

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

SUELEN PIETROBON FACCHI

NOVOS REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS PRODUZIDOS VIA LAYER-BY-LAYER INIBEM À FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS

DISSERTAÇÃO

LONDRINA

2021

SUELEN PIETROBON FACCHI

NOVOS REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS PRODUZIDOS VIA LAYER-BY-LAYER INIBEM À FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS

NOVEL POLYMER COATINGS PREPARED VIA LAYER-BY-LAYER INHIBIT THE FORMATION OF MICROBIAL BIOFILMS

Trabalho de conclusão de curso de Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins

LONDRINA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Londrina



SUELEN PIETROBON FACCHI

**NOVOS REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS PRODUZIDOS VIA LAYER-BY-LAYER INIBEM A
FORMAÇÃO DE BIOFILMES MICROBIANOS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Engenharia Ambiental.

Data de aprovação: 24 de Fevereiro de 2021

Prof Alessandro Francisco Martins, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Elton Guntendorfer Bonafe, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Oscar De Oliveira Santos Junior, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 24/02/2021.

Dedico...

A **Deus**, por ser a essência da minha vida, aos meus pais Nelson (*in memoriam*) e Sueli, e ao meu esposo Alessandro, que de forma especial e carinhosa me deram forças, coragem e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus** que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes dois anos como mestranda, mas que, em todos os momentos. É o maior mestre que alguém pode conhecer. A ele toda honra e toda glória para sempre. A Nossa Senhora que me ensinou a ser obediente e paciente.

Aos meus pais Nelson Antônio Facchi (*in memoriam*) e Sueli Pietrobon Facchi, que desistiram dos seus sonhos pelos meus sonhos. Obrigada por todo carinho e apoio que sempre me deram, sempre me fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Aos meus irmãos, principalmente minha irmã, pelo incentivo e apoio. Ao meu esposo Alessandro Francisco Martins, obrigado pelo incentivo, carinho, paciência e por me trazer paz na correria da vida. Essa vitória também é sua.

À meu orientador Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins pela paciência, dedicação, incentivo e sabedoria que muito me auxiliou para que meu trabalho fosse finalizado da melhor maneira possível.

A todos os professores, agradeço por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade no processo profissional, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. Particularmente aos constituintes da banca examinada, professor Dr. Elton Gurtendorfer Bonafé e professor Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior, pela imensa ajuda na construção do presente estudo. Os quais tenho o imenso respeito, Deus os abençoe.

Agradeço também a CAPES, pelo apoio financeiro, que foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho e por acreditar no potencial desse estudo.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, em especial ao Laboratório de Materiais Macromoléculas e Compósitos, ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, a Colorado State University pelo desenvolvimento da pesquisa e ao LAMAP.

Aos meus amigos e colegas, pelos incentivos, pelo apoio, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas.

Meus sinceros agradecimentos!

*“Aprendizado é aquilo que fica
após esquecermos o que nos foi
ensinado”.*

ALBERT EINSTEIN

RESUMO

FACCHI, Suelen Pietrobon. **Novos revestimentos poliméricos produzidos via Layer-by-layer inibem à formação de biofilmes microbianos**, 2021. 64 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2021.

Adesão bacteriana e formação de biofilme são questões significativas associadas às infecções microbianas. Materiais com propriedades antiadesivas e antimicrobianas são requeridos em aplicações tecnológicas, tais como em desinfecção de água potável, embalagens de alimentos e dispositivos biomédicos. Porém, tem sido um desafio preparar revestimentos duráveis com capacidade para prevenir o desenvolvimento de biofilmes microbianos. Nesse sentido, esse estudo mostra pela primeira vez a produção de novos revestimentos poliméricos com potencial antiadesivo e antimicrobiano. Para isso, um derivado de tanino condensado (material amino-funcionalizado catiônico) foi associado com polissacarídeos aniônicos (pectina e *iota*-carragena) para criar multicamadas de polieletrólitos (PEMs) via técnica layer-by-layer (deposição de camada sobre camada). Os PEMs foram preparados a partir da deposição de camadas poliméricas sobre um substrato de vidro oxidado. A deposição do polycation (tanino modificado), seguida da deposição do poliânion (pectina ou *iota*-carragena), seguiu-se até alcançar 5 ou 15 camadas de deposição. Os PEMs foram caracterizados por espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier (FT-SPR), microscopia de força atômica e medidas de ângulo de contato. Comparado ao substrato de vidro nativo (material não oxidado), todos os PEMs apresentaram rugosidade e superfície hidrofílica. Um teste de estabilidade realizado em tampão fosfato (PBS, pH 7,4) confirmou que os PEMs fabricados com 15 camadas foram duráveis por até 7 dias de contato com o meio aquoso. Testes de adesão e proliferação contra *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) mostraram que as PEMs com 15 camadas exibem atividade antiadesiva e bactericida após 6 e 24 h de ensaio. O teste antimicrobiano *in vitro* indicou que as PEMs podem matar e impedir a adesão e proliferação de bactérias significativamente, especialmente durante a exposição inicial nas primeiras 6 h de contato.

