresentou um comportamento instável em solução alcoólica, sua utilização como fármaco modelo foi desconsiderada, visto que o etanol é utilizado na composição do fluido de impressão e como solvente para o PVB.

Figura 64 - Espectros UV-Vis do sobrenadante obtido após 48h de adsorção do Lapachol em MCM-48-APTES, HKUST e SBA-15

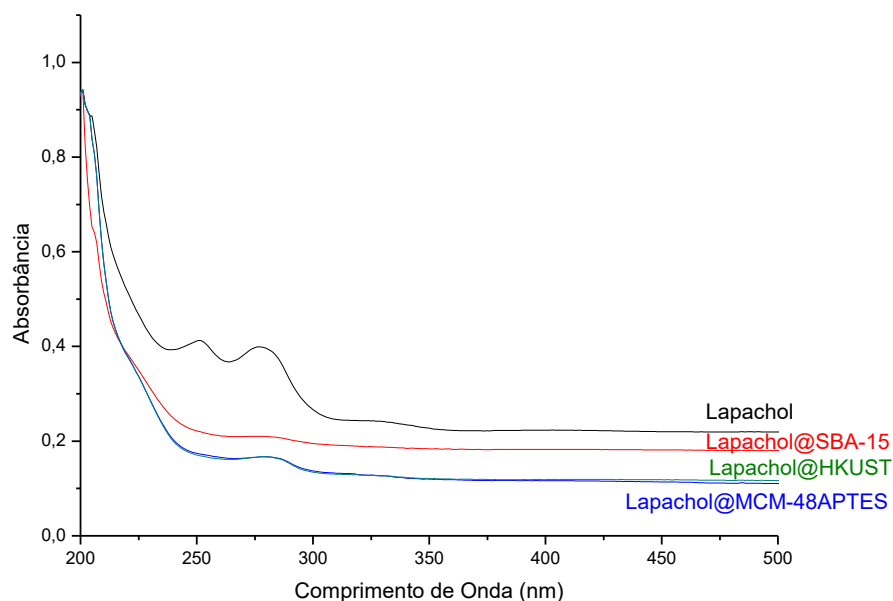


Fonte: A autora (2020).

Conforme observado no espectro de UV-Vis da Figura 64, apesar da suspensão contendo H-KUST apresentar uma variação de cor (de amarelo-alaranjado do Lapachol puro em etanol, para vinho) observada na Figura 62, não há variação significativa no perfil do espectro dos sobrenadantes da H-KUST e do SBA-15 quando comparado com o espectro do Lapachol puro.

A variação de cor da suspensão contendo H-KUST pode estar associada à coordenação do Lapachol pelo cobre presente na estrutura dessa MOF. O SBA-15 também apresentou uma variação de cor para alaranjado, mas o espectro do UV-Vis da Figura 64 mostra que sua presença não interage com o Lapachol. Já no caso do MCM-48-APTES, além da variação de cor, o espectro do UV-Vis apresenta um comportamento diferente do espectro do Lapachol puro.

Figura 65 - Espectros UV-Vis do sobrenadante obtido após 24h de dessorção do Lapachol em MCM-48-APTES, HKUST e SBA-15



Fonte: A autora (2020).

A dessorção do Lapachol também foi avaliada (Figura 65), mostrando que apesar dos adsorventes SBA-15 e HKUST não interagirem com o Lapachol, a liberação do fármaco em 24 h é baixa. Por esse motivo, a etapa de incorporação do fármaco/adsorvente ao polímero para o desenvolvimento de filmes hidrofóbicos para a liberação de fármacos não foi levada adiante.

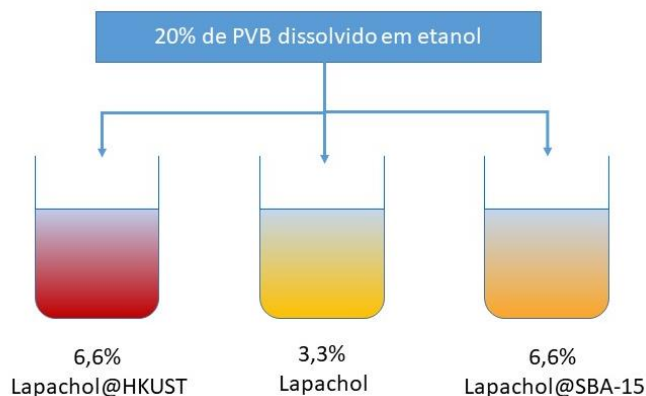
5.7 COMPÓSITOS DE PVB COM OS CARREADORES CONTENDO LAPACHOL

Com o objetivo de propor o desenvolvimento de filmes super-hidrofóbicos para proteção dos adesivos de entrega transdérmica de fármacos, foram feitos compósitos à base de PVB (BUTVAR B-18) e carreadores contendo Lapachol adsorvido. De acordo com o comportamento do Lapachol ao entrar em contato com os adsorventes, descrito na sessão anterior, a H-KUST e o SBA-15 se destacaram pela baixa interação com o fármaco dentre os adsorventes testados, pois não apresentaram sinais significativos de degradação após a etapa de adsorção-dessorção do Lapachol. Por esse motivo, esses adsorventes foram selecionados para testar a viabilidade de produção de compósitos PVB/Lapachol@adsorvente.

Os compósitos foram produzidos na proporção de 6,6% de adsorvente contendo Lapachol 1:1, de modo que a proporção em massa de Lapachol no compósito final é de 3,3%,

20% de PVB e 73,4% de etanol. Além dos compósitos com o adsorvente HKUST e SBA-15, também foi feito um compósito apenas com o Lapachol e o PVB nas seguintes proporções: 3,3% Lapachol, 20% PVB e 76,7% etanol, para avaliar o efeito do adsorvente nas suas propriedades. A composição dos compósitos produzidos é apresentada no esquema da Figura 66.

Figura 66 - Composição dos compósitos de PVB



Fonte: A autora (2020).

Essas misturas foram homogeneizadas com a utilização de ultrassom até apresentarem uma consistência e aspecto de gel. Após a obtenção desses géis, cada compósito foi depositado uniformemente sobre os moldes de PDMS obtidos a partir dos biotemplates produzidos conforme a metodologia da seção 4.2. Os conjuntos molde-réplica foram secos por 24h à temperatura ambiente para evaporação do solvente, e as réplicas obtidas foram destacadas dos seus respectivos moldes e caracterizadas por análise termogravimétrica, medidas de ângulo de contato, e microscopia eletrônica de varredura.

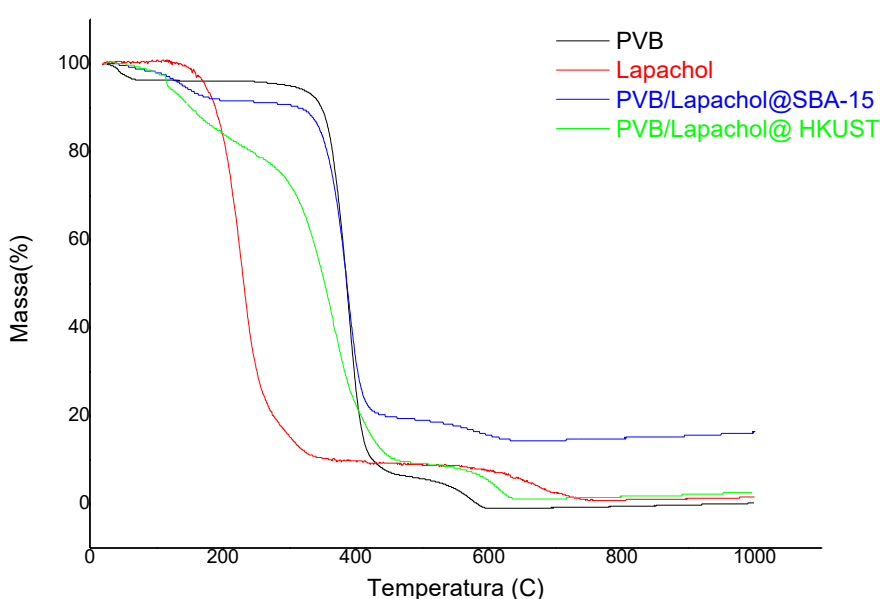
As análises termogravimétricas foram feitas no equipamento TGA-50-H (Shimadzu, Japão) sob atmosfera de nitrogênio (50 mL.min^{-1}) a uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ na faixa de temperatura de 25 a $1000 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em cápsulas de platina contendo 7 mg de amostra. Apesar da faixa de temperatura de 25 a $400 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ser suficiente para polímeros como o PVB, a análise foi feita na faixa de 25- $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ para observar o comportamento do adsorvente a base de sílica, SBA-15, e comparar sua influência na degradação térmica do compósito.

Os termogramas apresentados na Figura 67 mostram que a adição de Lapachol e SBA-15 não causaram grande alteração no perfil de degradação do compósito quando comparado com o PVB puro, porém, a presença do SBA-15 contribuiu para um aumento da estabilidade

térmica do compósito, entre 400 e 460 °C pois a perda de massa do compósito nessa faixa de temperatura foi menor do que do PVB puro como pode-se observar nos termogramas da Figura 67.

Apesar do Lapachol começar a perder uma quantidade significativa de massa a partir de temperaturas em torno de 180 °C, quando combinado com PVB e o SBA-15, o seu termograma apresenta comportamento semelhante ao do PVB, o que também pode estar associado à baixa quantidade de Lapachol ao compósito.

Figura 67 - Termogramas de TGA para PVB, Lapachol e compósitos PVB/Lapachol@adsorvente



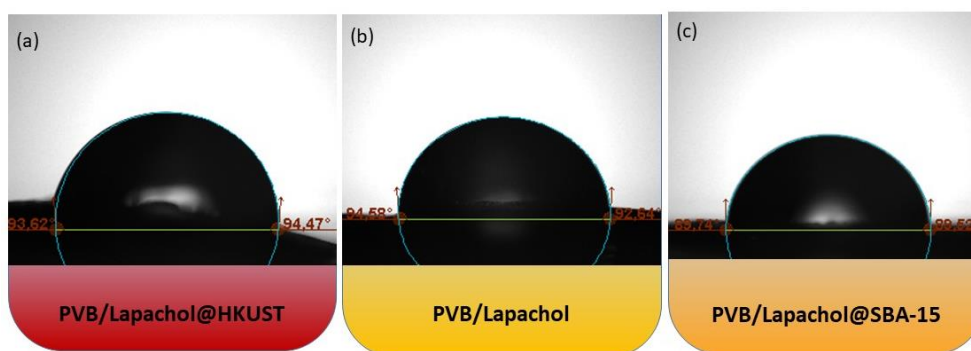
Fonte: A autora (2020).

O comportamento do termograma do compósito PVB/Lapachol@HKUST, apresentou baixa estabilidade térmica, indicando perda de massa a partir de 112°C. Como a HKUST trata-se de uma MOF, ou seja, grande parte da sua massa é formada por compostos orgânicos, essa perda de massa relativamente rápida pode ser justificada pela presença de água e outras moléculas hospedeiras, seguido da degradação dos compostos orgânicos que compõem a HKUST, por volta de 298 °C (LIN *et al.*, 2012). O restante da massa do compósito PVB/Lapachol@HKUST, que corresponde ao PVB, apresentou perfil de degradação térmica igual ao do PVB.

As medidas de ângulo de contato foram feitas nas mesmas condições do item 5.2.2. Conforme apresentado na Figura 68 e na Tabela 6 as réplicas bioinspiradas produzidas a partir

do compósito apresentam comportamento levemente hidrofóbico, com ângulos de contato médios variando entre 91 e 94,9°.

Figura 68 - Formato de gotas de 10 μL de água em diferentes compósitos. (a) Superfície do compósito PVB/Lapachol@ HKUST. b) Superfície do compósito PVB/Lapachol. c) Superfície do compósito PVB/Lapachol@SBA-15



Fonte: A autora (2020).

Tabela 6 - Valores médios do ângulo de contato dos compósitos PVB/Lapachol@adsorvente e PVB/Lapachol

Material	Ângulo de contato (°)
Compósito PVB/Lapachol	$93,4 \pm 3,0$
Compósito PVB/Lapachol@HKUST	$94,9 \pm 0,9$
Compósito PVB/Lapachol@SBA-15	$91,0 \pm 1,1$

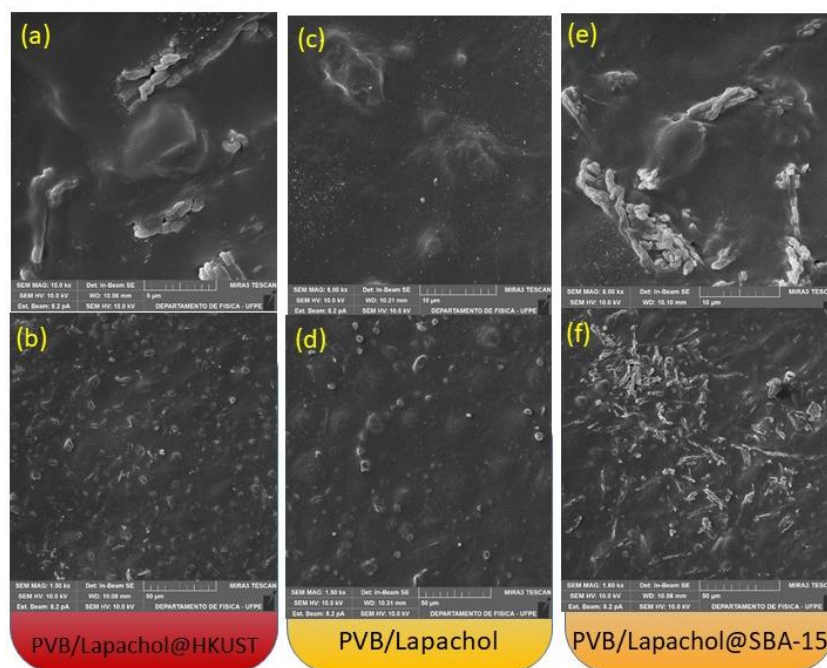
Fonte: A autora (2020).

Durante as medidas de ângulo de contato foi observado que houve variações de 10° nos valores medidos dependendo do local da amostra no qual a medida foi feita. Essas variações estão associadas a dificuldade de reprodução das microestruturas presentes na superfície da *C. esculenta*, o que provavelmente está associado à qualidade do silicone utilizado para a produção dos moldes negativos. O silicone utilizado para produzir os moldes negativos para a produção dos filmes de compósitos foi o mesmo utilizado para a produção das superfícies antibacterianas estruturais, e conforme descrito no item 4.3, as réplicas utilizadas para a produção de superfícies antibacterianas passivas não conseguiram replicar fielmente as estruturas das folhas.

As amostras dos compósitos foram preparadas para registro de MEV e analisadas de acordo com a metodologia descrita no item 5.2.1. Conforme pode-se observar na Figura 69, as microestruturas responsáveis pela hidrofobicidade da *C. esculenta*, foram reproduzidas, porém

as concavidades correspondentes à hierarquia micrométrica são menos expressivas quando comparadas com as da Figura 42 no item 4.2.1. Também se observa que partículas, neste caso de carreador e Lapachol, ficaram aglomeradas em algumas regiões dos compósitos. Nas Figuras 69(a), 69(b), 69(e) e 69(f), onde tem-se o Lapachol e o carreador, observa-se partículas maiores e mais aglomeradas. Nas Figuras 69(c) e 69(d), onde tem-se apenas o Lapachol e o PVB, apesar de existir uma distribuição de partículas, elas estão dispersas mais uniformemente do que nos compósitos que contém o carreador.

Figura 69 - Réplicas positivas da *C. esculenta* em PVB sob diferentes ampliações. (a)-(b) réplicas produzidas com PVB/Lapachol@HKUST. (c)-(d) réplicas produzidas com PVB/Lapachol. (e)-(f) réplicas produzidas com PVB/Lapachol@SBA-15



Fonte: A autora (2020).