Quando comparado com amostras controle (filmes de poliestireno), os resultados indicam que os revestimentos poliméricos inibem à formação de biofilme microbiano significativamente. Portanto, sugere-se que as PEMs podem ser aplicadas como revestimentos de filtros evitando bioincrustação em água potável, embalagens e revestimentos hospitalares para prevenir a contaminação microbiana.

Palavras-chave: Adesão microbiana; Polieletrólitos; Amino-funcionalizado.

ABSTRACT

FACCHI, Suelen Pietrobon. **Novel polymer coatings prepared via Layer-by-Layer inhibit the formation of microbial biofilms**, 2021. 64 f. Dissertation (master's in environmental engineering) - Federal Technological University of Paraná. Londrina, 2021.

Bacterial adhesion and biofilm formation are significant issues associated with microbial infections. Materials with anti-adhesive and antimicrobial properties are required in technological applications, such as in disinfection of drinking water, food packaging and biomedical devices. However, it has been a challenge to prepare durable coatings capable of preventing the development of microbial biofilms. In this sense, this study shows for the first time the production of new polymeric coatings with anti-adhesive and antimicrobial potential. For this, a condensed tannin derivative (cationic amino-functionalized material) was associated with anionic polysaccharides (pectin and iota-carrageenan) to create multilayered polyelectrolytes (PEMs) via layer-by-layer technique. PEMs were prepared from the deposition of polymeric layers on an oxidized glass substrate. The deposition of the polycation (modified tannin), followed by the deposition of the polyanion (pectin or *iota-carrageenan*), followed until reaching 5 or 15 deposition layers. PEMs were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), *in-situ* Fourier transform surface plasmon resonance (FT-SPR), atomic force microscopy and contact angle measurements. Compared to the native glass substrate (non-oxidized material), all PEMs showed roughness and hydrophilic surface. A stability test carried out in phosphate buffer (PBS, pH 7.4) confirmed that PEMs manufactured with 15 layers were durable for up to 7 days of contact with the aqueous medium. Adhesion and proliferation tests against *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) showed that PEMs with 15 layers exhibit anti-adhesive and bactericidal activity after 6 and 24 hours of testing. The *in vitro* antimicrobial test indicated that PEMs can significantly kill and prevent the binding and proliferation of bacteria, especially during initial exposure within the first 6 hours of contact. When compared to control samples (polystyrene films), the results indicate that the polymeric coatings significantly inhibit the formation of microbial biofilm. Therefore, it is

suggested that PEMs can be applied as filter coatings avoiding bio-encrustation in drinking water, packaging and coatings in hospitals to prevent microbial contamination.

Keywords: Microbial adhesion; Polyelectrolyte; Amino-functionalized.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positiva (a) e Gram-negativa (b) | 14 |
| Figura 2- Estrutura da parede celular de bactérias do grupo Gram-positiva, com o arranjo do ácido teicoico. | 15 |
| Figura 3 - Estrutura completa da membrana celular de bactérias do grupo Gram-negativa (a). Micrografia eletrônica de transmissão de <i>E. coli</i> indicando a membrana citoplasmática e a parede celular (b). Modelo molecular de proteína do tipo porina (c). | 16 |
| Figura 4 - Características estruturais da parede celular de Gram-positiva, Gram-negativa e Micobactéria. Onde; PG: peptidoglicano, PM: membrana plasmática, LPS: lipopolissacarídeo, MM: minhocamembrana, OM: membrana externa, AG: arabinogalactano. | 17 |
| Figura 5 - Esquema de montagem/deposição/adsorção de multicamadas PEMs sobre um substrato sólido carregado negativamente. | 20 |
| Figura 6 - Estrutura geral do derivado catiônico de tanino condensados (TN). | 21 |
| Figura 7 - Representação esquemática da estrutura da iota-carragena. | 23 |
| Figura 8 - Representação esquemática da estrutura complexa da pectina. AG = arabinogalactano; HG = homogalacturonano; RG = ramnogalacturonano; XG = xilogalacturonano. | 24 |
| Figura 9 - Estrutura do ácido D-galacturônico (HG) ligados por ligações $\alpha(1 \rightarrow 4)$ na estrutura química da pectina. | 24 |
| Figura 10 - Ilustração esquemática do processo de fabricação das PEMs, representando a deposição de 2 camadas de PEMs sobre um substrato (8,0 mm). As soluções são | |