Esses resultados sugerem que a metodologia de preparação desses compósitos deve ser otimizada para reduzir a formação de aglomerados de partículas e gerar filmes de composição mais uniforme.

Com base nos resultados observados nessa seção, pode-se afirmar que o compósito PVB/Lapachol@HKUST, apesar da baixa estabilidade térmica, é o que se destaca com maior potencial para aplicação na produção de filmes para a liberação controlada de fármacos agregando novas características quanto à molhabilidade.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho de tese, distintos ensaios foram realizados com precursores a serem utilizados para as provas de conceito propostas, de agregar características hidrofóbicas a filmes entregadores de fármacos por via transdérmica. Foram cultivados biotemplates por hidroponia, e constatou-se que fatores externos, como o stress hídrico, podem afetar a microestrutura da *C. esculenta* (L.) Schott e consequentemente suas propriedades de molhabilidade. Além disso, foi observado que a hidrofobicidade química da cera epicuticular presente na superfície da folha não é responsável pela característica super-hidrofóbica e autolimpante dessas folhas, mas sim a forma na qual ela se dispõe na superfície delas: em nanocristais.

Para a produção de réplicas dessas estruturas por *soft lithography*, o poliacrilato fotopolimerizável se mostrou tão eficaz quanto o tradicional PDMS para produzir moldes e as réplicas positivas de PVB se destacaram pelas excelentes características.

Foi desenvolvido o software *TopoSlicer* para viabilizar a substituição futura do processo de *soft lithography* por processo *layer-by-layer* (LbL) envolvendo printrônica. O software foi validado para uso de micrografias obtidas por AFM, mostrando-se uma ferramenta fundamental para a produção de biotemplates digitais a partir das imagens das espécies naturais para reprodução de estruturas 3D por impressão *Drop-on-Demand* (DoD) por processo LbL. Assim, tornou-se possível a bioinspiração de estruturas biológicas a partir de micrografias. A superfície impressa a partir dos *templates digitais* gerados pelo software permitem a reprodução da microestrutura bioinspirada, ainda que se tenha uma grande limitação de hardware, fazendo-se necessário o uso do estado-da-arte do hardware de impressão (como a SIJ - *Superfine Inkjet*) para uso do software para o fim proposto - de impressão 3D de estruturas bioinspiradas.

A atividade do material produzido como superfície antibacteriana quimicamente passiva, foi analisada através de testes que avaliam a adesão bacteriana nas superfícies bioinspiradas, e mostraram que apesar do curto tempo de exposição de 30 min, foi possível perceber uma diferença considerável na quantidade de bactérias aderidas às superfícies bioinspiradas. Porém, para tempos de exposição bacteriana mais longos, estudos mais detalhados devem ser feitos. As microestruturas do material desenvolvido dificultaram a adesão do *S. aureus*, mas facilitaram a adesão da *E. coli*, que tem afinidade por superfícies hidrofóbicas, o que sugere uma avaliação mais detalhada do efeito da energia de superfície, do mecanismo de adesão bacteriana e do formato da bactéria, para a produção de superfícies bioinspiradas que

possuam estruturas menores do que as propostas aqui capazes de inibir adesão de diversas classes de bactérias.

Finalmente, nos compósitos bioinspirados para carregamento transdérmico de fármaco, foi observado que o Lapachol, utilizado como fármaco-modelo, sofre uma degradação gradativa quando em solução, indicando que ocorre uma interação fármaco/etanol/luz, interagindo com a maioria dos adsorventes testados, sendo essa interação menos intensa com o SBA-15 e com HKUST. Esses carreadores foram escolhidos para a produção de compósitos PVB/Lapachol@carreador, onde o compósito PVB/Lapachol@HKUST, mostrou-se mais adequado para a produção de filmes hidrofóbicos para o desenvolvimento de adesivos transdérmicos.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados positivos das provas de conceito realizadas neste trabalho indicam os caminhos para otimização do material para a aplicação proposta, de produção de superfícies bioinspiradas para o desenvolvimento de recobrimentos funcionais. A seguir são listadas propostas de otimização do produto proposto a partir dos resultados das provas de conceito aqui apresentadas e sugestões que podem melhorar a qualidade do compósito PVB/Lapachol@Fármaco aqui indicado como solução escolhida. Propõe-se:

- Correlacionar os níveis de cinza das imagens de MEV com a profundidade no eixo Z para que as micrografias de MEV também possam ser utilizadas para produção de templates digitais com o TopoSlicer®;
- Realizar testes de impressão com uma impressora *Superfine Inkjet* (SIJ Technology, Tóquio, Japão) que é capaz de ejetar gotas de 0,1 fentolitro (10^{-16} L), para que seja possível imprimir a estrutura bioinspirada na hierarquia nano e micro;
- Fazer um estudo cinético da adesão bacteriana para *E. coli*, *S. aureus* e outros tipos de bactéria, Gram positivas e Gram negativas, para compreender com mais detalhes o efeito da molhabilidade das superfícies na redução da adesão bacteriana e poder aplicar este conceito para diversos tipos de bactérias;
- Avaliar a utilização de COFs (*Covalent Organic Frameworks*) como carreadores para o Lapachol, como uma alternativa mais biocompatível;
- Otimizar a síntese dos compósitos PVB/Lapachol@carreador de modo a obter compósitos onde a matriz polimérica tenha uma dispersão uniforme de nanopartículas de carreador, com fármaco distribuído uniformemente;
- Fazer um estudo cinético de adsorção e dessorção do Lapachol no carreador estudado.

8 ENTREGÁVEIS

Este trabalho deixa como contribuição o software *TopoSlicer*[®] registrado no INPI, que é uma ferramenta para a impressão 3D de superfícies bioinspiradas por Drop-on-Demand a partir da produção de biotemplates digitais através de imagens de AFM, possibilitando a impressão com tipos de materiais. Também deixa registrada no INPI a patente de recobrimento imprimível híbrido de material bioativo com inibição estrutural de formação de placa bacteriana.

Neste trabalho foram validadas as provas de conceito para impressão de materiais a partir de imagens de AFM e por soft lithography de biotemplates, para a produção de superfícies antibacterianas estruturais, quimicamente passivas. Com base nas provas de conceito apresentadas, tem-se uma alternativa para a produção de superfícies bioinspiradas de maneira prática, o que é promissor para o desenvolvimento de revestimentos antibacterianos estruturais imprimíveis. Essas provas de conceito indicam a viabilidade da produção de novos produtos para a indústria de biomateriais, como por exemplo, revestimentos externos de curativos para liberação controlada de fármacos, revestimento polimérico de equipamentos, entre outros.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. **Ohnesorge for Inkjet**, 2019. Disponível em: <<https://www.stevenabbott.co.uk/practical-coatings/ohnesorge.php>> Acesso em 22 de julho de 2019.
- AHAD, A.; AQIL, M.; KHOLI, K.; SULTANA, Y.; MUJEEB, M.; ALI, A. Transdermal drug delivery: The inherent challenges and technological advancements. **Asian J Pharm Sci**, v.5, p. 276-288, 2010.
- AHUJA G., PATHAK, K. Porous Carriers for Controlled/Modulated Drug Delivery. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 599-607, 2009.
- ALFREDSSON, V.; ANDERSON, M. W. Structure of MCM-48 Revealed by Transmission Electron Microscopy. **Chem. Mater.** Vol. 8, p. 1141-1146, 1996.
- ALVES JR, S.; AZEVEDO, L. A.; RUIZ-CRESPO, A. G.; LUZ, L. L.; QUEIROZ, R. S.; FERRO, J. N. S.; SILVA, C. S.; SANTA-CRUZ, P. A.; BARRETO, E. O. **Dispositivos híbridos com aplicações forenses: Biocompatíveis, multi estímulos, luminescentes, reversíveis e instantâneos**. Depositante: Universidade Federal de Pernambuco e Universidade Federal de Alagoas. BR 10 2019000916 0. Depósito: 16 jan. 2019.
- AN, Y. H.; FRIEDMAN, R.J. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. **J. Biomed. Mater. Res.** Vol. 43, p. 338-348, 1998.
- ARAÚJO, E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM, P. J. N. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 2, p. 57-59, 2002.
- AZEVEDO, L. A. **Design de novas tintas e dispositivos híbridos com aplicações forenses: Biocompatíveis, multi estímulos, luminescentes, reversíveis e instantâneos**. 2019. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciência de Materiais) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- ATRIA INOVATION. What is contact angle? 2016. Disponível em: <<http://atriainnovation.com/en/que-es-el-angulo-de-contacto/>> Acesso em: 03 Jun 2018.
- BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAY, P.; GOSH, A.; DATTA, P.; VEER, V. Aspect of Adhesives in Transdermal Drug Delivery Systems. **International Journal of Adhesion y Adhesives**, n.50, p.70-84, 2014.
- BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAY, P.; GHOSH, A.; DATTA, P.; VEER, V.; Aspect of adhesives in transdermal drug delivery systems. **International Journal of Adhesion & adhesives**. v. 50, p. 70-84, 2014.
- BANKS, M. S.; READ, J. C. A.; ALLISON, R. S.; WATT, S. J., Stereoscopy and the Human Visual System. **SMPTE Motion Imaging Journal**, p. 24-43, 2012.
- BAR-COHEN, Y. Biomimetics, biologically inspired technology. **II ECCOMAS thematic conference on smart structures and materials**, 2005, Lisboa, Portugal.
- BARTHLOTT, W.; NEINHUIS, C. Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. **Planta**, n. 202, p.1-8, 1997.

BARTLET, K.; MOVAFAGHI, S.; DAS, L. P.; KOTA, A. K.; POPAT, K. C.; Antibacterial activity on superhydrophobic titania nanotube arrays, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n 166, p. 179–186, 2018.

BATTEN, S. R.; CHAMPNESS, N. R.; CHEN, X. M.; GARCIA-MARTINEZ, J.; KITAGAWA, S.; ÖHRSTRÖM, L.; O'KEEFFE, M.; SUH, M. P.; REEDIJK, J. Terminology of metal-organic frameworks and coordination polymers. **Pure Appl. Chem**, vol. 85, n 8, p. 1715-1724, 2013.

BENITEZ, J. J.; GUZMAN-PUYOL, S.; DOMINGUEZ, E.; HEREDIA, A.; HEREDIA-GUERRERO, J. A. Applications and potentialities of Atomic Force Microscopy in fossil and extant plant cuticle characterization. **Review of Paleobotany and Palynology**. Vol. 268, p. 125-132, 2019.

BERTEN S. N.; LAMPROUA, D. A.; DOUROUMIS, D. 3D printing applications for transdermal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, *in press*, 2018.

BERTENS, C. J. F.; Gijss, M.; Nuijts, R. M. M. A.; van den Biggelaar, F.J.H.M. Topical drug delivery devices: A review. **Exp Eye Res**. n. 168, p. 149-160, 2018.

BHUSHAN, B. Biomimetics: lessons from nature-an overview. **Phil. Trans. R. Soc. A**, n. 367, p. 1445–1486, 2009.

BHUSHAN, B.; JUNG, Y. C.; KOCH, K. Micro-, nano- and hierarchical structures for superhydrophobicity, self-cleaning and low adhesion. **Phil. Trans. R. Soc. A**, n. 367, p. 1631–1672, 2009.

BINNING, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. Atomic force microscope. **Physical review letters**, Vol. 56, n. 9, p. 930-934, 1986.

BORN, M. & WOLF, E., **Principles of Optics**. London: Pergamon, 1959.

BRAUN, V.; REHN, K. Chemical characterization, spatial distribution and function of lipoprotein (murein-lipoprotein) of the *E. coli* cell wall-the specific effect of trypsin on the membrane structure. **European J. Biochem**. Vol. 10, p. 426-438, 1969.

BURKARTER, E. **Desenvolvimento de Superfícies Super-hidrofóbicas de Politetrafluoretileno**. 2010. Tese de doutorado (Doutorado em Física) — Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

BURROWS, L.L.; CHARTER, D.F.; LAM, J. S. Molecular Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-Band lipopolysaccharide gene cluster. **Mol. Microbiol**. Vol. 22, p. 481-495, 1996.

CALLIES, M.; CHEN, Y.; MARTY, F.; PÉPIN, A.; QUÉRÉ, D.; Microfabricated textured surfaces for super-hydrophobicity investigations. **Microelectron. Eng**. v.78–79, p. 100–105, 2005.

CALVERT, P. Inkjet Printing for Materials and Devices. **Chem. Mater.**, n. 13, p.3299-3305, 2001.

CAMPANHOLI, K. S. S.; GEROLA, A. P.; VILSINSKI, B. H.; OLIVEIRA, E. L.; MORAIS, F. A. P.; RABELLO, B. R.; BRAGA, G.; CALORI, I. L.; SILVA, E. L.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Development of Pluronic® nanocarriers comprising Pheophorbide, Lapachol,

and β -lapachone combined drugs: Photophysical and spectroscopic studies. **Dyes and pigments**, vol. 157, p. 238-250, 2018.

CASSIE, A., BAXTER, S., 1944. Wettability of porous surfaces. **Trans. Faraday Soc.** n. 40, p. 546–551, 1944.

CESAR, J. 2011. **3D – Ilustração – Arte**. Disponível em: <<https://julinhocs.wordpress.com/2011/04/19/sonic-the-hedgehog/>> Acesso em 30 Jul 2018

CHEETHAM, A. K.; FÉREY, G.; LOISEAU, T. Open-framework inorganic materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 22, p. 3268–3292, 1999.

CHEN, Z.; LI, Z.; LI, J.; LIU, C.; LAO, C.; FU, Y.; LIU, C.; LI, Y.; WANG, P.; HE, Y. 3D printing of ceramics: A review. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 39, p. 661-687, 2019.

CHENG, Y. T. & RODAK, D. E. Is the lótu leaf superhydrophobic? **Appl. Phys. Lett.** v. 86, 2005.

CHUI, S.S.; LO, S. M.; CHARMANT, J. P.; ORPEN A. G.; WILLIAMS, I. D. A chemically functionalizable nanoporous material. *Science*. Vol. 283, p. 1148-1150, 1999.

CLARK, B. All You Need to Know About *E. coli*, 2015. Disponível em: <<https://www.foodpoisonjournal.com/food-poisoning-information/marler-what-you-need-to-know-about-e-coli/>> Acesso em 14 de agosto 2019.

CRAVILLON, J.; MÜNZER, S.; LOHMEIER, S-J.; FELDHOFF, A.; HUBER, K.; WIEBCKE, M. Rapid Room-Temperature Synthesis and Characterization of Nanocrystals of a Prototypical Zeolitic Imidazolate Framework. **Chem. Mater**, n. 21, p. 1410–1412, 2009.

CRAVILLON, J.; NAYUK, R.; SPRINGER, S.; FELDHOFF, A.; HUBER, K.; WIEBCKE, M. Controlling Zeolitic Imidazolate Framework Nano- and Microcrystal Formation: Insight into Crystal Growth by Time-Resolved in Situ Static Light Scattering. **Chem. Mater.**, n. 23, p. 2130–2141, 2011.

DARBAND, G. B.; ALIOFKHAZRAEI, M.; KHORSAND, S.; SOKHANVAR, S.; KABOLI, A. Science and Engineering of Superhydrophobic Surfaces: Review of Corrosion Resistance, Chemical and Mechanical Stability. **Arabian Journal of Chemistry**, *in press*, 2018.

DECKER, C. The Use of UV Irradiation in Polymerization. **Polymer International**, n. 45, p. 133-141, 1998.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura- Aplicações e preparação de amostras**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DELUCIA, R.; PLANETA, C.S.; GALLACCI, M.; DEAVELLAR, M. C. W.; OLIVEIRA-FILHO R. M.; **Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos**. 5. ed. São Paulo: Clube de Autores, 2014.