| | |
|---|--------------------------------------|
| depositadas sobre o substrato de vidro oxidado durante 6,0 min de agitação e, então, removidas (aspiradas)..... | Erro! Indicador não definido. |
| Figura 11 - Estruturas químicas do derivado de tanino catiônico (A) e taninos hidrolisados com base em moléculas de ácido gálico esterificadas com frações D-glicose (B). | 29 |
| Figura 12 - Espectro XPS do TN obtido após o processo de purificação. Levantamento e espectros XPS de alta resolução para envelopes C1, O1s e N1s..... | 30 |
| Figura 13 - Pesquise os espectros de XPS do TN: antes da purificação (A) e após a purificação (B)..... | 31 |
| Figura 14 - Estruturas de ressonância do TN catiônico..... | 32 |
| Figura 15 - Espectros XPS (survey) das PEMs preparadas com 5 camadas. | 33 |
| Figura 16 - Espectros XPS (survey) das PEMs preparadas com 15 camadas. | 34 |
| Figura 17 - Espectros XPS de alta resolução dos envelopes C1s, O1s e N1s obtidas das PEMs com 15 camadas..... | 35 |
| Figura 18 - Cinética representativa da montagem PEM de 5 camadas de FT-SPR in situ (b). As setas representam o início das etapas de enxágue com água acidificada (azul), adsorção de TN de poliacetato (verde) e adsorção de polianilina PC (vermelho). | 39 |
| Figura 19 - Imagens topográficas AFM de 5,0 $\mu\text{m} \times 5,0 \mu\text{m}$ representativas dos PEMs tiradas em PBS: (A) amostras com imagem após a exposição de PBS (pH 7,4) (1 dia) e (B) amostras com imagem após 7 dias em PBS (pH 7,4)..... | 40 |
| Figura 20 - Imagem AFM do substrato de vidro nativo (não oxidado). | 40 |
| Figura 21 - Espectros de XPS dos PEMs segundo o teste de estabilidade (ST = teste de estabilidade)..... | 42 |
| Figura 22 - Imagens de SEM dos PEMs e PS incubados com <i>P. aeruginosa</i> por 6h e 24h a 37°C. (CA = iota-carragenina, PC = pectina, TN = derivado de tanino e PS de controle = poliestireno de cultura de tecido). | 46 |
| Figura 23 - Imagens de SEM dos PEMs e PS incubados com <i>S. aureus</i> por 6h e 24h a 37°C. (CA = iota-carragenina, PC = pectina, TN = derivado de tanino e PS de controle = poliestireno de cultura de tecido). | 46 |
| Figura 24 - Imagens de SEM dos PEMs e PS incubados com <i>S. aureus</i> por 6h e 24h a 37°C. (CA = iota-carragenina, PC = pectina, TN = derivado de tanino e PS de controle = poliestireno de cultura de tecido). | 47 |

Figura 25 - Imagens de SEM dos PEMs e PS incubados com *P. aeruginosa* por 6h e 24h a 37°C. (CA = iota-carragenina, PC = pectina, TN = derivado de tanino e PS de controle = poliestireno de cultura de tecido). 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagens relativas de grupos químicos e razão N/C=O na estrutura TN determinada por análise XPS..... 32

Tabela 2 - Rugosidade Rq (nm) das superfícies PEMs. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3 - Os conteúdos atômicos relativos (S2p, C1s, N1s e O1s) determinados a partir das áreas de pico em cada espectro de XPS adquiridos antes (Fig. 15) e após (Fig. 20) o ensaio de estabilidade realizado em PBS por 7 dias..... 43

Tabela 4 - Número de células bacterianas com integridade normal aderidas por cm² nas superfícies das PEMs e PS determinado após 6 e 24h de contato..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------|---|
| AFM | Microscopia de força atômica |
| ANOVA | Analysis of Variance (Análise de variância) |
| CA | <i>Iota-carragena</i> |
| CaF₂ | Diflureto de cálcio |
| Caldo LB | Caldo Luria Bertani, Miller |
| CSU | Colorado State University |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ETA | Estação de tratamento de água |
| FT-SPR | Ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier |
| HAAs | Ácidos haloacéticos |
| kV | Kilovolt |
| kDa | Quilo Dalton |
| KDa | Unidade de massa atômica |
| LbL | Camada a camada |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| MMA | Ministério do Meio Ambiente |
| N_{2(g)} | Gás nitrogênio |
| Nm⁻¹ | Newton por metro |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| ONU | Organização das Nações Unidas |
| THMs | Tri-halometanos |
| TN | Tanfloc |
| <i>P. aeruginosa</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| PBS | Solução tampão de fosfato |
| PC | Pectina |
| PEMs | Multicamadas de polieletrólitos |
| PS | poliestireno para cultura de tecidos |
| pKa | Constante acida (-log) |
| rpm | Rotação por minuto |

| | |
|------------------|---|
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| SEM | Microscopia eletrônica de varredura |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| UNICEF | Fundo das Nações Unidas para a Infância |
| W | Watts |
| WCAs | Ângulo de contato |
| XPS | Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X |
| μl | Microlitro |
| μm | Micrometro |