DERBY, B. Inkjet Printing of Functional and Structural Materials: Fluid Property Requirements, Feature Stability, and Resolution. **Annu. Rev. Mater. Res.** Vol. 40, p. 395-414, 2010.

DHALIWAL, A. K.; HAY, J. N.; The characterization of polyvinyl butyral by thermal analysis. **Thermochim Acta**, n. 391, p. 245–25, 2002.

DIERCKS, C. S.; O. M. YAGHI. The atom, the molecule, and the covalent organic framework. **Science**, v. 355, ed. 6328, p. 1585, 2017

ENSIKAT, H. J.; DITSCHKE-KURU, P.; NEINHUIS, C.; BARTHLOTT, W. Superhydrophobicity in perfection: the outstanding properties of the lotus leaf. **Beilstein J. Nanotechnol**, n. 2, p. 152–161, 2011.

FARAH, S.; ANDERSON, D.G.; LANGER, R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 107, p. 367–392, 2016.

FERNANDES, F. R. D.; SANTOS, A. G. D.; SOUZA, L. D.; DOS SANTOS, A. P. B. Síntese e Caracterização do Material Mesoporoso SBA-15 Obtido com Diferentes Condições de Síntese. **Rev. Virtual Quim.**, vol. 8, p. 1855-1864, 2016.

FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P. Lapachol- química, farmacologia e métodos de dosagem. **Rev. Bras. Farm**, vol. 84, n. 1, p 9-16, 2003.

GAO, H.; WANG, X.; YAO, H.; GORB, S.; ARZT, E.; Mechanics of hierarchical adhesion structures of geckos. **Mechanics of Materials**, v. 37, p. 275-285, 2005.

GARCIA, R. A., SERRANO, D. P., OTERO, D. Catalytic cracking of HDPE over hybrid zeolitic-mesoporous materials. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 74, p. 379-386, 2005.

GECKSKIN, What is GeckSkin™? Geckskin™ is a new super-adhesive based on the mechanics of gecko feet, 2018. Disponível em: <<https://geckskin.umass.edu/#zone-content>>. Acesso em: 29 Mai 2018.

GOLDSTEIN, J. I.; YAKOWITZ, H. **Practical scanning Microscopy- Electron and Ion microprobe analysis**. New York: Plenum press, 1975.

GOMAR, M.; YEGANEHI, S. Adsorption of 5-fluorouracil, hydroxyurea and mercaptopurine drugs on zeolitic imidazolate frameworks (ZIF-7, ZIF-8 and ZIF-9). **Microporous and Mesoporous Materials**, n.252, p.167-172, 2017.

GONÇALVES, V. L. C., **Acidez de bronsted de sólidos ácidos: Um estudo de correlação linear de energia livre para troca H/D**. 2006. Dissertação de mestrado. (Mestrado em Química Orgânica) — Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GRISTINA, A. Biomaterial-Centered Infection: Microbial Adhesion Versus Tissue Integration. **Science**. Vol. 237, p. 1588-1595, 1987.

GROGG, P. Zeólita, o mineral dos mil usos, 2013. Disponível em: <<http://www.tierramerica.info/nota.php?lang=port&idnews=3381>> Acesso em: 18 Mai 2020.

GU, C.; CHIA, P. A.; ZHAO, X. S. Doping of europium in the pores of surface-modified SBA-15. **Applied Surface Science**, v. 237, p. 387-392, 2004.

HARTLEY, R.; ZISSERMAN. **Multiple View Geometry in computer Vision**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 2004.

- HEREDIA-GUERRERO, J. A.; BENÍTEZ, J. J.; DOMÍNGUEZ, E.; BAYER, I. S.; CINGOLANI, R.; ATHANASSIOU, A.; HEREDIA, A. Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. **Frontiers in Plant science**, Vol 5, p. 1-14, 2014.
- HERRMANN, S.; DANIELS, R.; AND LUNTER, D. Methods for the determination of the substantivity of topical formulations, **Pharm Dev Technol**, p. 1–5, 2016.
- HETEM, D. J.; ROOIJAKKERS, S. H. M.; EKKELENKAMP, M. B. Staphylococci and Micrococci. **Clinical Microbiology: Bacteria**. Section 8, p. 1509-1522, 2017.
- HOPKINHS, H. H. On the diffraction theory of optical images. **Proc. R. Soc. A**, n. 217, p. 408-432, 1953.
- HOPKINHS, H. H. The frequency response of a defocused optical system. **Proc. R. Soc. A**, 231, p 91-103, 1955.
- HORI, K.; MATSUMOTO, S. Bacterial adhesion: From mechanism to control. **Biochemical Engineering Journal**. Vol. 48, p. 424-434, 2010.
- HUANG, X. C.; LIN, Y.Y.; ZHANG, J.P.; AND CHEN, X. M. Ligand-Directed Strategy for Zeolite-Type Metal–Organic Frameworks: Zinc(ii) Imidazoles with Unusual Zeolitic Topologies. **Angew. Chem. Int. Ed.**, n. 45, p. 1557 –1559, 2006.
- IIT DELHI, **Biodegradable Fibres based on Poly (lactic acid) PLA**. 2009. Disponível em: <<http://nptel.ac.in/courses/116102006/16>> Acesso em: 10 Jun 2018.
- INTERNATIONAL TRADE ADMINISTRATION. 2016 Top Markets Report Pharmaceuticals. 2016. Disponível em: <https://www.trade.gov/topmarkets/pdf/Pharmaceuticals_Executive_Summary.pdf>. Acesso em: 15 Maio 2018.
- IWAMOTO, K.; MORIWAKI, M.; MIYAKE, R.; HIDE, M. *Staphylococcus aureus* in atopic dermatitis: Strain specific cell wall proteins and skin immunity. **Allergology International**. Vol. 68, p. 309-315, 2019.
- JOHNSON, R. E.; DETTRE, R. H. Wettability: Wetting of Low-Energy Surfaces. In: BERG, J. C. (Ed.). **Wettability**. New York, Marcel Dekker, Inc, p.1-74,1993.
- JUCKER, B. A.; HARMS, H.; HUG, S.J. Zehnder, A. J. B.; Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds. **Colloids Surf. B**, Vol. 9, p. 331-343, 1997.
- KIM, T.; CHUNG, P.; LIN, V. S. Facile Synthesis of Monodispersed MCM-48 Mesoporous Silica Nanoparticles with controlled Particle Size. **Chem. Mater**. V 22, p. 5093-5104, 2010.
- KOCH, K.; BARTHLOTT, W.; KOCH, S.; HOMMES, A.; WANDEL, K.; MAMDOUH, W.; DE-FEYTER, S.; BROEKMAMM, P. Structural analysis of wheat wax (*Triticum aestivum*, c.v. ‘Naturastar’ L.): from the molecular level to three dimensional crystals. **Planta**. v. 223, p. 258-270, 2006.
- KUMAR, D.; SCHUMACHER, K.; FRESNE VON HOHENESCHE, C.; GRÜNN, M.; UNGER, K. K. MCM-41, MCM-48 and related mesoporous adsorbents: their synthesis and characterisation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. Vol. 187-188, p. 109-116, 2001.

LAGRANGE, T., **Basics of Scanning Electron Microscopy**. 2016. Disponível em: <https://cime.epfl.ch/files/content/users/120862/files/MSE-636/3-SEM_Basics.pdf> Acesso em 07 Ago 2018.

LE, H. P. Progress and Trends in Ink-jet Printing Technology. **Journal of Imaging Science and Technology**, Vol. 42, n. 1, p. 49-62, 1998.

LEE, H.; SONG, C.; BAIK, S.; KIM, D.; HYEON, T.; KIM, DH. Device-assisted transdermal drug delivery. Device-assisted transdermal drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *in press*, 2017.

LI, Y.; LI, X.; GUAN, Q.; ZHANG, C.; XU, T.; DONG, Y.; BAI, X.; Zhang, W.; Strategy for chemotherapeutic delivery using a nanosized porous metal-organic framework with a central composite design. **International Journal of Nanomedicine**, Vol. 12, p. 1465-1474, 2017.

LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; GONÇALVES DE LIMA, C.; MACHADO M. P. Primeiras observações sobre a ação antimicrobiana do Lapachol. **Anais da Sociedade de Biologia de Pernambuco** 14, n. ½, p. 129-135, 1956.

LIN, K. S.; ADHIKARI, A. K.; KU, C. K.; CHIANG, C. L.; KUO, H. Synthesis and characterization of porous HKUST-1 metal organic frameworks for hydrogen storage. **International**. Vol. 37, p. 13865-13871, 2012.

LIRA, A. A. M.; SESTER, E. A.; CARVALHO, A. L. M.; STRATTMANN, R. R.; ALBUQUERQUE, M. M.; WANDERLEY, A. G.; SANTANA, D. P. Development of Lapachol Topical Formulation: Anti-inflammatory Study of a Selected Formulation. **AAPS PharmSciTech**, v. 9, n. 1, p. 163-168, 2008.

LISA BP. Polymers in controlled drug delivery. *Med Plast Biomater Mag* 1997. Disponível em: <<http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>> Acesso em: 08 Jun 2018.

MA, F. M.; LI, W.; LIU, A. H.; YU, Z. L.; RUAN, M.; FENG, W.; CHEN, H. X.; CHEN, Y., Geometrical effect, optimal design and controlled fabrication of bio-inspired micro/nanotextures for superhydrophobic surfaces. **Mater. Res. Express**, n.4, 2017.

MA, F.M.; LI, W.; LIU, A. H.; YU, Z. L.; RUAN, M.; FENG, W.; CHEN, H. X.; CHEN, Y. Geometrical effect, optimal design and controlled fabrication of bio-inspired micro/nanotextures for superhydrophobic surfaces. **Mater. Res. Express**, v. 4, 092001, 2017.

MANNHEIMER, W.A. **Microscopia dos materiais – uma introdução**. Rio de Janeiro: E-papers serviços editoriais, 2002.

MARTINES, E.; SEUNARINE, K.; MORGAN, H.; GADEGAARD, N.; WILKINSON, C. D. W.; RIEHLE, M. O. Superhydrophobicity and superhydrophilicity of regular nanopatterns. **Nano Lett.** n. 5, v.10, p. 2097–2103, 2005.

MIGNONI, M.L.; DETONI, C.; PERGHER, S.B.C, Estudo da síntese da zeólita ZSM-5 a partir de argilas naturais, **Química Nova**, v. 30, 2007.

MONTEIRO, J. M.; FERNANDES, P. B.; VAZ, F.; PEREIRA, A. R.; TAVARES, A. C.; FERREIRA, M. T.; PEREIRA, P. M., VEIGA, H.; KURU, E. ; VANNIEUWENHZE, M. S.; BRUN, Y. V.; FILIPE, S. R.; PINHO, M. G. Cell shape dynamics during the staphylococcal cell cycle. **Nature communications**, n. 6, 8055, p. 1-12, 2015.

MOREIRA, N. R. P., **Estudo de várias propriedades mecânicas do polidimetilsiloxano (PDMS) usado em dispositivos biomédicos**. 2013. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Tecnologia Biomédica) — Escola Superior de Tecnologia e Gestão Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, A.; TAKAGI, F.; WATANABE, A.; HIRUMA, Y., OHUCHI, K.; IWASAKI, Y.; HORIE, M.; MORITA, I.; TAKATANI, S. Biocompatible Inkjet Printing Technique for Designed Seeding of Individual Living Cells. **Tissue Engineering**. Vol. 11, n. 11-12, p. 1658-1666, 2006.

NAOHIRO, N.; KAZUHIRO, T.; YOICHI M. Development and evaluation of a monolithic durg-in-adhesive patch for valsartan; **Int J. Pharm**, n. 402, p. 103-109, 2010.

NHUT, D. T.; HUONG, N.T. D.; KHIEM, D. V. Direct microtuber formation and enhanced growth in the acclimatization of in vitro plantlets of taro (*Colocasia esculenta* spp.) using hydroponics. **Scientia Horticulturae**, n.101, p.207–212, 2004.

O'RIORDAN K.; LEE J.C. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. **Clinical microbiology reviews**, Vol. 17, n. 1, p. 218–23, 2004.

ONCINS, G.; DIAZ, J. **La microscopia de fuerzas atómicas**. Introducción a las técnicas instrumentales de caracterización y análisis I. Universitat de Barcelona, J.R.Seoane, L.Calvo, p.27-37, 2014.

OSIRO, D.; BERNARDES FILHO, R.; ASSIS, O. B. G.; JORGE, L. A. C.; COLNAGO, L. A. Measuring bacterial cells size with AFM. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 341-347, 2012.

OVEISI, E.; LETOUZEY, A.; ZANET, S.; LUCAS, G.; CANTONI, M.; FUA, P.; HÉBERT, C. Stereo-vision three-dimensional reconstruction of curvilinear structures imaged with a TEM, **Ultramicroscopy**, n.184, p.116–124, 2018.

PATERNO, E. R.; Recherche Sull Acido Lapacico. **Gall Chim Ital.**, vol. 12, p. 337-392, 1882.

PERCIVAL, S. L.; WILLIAMS, D. W. *Escherichia coli*. Microbiology of waterborne diseases, p. 89-117, 2014.

PHAN, A.; DOONAN, C. J.; URIBE-ROMO, F; J.; KNOBLER, C. B.; O'KEEFFE, M.; YAGHI, M. O. Synthesis, Structure, and Carbon Dioxide Capture Properties of Zeolitic Imidazolate Frameworks. **Accounts of chemical research**, v. 43, n. 1, p. 58-67, 2010.

POLYMER SCIENCE LEARNING CENTER, 2018, **Polyacrylates**. Disponível em: <<http://pslc.ws/macrog/acrylate.htm>> Acesso em 08 Jun 2018.

QIN, D.; XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. **Nature Protocols**, v. 5, n. 3, p. 491-502, 2010.

QUEIROZ, R. S. **Otimização da síntese de HZSM-5, caracterização e reatividade**. 2013. Relatório de estágio (Graduação em Química Industrial) — Universidade Federal de Pernambuco/Institut de Recherches sur la Catalyse et l'environnement de Lyon, Lyon.

QUEIROZ, R., NEGREIROS, E., MELO, S., ALVES JR., S., SANTA-CRUZ, P. DoD inkjet printing of non-wetting surfaces bioinspired on leaf templates: from the AFM image to a PVB replica using TopoSlicer. **XVII Brazilian MRS Meeting**, 2018.

RAZA, K.; KUMAR, M.; KUMAR, P.; MALIK, R.; SHARMA, G.; KAUR, M.; KATARE, O. P.; Topical Delivery of Aceclofenac: Challenges and Promises of Novel Drug Delivery Systems. **BioMed Research International**, p. 1-11, 2014.

RENTSCHLER, I. Die Wasserbenetzbarkeit von Blattoberflächen und ihre submikroskopische Wachsstruktur. **Planta**, n. 96, p. 119-135, 1971.

ROCHA, L. **A ameaça global das bactérias resistentes aos antibióticos**, 2017, Fiocruz, available in < <https://portal.fiocruz.br/noticia/ameaca-global-das-bacterias-resistentes-aos-antibioticos>> Acesso 12 de Abril de 2019.

SANTA-CRUZ, P. A.; MELO, S. B.; QUEIROZ, R. S.; SOUZA, E. S. **TopoSlicer**. Depositante: Universidade Federal de Pernambuco. Brasil, BR512018001308-2, 30 de julho de 2018.

SANTA-CRUZ, P. A.; PAREDES, N. E. B.; ZAMBRANO, L. A. G.; SOUZA, E. S.; MAIER-QUEIROZ, R.; **Recobrimento imprimível híbrido de material bioativo com inibição estrutural de placa bacteriana**. Depositante: Universidade Federal de Pernambuco. BR 10 2019 014838 1. Depósito: 18 jul. 2019.

SCHNEIDER, R. P. Conditioning film-induced modification of substratum physicochemistry analysis by contact angles. **J. Colloid Interface Sci.** Vol. 182, p. 204-213, 1996.