Sumário

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 7 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 9 |
| 2.1 TRATAMENTO CONVENCIONAL DA ÁGUA..... | 9 |
| 2.2 BIOFILMES BACTERIANOS..... | 11 |
| 2.3 ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR BACTERIANA..... | 12 |
| 2.4 MATERIAIS PARA FILTRAÇÃO..... | 17 |
| 2.5 A TÉCNICA LAYER-BY-LAYER..... | 19 |
| 2.6. POLIELETRÓLITOS..... | 20 |
| 2.6.1. <i>Tanfloc</i> | 20 |
| 2.5.2 <i>Iota-carragena</i> | 22 |
| 2.5.3 <i>Pectina</i> | 23 |
| 3. OBJETIVOS..... | 25 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 25 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 25 |
| 4. METODOLOGIA..... | 26 |
| 4.1 MATERIAIS..... | 26 |
| 4.2 PURIFICAÇÃO DO TANFLOC..... | 26 |
| 4.3 PREPARAÇÃO DAS MULTICAMADA DE POLIELETRÓLITOS..... | 26 |
| 4.4 CARACTERIZAÇÃO..... | 28 |
| 4.4.1 <i>Espectroscopia de fotoelétrons de raio-X</i> | 28 |
| 4.4.2 <i>Medidas de ângulo de contato</i> | 29 |
| 4.4.3 <i>Ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier (FT-SPR)</i> | 29 |
| 4.4.4 <i>Microscopia de força atômica (AFM)</i> | 30 |
| 4.5 ESTABILIDADE DAS PEMS EM TAMPÃO PBS (PH 7,4)..... | 30 |
| 4.6 ENSAIOS DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE BACTÉRIAS NAS PEMS..... | 30 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 31 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 29 |
| 5.1 <i>Caracterização do derivado de tanino amino-funcionalizado</i> | 29 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PEMS..... | 32 |
| 5.2.1 <i>Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)</i> | 32 |
| 5.2.2 <i>Medidas de ângulo de contato (WCAs)</i> | 36 |
| 5.2.3 <i>Ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier (FT-SPR)</i> | 38 |
| 5.2.4 <i>Microscopia de força atômica (AFM)</i> | 39 |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PEMS APÓS O TESTE DE ESTABILIDADE REALIZADO EM PBS (7 DIAS)..... | 41 |
| 5.4 ADESÃO INICIAL DE BACTÉRIAS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 43 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 51 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 52 |

1. INTRODUÇÃO

O anseio por água de qualidade que satisfaça uma demanda populacional tem aumentado. Devido à elevada demanda por água potável, os recursos hídricos estão sofrendo impactos pelo uso inadequado e insustentável. A redução na qualidade da água, nos coloca em alerta, uma vez que, ambientes aquáticos estão sendo contaminados por microrganismos muito deles com potenciais patogênicos. Esse efeito inviabiliza o seu consumo.

De acordo com as Nações Unidas Brasil (Água | ONU Brasil, 2019), as águas superficiais e subterrâneas estão constantemente sendo contaminados por despejos de esgotos. A Fundação das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), afirma que mais de 2 bilhões da população não possuem acesso à água potável e saneamento básico (UNICEF, 2017). Portanto, muitas pessoas acabam consumindo água contaminada por resíduos fecais (UNICEF, 2017). O resultado da contaminação dos cursos d'água induz patógenos infecciosos e infectocontagiosos, que foram e são responsáveis por ocasionarem graves doenças, entre elas a Febre Tifoide (causada por *Salmonella typh*), Cólera (provocada pela bactéria *Vibrio cholerae*) e a Tifo (causada pelo gênero bacteriano *Rickettsia*) (MCGINNIS et al., 2018).

Atualmente, busca-se o desenvolvimento de novos métodos e produtos que promovam a desinfecção de sistemas aquáticos. O processo de filtração com auxílio de membranas é uma tecnologia que pode ser empregada em microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa, sendo uma estratégia utilizada no tratamento de água potável (TANG et al., 2015). Essas abordagens de filtração são populares no tratamento de água devido ao seu baixo custo e eficiência na eliminação de microrganismos patogênicos (TANG et al., 2013). Porém o desenvolvimento de filtros duráveis com atividade antimicrobiana continua sendo um desafio. As membranas apresentam limitações, pois à formação de bioincrustação (acúmulo de microrganismos sobre suas estruturas), estrutura conhecida como biofilme (HERZBERG; ELIMELECH, 2007 ; HUANG et al., 2009).

Com finalidade de alterar a química de superfície de filtros e substratos sólidos, inúmeras técnicas estão sendo aplicadas para evitar a ocorrência de agentes antibioincrustantes (TANG et al., 2013), incluindo a oxidação por plasma (CERCHIER et

al., 2018), uso de tintas anti-incrustantes com agentes biocidas, tais como irgarol, diclofluanida e diuron (VIANA et al., 2019), uso de luz ultravioleta/ozônio, processos químicos de oxidação com peróxido de hidrogênio e persulfato de sódio, uso de membranas fibrosas à base de polietilenoimina (polímero bactericida) (MAZIYA et al., 2020) e membranas compósitas contendo íons prata (Ag^+) e nanopartículas de prata com atividade antimicrobiana (ZHU et al., 2018).

A técnica de deposição de camada sobre camada (layer-by-layer) promove à formação de filmes finos sobre superfícies de materiais sólidos através da deposição/adsorção de monocamadas de materiais poliméricos (polieletrólitos em solução). A abordagem layer-by-layer é simples, versátil e usada para criar novos revestimentos em diversos tipos de materiais (em nanotubos de titânio (SABINO et al., 2020), vidro (MARTINS, A. F. et al., 2020a), plásticos (poliestireno e politereftalato de etileno) (FOLLMANN et al., 2012) e outros. As PEMs podem ser desenvolvidas sobre substratos sólidos para impedir a fixação bacteriana e formação de biofilme, evitando a ocorrência de infecções microbianas (HEDAYATI et al., 2019). Revestimentos por PEMs estão sendo aplicados em filtros (para evitar bioincrustação em água), plásticos e embalagens alimentícias (para agregar maior tempo de prateleira aos alimentos embalados), dispositivos biomédicos para evitar infecções em ambientes hospitalares para inibir a proliferação de bactérias em implantes (HEDAYATI et al., 2019).

Vários estudos relatam o uso de PEMs à base de quitosana como revestimentos adequados para prevenir a deposição bacteriana e fornecer características bactericidas. A quitosana e seus derivados *N*-quaternizados são polissacarídeos catiônicos com propriedades antimicrobianas bem conhecidas (MARTINS et al., 2014). Grupos catiônicos podem interagir com o envelope microbiano carregado negativamente, causando a morte de bactérias (MARTINS et al., 2014). Revestimentos antimicrobianos e antiadesivos foram produzidos pela técnica layer-by-layer, ou seja, pela automontagem de quitosana e seus derivados catiônicos (policátions) com poliânions, tais como heparina (FOLLMANN et al., 2012 ; FU et al., 2005), ácido hialurônico (DA CÂMARA et al., 2019), pectina (BRASIL et al., 2012), carragena (MARTINS, A. F. et al., 2020b), ácido tânico (PRANANTYO et al., 2018) e outros polímeros aniônicos.

PEMs à base de quitosana demonstraram propriedades antimicrobianas e antiadesivas contra *Escherichia coli* (*E. coli*) (FOLLMANN et al., 2012 ; FU et al., 2005), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (PRANANTYO et al., 2018) e *Pseudomonas*

aeruginosa (*P. aeruginosa*) (HERNANDEZ-MONTELONGO et al., 2016). No entanto, os revestimentos à base de quitosana não têm sido eficazes para promoverem ação antimicrobiana nos estágios iniciais de aplicação (MARTINS, A. F. et al., 2020b).

Neste presente estudo, mostra-se que um derivado de tanino condensado (TN), o qual é catiônico, e pode substituir a quitosana para desenvolver revestimentos antimicrobianos mais eficazes a partir da técnica layer-by-layer. O TN é sintetizado a partir de taninos condensados, na presença de cloreto de amônio e ácido fórmico (FACCHI et al., 2017a). Os polifenóis (como o ácido tânico e taninos condensados), bem como os polímeros contendo grupos de sal de amônio em suas estruturas, têm características bactericidas bem conhecidas (MARTINS et al., 2014; GUIL-GUERRERO et al., 2016). Portanto, o TN pode promover um papel duplo porque apresenta porções catiônicas e polifenólicas em sua estrutura. Então, pela primeira vez, associou-se o TN com *iota*-carragena (CA) e com pectina (PC), para preparar PEMs com excelentes propriedades antimicrobianas e anti-incrustantes (antiadesivas).

PEMs hidrofílicas, bactericidas e antiadesivas foram preparadas via layer-by-layer através da deposição de monocamadas de TN e polissacarídeos aniônicos (PC e CA) na superfície de vidro oxidado. Os PEMs foram preparados a partir de soluções de polieletrólitos preparadas em um tampão aquoso diluído de ácido acético-acetato (pH 5,0). Essa condição de pH levemente ácida foi escolhida porque produz PEMs citocompatíveis (DA CÂMARA et al., 2019), ou seja, a condição de pH não induz citotoxicidade. As PEMs foram caracterizadas por espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS), ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier (FT-SPR), microscopia de força atômica (AFM), medidas de ângulo de contato e testes de estabilidade. Os estudos demonstram que as PEMs à base de TN têm excelentes propriedades antimicrobianas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TRATAMENTO CONVENCIONAL DA ÁGUA

A água é essencial para a vida humana. Segundo informações da Organizações das Nações Unidas Brasil, aproximadamente 35 milhões de km³ no planeta Terra estão

recobertos por água doce (Água | ONU Brasil, 2019). Destas, somente 0,3% estão disponíveis para o consumo humano, o restante está retido em geleiras, topos de montanhas e solo. De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (MMA), o Brasil abriga cerca de 13,7% da água potável disponível no planeta (Água, 2019). Porém, em algumas regiões, a qualidade da água destinada para o consumo humano é inviável, encontrando-se contaminada por microrganismos provenientes de fezes (COSTA et al., 2013).