SEO, Y.; JHE, W. Atomic force microscopy and spectroscopy. **Rep. Prog. Phys.** Vol. 71, p. 1-23, 2008.

SESTER, E. A. **Avaliação biofarmacêutica do Lapachol tópico: ensaios *in vitro* e *in vivo***. 1996. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SHIMOMURA, M.; SAWADAISHI, T. Bottom up strategy of materials fabrication: a new trend in nanotechnology of soft materials. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. V. 6, n. 1, p. 11-16, 2001.

SIRRINGHAUS, H.; KAWASE, T.; FRIEND, R.H.; SHIMODA, T.; INBASEKARAN, M.; WU, W.; WOO, E.P. High-resolution inkjet printing of all-polymer transistor circuits. **Science**. Vol. 15, n. 290, p. 2123-2126, 2000.

SMITH, J. V. Definition of a Zeolite. **Zeolites**, vol. 4, p. 309-310, 1984.

SONÊGO, M.; COSTA, L. C.; AMBRÓSIO, J. D. Flexible thermoplastic composite of Polyvinyl Butyral (PVB) and waste of rigid Polyurethane foam. **Polímeros**. v. 25, n. 2, 2015.

SOUZA, F. L. N. **Filmes super-hidrofóbicos biomimetizados a partir de estruturas hierárquicas da superfície de folhas de espécies vegetais da caatinga**. 2017. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciência de Materiais) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOUSA, F. L. N.; SANTA-CRUZ, P.A. **Filme Bioinspirado em Superfícies Hidrofóbicas para Medida de Salinidade em função de Ângulo de Contato**. Depositante: Universidade Federal de Pernambuco. BR10201801710. Depósito: 21 ago. 2018.

TABOSA, M. A. M.; ANDRADE, A. R. B.; LIRA, A. A. M.; SARMENTO, V. H. V.; SANTANA, D. P.; LEAL, L. B. Microemulsion Formulations for the transdermal Delivery of Lapachol. **AAPS PharmSciTech**, vol. 19, n 4, p. 1837-1846, 2018.

THÜRMER, M. B.; POLETTO, P.; MARCOLIN, M.; DUARTE, J.; ZENI, M. Effect of non-solvents used in the coagulation bath on morphology of PVDF membranes. **Mat. Res.** vol. 15, n. 6, 2012.

TILLER, J. C.; LIAO, C. J.; LEWIS, K.; KLIBANOV, A.M. Designing surfaces that kill bacteria on contact. **Proct. Natl. Acad. Sci.**, vol. 98, p. 5981-5985, 2001.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; BANNERJEE, S. K. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, Vol. 2, n.1, p.1-11, 2012.

TOOSI, S. F.; MORADI, S.; HATZIKIRIAKOS, S.G. Fabrication of Micro/Nano Patterns on Polymeric Substrates Using Laser Ablation Methods to Control Wettability Behaviour: A Critical Review. **Rev. Adhesion Adhesives**, Vol. 5, n 1, p. 55-78, 2017.

TRIAFANTIDIS, C. S.; VLESSIDIS, A. G.; NALBANDIAN, L.; EVMIRIDIS, N. P., Effect of degree and type of the dealumination method on the structural, compositional, and acid characteristics of H_ZSM-5 zeolite, **Microporous and Mesoporous Materials**, p. 369-388, 2001.

VAJRAVIJAYAN, S.; PLETNEV, S.; PLETNEV, S.; NANDHAGOPAL, V. Z.; GUNASEKARAN, N. K. Structural analysis of -Prism lectin from *Colocasia esculenta* (L.) Schott. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.91, p.518 a 523, 2016.

VAN DEN BERG, D. **Engineering Non-Wetting Antimicrobial Fabrics**. 2017. Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências aplicadas) — University of Toronto, Toronto.

VARIANKAL, N. E.; JACOB, K. I.; DINH, S. M. Crystallitization of β -estradiol in an acrylic transdermal drug delivery system. **J Biomed Mater Res**, v. 99, p. 397-406, 1999.

VILČNIK, A.; JERMAN, I.; VUK, A. Š.; KOŽELJ, M.; OREL, B.; TOMŠIČ, B.; SIMONČIČ, B.; KOVAČ, J. Structural Properties and Antibacterial Effects of Hydrophobic and Oleophobic Sol-Gel Coatings for Cotton Fabrics. **Langmuir**. Vol. 25, n. 10, p.5869–588, 2009.

VUKUSIC, P. An Introduction to Bio-Inspired Design, 2010. Disponível em: <[<https://www.clspectrum.com/supplements/2010/april-2010/special-edition-2010/font-color-000000-special-edition-2010-font-\(1\)>](https://www.clspectrum.com/supplements/2010/april-2010/special-edition-2010/font-color-000000-special-edition-2010-font-(1))>. Acesso em: 29 Mai 2018.

WANG, S.; JIANG, L. Definition of superhydrophobic states. **Adv. Mater.**, v. 19, p. 3423-3424, 2007.

WANG, S.; JIANG, L. Definition of Superhydrophobic States. **Adv. Mater**, vol 19, p. 3423–342, 2007.

WANG, Y.; SUN, L.; JIANG, T.; ZHANG, J.; ZHANG, C.; SUN, C.; DENG, Y.; SUN, J.; WANG, S. The investigation of MCM-48-type and MCM-41-type mesoporous silica as oral solid dispersion carriers for water insoluble cilostazol. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2013.

WANICK, M.C.; BANDEIRA, J.A. FERNANDES, R.V. Ação antiinflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico do líber do pau d'arco rôxo (*Tabebuia avellanedae*) em pacientes portadoras de cervicites e cérvico-vaginites. **Revista do Instituto de Antibióticos**. Recife / UFPE.v. 10, p. 41 – 46, 1970.

WENZEL, R.N. Resistance of solid surfaces to wetting by water. **Ind. Eng. Chem.** v. 28, n.8, p. 988–994, 1936.

WHITE, F. M. **Mecânica dos Fluidos**. 6. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2005.

WHITESIDES, G. M. Bioinspiration: something for everyone. **Interface Focus**, n. 5, p. 1-10, 2015.

WUTTKE, S.; LISMONT, M.; ESCUDERO, A.; RUNGTAWEEVORANIT, B.; PARAK, W. J. Positioning metal-organic framework nanoparticles within the context of drug delivery- A comparison with mesoporous silica nanoparticles and dendrimers. **Biomaterials**, n.123, p.172-183, 2017.

WYPYCH, G. **Handbook of polymers**, 2nd ed., USA, Chem TEc Publising, p 615-617, 2012.

XIA, F.; JIANG L. Bio-Inspired, Smart, Multiscale Interfacial Materials. **Adv. Mater.**, v. 20, p. 2842–2858, 2008.

ZHANG, M.; FENG, S.; WANG, L.; ZHENG, Y. “Lotus effect in wetting and self-cleaning,” **Biotribology**, vol. 5, p. 31-43, 2016.

ZHANG, Q.; YANG, X.; LI, P.; HUANG, G.; FENG, S.; SHEN, C.; HAN, B.; ZHANG, X.; JIN, F.; XU, F.; LU, T. J. Bioinspired engineering of honeycomb structure – Using nature to inspire human innovation. **Progress in materials Science**, v. 74, p. 332-400, 2015.

ZHAO, D.; FENG, J.; HUO, Q.; MELOSH, N.; FREDRICKSON, G. H.; CHMELKA, B. F.; STUCKY, G. D. Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores. **Science**. V 279, p. 548-552, 1998.

APÊNDICE A - TRABALHOS ENVIADOS A CONGRESSOS E PUBLICADOS

1. Apresentação oral no SBPMat 2018

QUEIROZ, R. S.; NEGREIROS, E.S.S.; MELO, S. B.; ALVES JR, S.; SANTA-CRUZ, P. A. **DoD inkjet printing of non-wetting surfaces bioinspired on leaves templates: from the AFM image to a PVB replica using TopoSlicer**. 2018. Trabalho apresentado ao XVII Brazil MRS Meeting, 2018, [Natal, RN].