Os critérios de potabilidade da água para consumo humano, devem atender os padrões microbiológicos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), anualmente no Brasil, mais de 300 crianças morrem por ingestão de águas contaminadas por microrganismos patogênicos. Além disso, corpos d'água contaminados são diretamente associados ao surgimento de doenças endêmicas, como por exemplo, a cólera, disenteria, hepatite A, febre tifoide, e outras.

Atualmente, tem-se conhecimento da desinfecção de água potável por meio do uso de cloro, que age nas células bacterianas, mais precisamente na parede celular, afetando estruturas vitais da célula, como enzimas, proteínas e ácidos nucleicos (PEREIRA KECHINSKI, 2007; TANG et al., 2013). A Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, afirma que o uso de cloro no tratamento de água, não coloca em situação de risco a população (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). É mencionado que o padrão de potabilidade da água apresenta:

Art. 34. A obrigatoriedade da manutenção de, no mínimo, 0,2 mg/L de cloro residual livre ou de 0,2 mg/L de dióxido de cloro em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede).

No entanto, a cloração em Estação de Tratamento de Água (ETA) com presença de matéria orgânica pode promover à formação de subprodutos, como tri-halometanos (THMs), ácidos haloacéticos (HAAs), haloacetonitrilos e outros (SIDDIQUI; 2004 ; ZHOU et al., 2016; KIM et al., 2003; CARRA et al., 2020). Os THMs, tais como clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio são reconhecidos como agentes cancerígenos, sendo uma ameaça grave a saúde humana. A Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde, determina que o limite de THMs não deve transpor 0,01 mg/L. A longo prazo, os THMs são responsáveis pelo surgimento de câncer no cólon e bexiga e, ainda, prejudica o desenvolvimento e promove danos ao sistema reprodutivo (TSAGKARI; SLOAN, 2019).

O ozônio também é usado para eliminar microrganismos patogênicos de sistemas aquosos. O ozônio causa a ruptura da membrana bacteriana, suspendendo as funções do sistema celular de bactérias mesmo em concentração baixa de 0,1 mg/L, oxidando os componentes vitais das células (PEREIRA KECHINSKI, 2007). A legislação brasileira, portaria 3.214/78 libera limites de ozônio de até 0,08 mg/L durante 48 h de aplicação. Já na Europa, o limite de ozônio não pode ultrapassar 0,15 mg/L. Nos Estados Unidos essa taxa cai para 0,1 mg/L a cada 8 h (KHADRE; YOUSEF, 2001).

A utilização do ozônio trás desvantagem e risco a saúde humana (WANG; CHEN, 2009). O ozônio em água na presença de compostos orgânicos pode levar à formação de íon bromato e bromofórmio, agentes carcinogênicos (WANG; CHEN, 2020; WANG et al., 2020; DA CÂMARA et al., 2019). Por essa razão, pesquisadores buscam o desenvolvimento de métodos alternativos, que sejam eficientes no tratamento de águas destinadas para o consumo humano e mais vantajosos em relação aos métodos convencionais de tratamento.

2.2 BIOFILMES BACTERIANOS

Segundo (AIOLA et al., 2002) as bactérias se desenvolvem em qualquer tipo de superfície acontecendo a agregação das células, sendo capazes de produzir uma matriz polissacarídica intensamente hidratada, fazendo com que as células se envolvam, levando à formação de biofilme (AIOLA et al., 2002). O biofilme é uma colônia resistente de bactérias que promove proteção às bactérias contra fatores intrínsecos e extrínsecos (HOBOT, 2014). A formação de biofilme tem sido um problema para o setor industrial e doméstico, pois provoca bioincrustação em tubulações, obstruindo as mesmas devido ao crescimento de colônias bacterianas que muitas vezes são patogênicas. No campo da medicina, à formação de biofilme pode ser um risco direto aos pacientes principalmente aos pacientes intubados, onde os biofilmes podem se formar nas superfícies internas de tubos e dispositivos biomédicos (AIOLA et al., 2002).

A bioincrustação ou desenvolvimento de biofilme na superfície de membranas, é um dos principais desafios no processo de geração de materiais antiadesivos (TANG et al., 2013). Membranas empregadas em filtragem de efluentes e água residuais, podem ter depósitos de bactérias em suas superfícies. As bactérias depositadas formam substâncias

poliméricas extracelulares que consistem em carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, glicoproteínas e fosfolipídios (CHOI et al., 2020). Esses materiais extracelulares em contato com as superfícies das membranas microbianas que se multiplicam, levam à formação de biofilme (TANG et al., 2013). O desenvolvimento da bioincrustação em superfícies de filtros contamina a água potável. Isso diminui a vida útil da membrana filtrante e implica no tratamento e limpeza química frequente da água contaminada (KANG et al., 2004). A bioincrustação ocasiona perda de fluxo de água e potabilidade da mesma (PASMORE et al., 2001).

Biofilmes têm a tendência de serem resistentes contra ação de agentes biocidas, pelo fato dos microrganismos serem protegidos pela matriz de substâncias poliméricas extracelulares (TANG et al., 2013). Diversos trabalhos divulgam esforços para retardar a ocorrência de bioincrustação por meio do uso de cloro. Porém, o cloro nem sempre é eficiente no combate à formação da bioincrustação. É impossível inibir ou desativar o crescimento de microrganismos em águas efluentes, pois um número reduzido de microrganismos é suficiente para formar biofilme (KANG et al., 2004; TANG et al., 2015). A bioincrustação é difícil de combater, pois os microrganismos crescem, multiplicam e se realocam. Mesmo com remoção de 99,99% da bactérias de um ambiente qualquer, ainda aqueles microrganismos remanescentes podem formar biofilme (KANG et al., 2004). As estações de tratamento de água podem optar em utilizar uma concentração mais elevada de cloro para combater as bactérias em sistemas hídricos. Porém, maiores concentrações de cloro podem formar subprodutos como os THMs (substâncias cancerígenas) (ABOU TALEB et al., 2020).

2.3 ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR BACTERIANA

As bactérias são microrganismos que apresentam grande diversidade, passando de um milhão de espécies (KENNEDY, 1999). Esses microrganismos possuem organização celular simples, classificados como organismos procariotos (GOMES; JÚNIOR, 2013). As células das bactérias apresentam tamanho em diâmetro variando entre 0,2 a 10 μm e largura de cerca de 0,2 a 1,5 μm de comprimento (GOMES; JÚNIOR, 2013).

As bactérias são classificadas de acordo com a morfologia de parede celular, sendo no geral agrupadas em duas classes de acordo com a composição e estrutura da membrana

celular. Através da técnica de coloração (Coloração de Gram), pode-se identificar a classe que uma determinada bactéria pertence. Essa técnica é simples, rápida e de grande importância para a área de microbiologia (GOMES; JÚNIOR, 2013). Baseado na Coloração da Gram, as espécies de bactérias são divididas em Gram-positivas e Gram-negativas (SILHAVY et al., 2010). Essas classes se diferenciam de acordo com as propriedades químicas e morfológicas da parede celular da bactéria. O envelope celular bacteriano apresenta uma estrutura que é responsável pela forma, resistência mecânica e integridade da estrutura celular que protege contra danos químicos, físicos e biológico, evitando a lise osmótica (BROWN et al., 2020).

Praticamente todos os envelopes celulares, apresentam uma camada de parede celular de peptidoglicano, situada fora da membrana plasmática (ALLISON; LAMBERT, 2014). O polímero peptidoglicano é responsável por cerca de 90% da composição do envelope celular das bactérias Gram-positiva, e 10-20% das Gram-negativa (ALLISON; LAMBERT, 2014; MADIGAN, 2016). O peptidoglicano é um polissacarídeo composto de unidades de N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, unidas por ligações tetrapeptídeos à base de L-alanina, D-alanina e ácido D-glutâmico (MADIGAN, 2016). A biossíntese do peptidoglicano é impedida por antibióticos, resultando em um envelope celular altamente frágil. Esse efeito leva à morte celular devido à lise (JAP; WALIAN, 1996).

A Fig. 1 apresenta a estrutura geral do envelope microbiano de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. As bactérias Gram-positiva diferentemente das Gram-negativa, não possuem membrana externa; no entanto, apresentam uma camada de peptidoglicano mais espessa (Fig.1) (HUMPHRIES et al., 1981). A membrana externa funciona como uma barreira física permeável a solutos, limitando o acesso de compostos nocivos.