2. Capítulo do E-book “Meio ambiente, sustentabilidade e agroecologia 4” da Editora Atena.

QUEIROZ, R. S.; NEGREIROS, E.S.S.; MELO, S. B.; ALVES JR, S.; SANTA-CRUZ, P. A. **Toposlicer® software for bioinspiration using DoD inkjet printing: from AFM image of leaf templates to a PVB replica of non-wetting surfaces**. E-book: Meio ambiente, sustentabilidade e agroecologia, Editora Atena, 2019.

3. Apresentação oral no SBPMat 2019

QUEIROZ, R. S.; NEGREIROS, E.S.S.; SANTOS NETO, I. J. S.; BARRERA, N.; GUSMÃO, N. B.; SANTA-CRUZ, P. A. **Bioinspired passive antibacterial coating based on biofilms inhibition by hierarchical structures**, 2019. Trabalho apresentado ao XVIII Brazil MRS Meeting, 2019, [Balneário Camboriú, SC].

APÊNDICE B - PATENTES

1. Registro de software: TopoSlicer®

Software desenvolvido em Delphi para conversão de imagens de AFM em templates digitais imprimíveis, o que possibilita a reprodução de superfícies na escala micrométrica em impressora de materiais.

SANTA-CRUZ, P. A.; MELO, S. B; QUEIROZ, R. S.; SOUZA, E. S. **TopoSlicer**. Depositante: Universidade Federal de Pernambuco. Brasil, BR512018001308-2, 30 de julho de 2018.

2. Depósito de Patente: Dispositivos híbridos com aplicações forenses

Patente que propõe a síntese de compostos híbridos (complexos de lantanídeos suportados em sílica mesoporosa - MCM-48), produção de fluido imprimível dos compostos híbridos sintetizados e impressão de dispositivos de segurança com possíveis aplicações forenses.

ALVES JR, S.; AZEVEDO, L. A.; RUIZ-CRESPO, A. G.; LUZ, L. L.; QUEIROZ, R. S.; FERRO, J. N. S.; SILVA, C. S.; SANTA-CRUZ, P. A.; BARRETO, E. O. **Dispositivos híbridos com aplicações forenses: Biocompatíveis, multi estímulos, luminescentes, reversíveis e instantâneos**. Depositante: Universidade Federal de Pernambuco e Universidade Federal de Alagoas. BR 10 2019000916 0. Depósito: 16 jan. 2019.

3. Depósito de Patente: Recobrimento imprimível híbrido de material bioativo com inibição estrutural de formação de placa bacteriana

Patente que propõe a produção de um recobrimento funcional híbrido que atua como dispositivo antibacteriano imprimível. Ele é caracterizado por ter uma parte biologicamente ativa, composta de nanoestruturas metálicas contidas no fluido de impressão, com parte passiva, formada por microtextura impressa a partir do mesmo fluido, inibindo a formação de biofilme pela redução da adesão de bactérias à superfície na qual atua.

SANTA-CRUZ, P. A.; PAREDES, N. E. B.; ZAMBRANO, L. A. G.; SOUZA, E. S.; MAIER-QUEIROZ, R.; **Recobrimento imprimível híbrido de material bioativo com inibição estrutural de formação de placa bacteriana**. Depositante: Universidade Federal de Pernambuco. BR 10 2019 014838 1. Depósito: 18 jul. 2019.

APÊNDICE C - CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DE IMPRESSÃO DO FLUIDO PREPARADO

Com base nos valores de viscosidade, tensão superficial e densidade para o etanol e o etileno glicol (tabela 4) os cálculos dos valores dessas propriedades físicas para a mistura utilizada como fluido de impressão (etanol: etileno glicol 95:5) são detalhados abaixo. Nesses cálculos, a influência do PVB nas propriedades físicas do etanol não foi considerada pelo fato de que apesar do PVB contribuir para o aumento da viscosidade do etanol, a quantidade de polímero utilizada em relação ao solvente foi muito pequena, apenas 0,7%.

Viscosidade da solução

Para a solução etanol/etilenoglicol (95:5)

$$\eta = \text{Viscosidade} = \eta_{\text{solução}}$$

$$\eta_{\text{solução}} = \% (\text{etanol}) \times \eta_{\text{etanol}} + \% (\text{etilenoglicol}) \times \eta_{\text{etilenoglicol}}$$

$$\eta_{\text{solução}} = (0,95 \times 1,095 \times 10^{-3}) + (0,05 \times 16,2 \times 10^{-3})$$

$$\eta_{\text{solução}} = (1,04025 \times 10^{-3}) + (0,81 \times 10^{-3})$$

$$\eta_{\text{solução}} = 1,85 \times 10^{-3} \text{ Pa.s ou } 1,85 \text{ cP}$$

Tensão superficial da solução

$$\gamma = \text{tensão superficial} = \gamma_{\text{solução}}$$

$$\gamma_{\text{solução}} = (\% \text{ etanol} \times \gamma_{\text{etanol}}) + (\% \text{ etilenoglicol} \times \gamma_{\text{etilenoglicol}})$$

$$\gamma_{\text{solução}} = (0,95 \times 0,0223) + (0,05 \times 0,0477)$$

$$\gamma_{\text{solução}} = 0,021185 + 0,002385$$

$$\gamma_{\text{solução}} = 0,02357 \text{ N.m}^{-1} \text{ ou } 23.57 \text{ dyn.cm}^{-1}$$

Densidade da solução

$$\rho = \text{Densidade} = \rho_{\text{solução}}$$

$$\rho_{\text{solução}} = (\% \text{ etanol} \times \rho_{\text{etanol}}) + (\% \text{ etilenoglicol} \times \rho_{\text{etilenoglicol}})$$

$$\rho_{\text{solução}} = (0,95 \times 0,789 \times 10^3) + (0,05 \times 1,11 \times 10^3)$$

$$\rho_{\text{solução}} = (0,794 + 0,055) \times 10^3$$

$$\rho_{\text{solução}} = \mathbf{0,80505 \times 10^3 \text{ kg.m}^{-3} \text{ ou } 0,80505 \text{ g.cm}^{-3}}$$

A velocidade mínima de ejeção foi calculada considerando o diâmetro dos bicos de impressão de 1pL da *Dimatix Materials Printer*, que correspondem a $0,9 \times 10^{-5} \text{ m}$.

$$v_{\min} = \left(\frac{4\gamma}{\rho a} \right)^{1/2}$$

v = velocidade de ejeção das gotas

a = diâmetro do bico de impressão

γ = tensão superficial do fluido

$$v_{\min} = \sqrt{\frac{4 \times 0,02357}{0,80505 \times 10^3 \times 0,9 \times 10^{-5}}} = 3,607 \text{ m.s}^{-1}$$

A partir do valor da velocidade mínima de impressão, os coeficientes de Re , We e Oh foram calculados:

- Reynolds:

$$Re = \frac{v \rho a}{\eta}$$

v = velocidade de ejeção das gotas

ρ = densidade do fluido

a = diâmetro do bico de impressão

η = viscosidade do fluido

$$Re = \frac{3,607 \times 0,80505 \times 10^3 \times 0,9 \times 10^{-5}}{0,00185} = 14,12$$

- Weber:

$$We = \frac{v^2 \rho a}{\gamma}$$

v = velocidade de ejeção das gotas

ρ = densidade do fluido

a = diâmetro do bico de impressão

γ = tensão superficial do fluido

$$We = \frac{(3,607)^2 \times 0,80505 \times 10^3 \times 0,9 \times 10^{-5}}{0,02357} = 3,99$$

- Ohnesorge:

$$Oh = \frac{\sqrt{We}}{Re}$$

$$Oh = \frac{\sqrt{3,99}}{14,12} = 0,1416$$

A partir do coeficiente de Ohnesorge o valor de Z foi calculado para verificar se o fluido que foi preparado se encontra dentro das condições de imprimibilidade.

$$Z = \frac{1}{Oh} = \frac{1}{0,1416} = 7,06$$

Como 7,06 encontra-se entre 1 e 10, trata-se de um fluido imprimível.