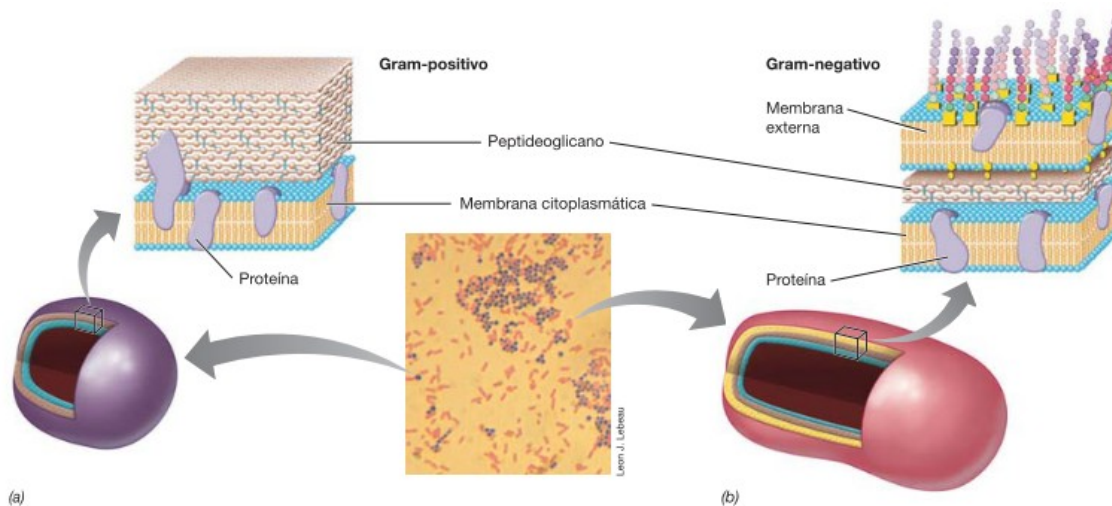


Figura 1- Estrutura da parede celular de bactérias Gram-positiva (a) e Gram-negativa (b)
Fonte: Microbiologia de Brock (2016).

De modo geral, as estruturas da membrana citoplasmática de Gram-negativa e Gram-positiva consistem em uma bicamada fosfolipídica (formadas por ésteres de glicerol, ácidos graxos, ácido fosfórico e álcoois) (MADIGAN, 2016). A membrana fosfolipídica atua como uma barreira física para a célula (Fig.1) (NGUYEN et al., 2015).

Os fosfolipídios são moléculas anfifílicas contendo componentes hidrofóbicos (caudas de ácidos graxos) e hidrofílicos (grupos glicerol-fosfato) (LI et al., 2015). Os fosfolipídios são aniônicos, e sua densidade de carga confere carga superficial negativa às paredes celulares das bactérias (LI et al., 2015; SMITH et al., 2017). Nas Gram-positivas, a densidade de carga negativa é conferida pelos grupos fosfato nas cadeias de ácido teicoico (ou ácido teichurônico), e nas Gram-negativas é devido à membrana externa conter fosfolipídios carregados negativamente (BATTESTIN et al., 2004).

A Fig. 2 apresenta a estrutura completa da parede celular de bactérias Gram-positivas. Na parede celular das Gram-positivas, o ácido teicoico corresponde 50% do envelope celular. Entretanto, em algumas espécies bacterianas, o ácido teicoico é substituído pelo ácido teichurônico (JAP; WALIAN., 1996). O ácido teicoico é identificado em bactérias Gram-positivas. O mesmo apresenta propriedades responsáveis pela virulência, pois facilita a adesão desses microrganismos às células hospedeiras, fixando a estrutura bacteriana na parede celular por autolisinas (BROWN et al., 2013).

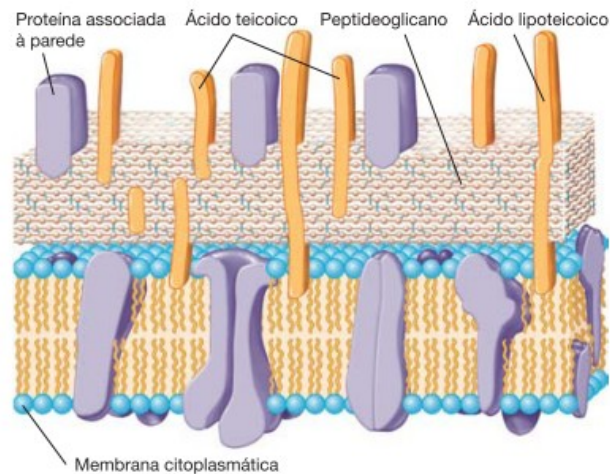


Figura 2-Estrutura da parede celular de bactérias do grupo Gram-positiva, com o arranjo do ácido teicoico.

Fonte: Microbiologia de Brock (2016).

A Fig. 3 apresenta a estrutura completa da membrana de uma bactéria Gram-negativa. As bactérias Gram-negativa apresentam envelope tripartido, constituído por uma membrana interna, uma membrana externa, onde que o espaço entre as duas membranas se encontra o periplasma que inclui o peptidoglicano e uma diversidade de proteínas como enzimas, e outras (Fig.1) (SPERANDEO et al., 2019).

A membrana externa está organizada com uma bicamada lipídica de formação irregular. Um dos componentes fundamentais do folheto externo é o lipopolissacarídeo (LPS) (lipoglicano e endotoxina), em conjunto com um glicolípido (encontrado nas membranas externas das bactérias Gram-negativa, com grande potencial inflamatório) (SPERANDEO et al., 2019). O glicolípido nomeado de lipídeo A, ampara o LPS na membrana externa. O LPS baseia-se em diferentes partes; lipídeo A (porção hidrofóbica e principal fator virulento), o antígeno O (polímero de carboidrato da superfície das células responsável pela proteção do microrganismo) e oligossacarídeo. O lipídeo A representa a endotoxina que pode provocar inúmeras patogenicidades graves (Allison; Lambert, 2014). A endotoxina produzida por *Salmonella* e *E. coli* transmitidas por meio de alimentos e água contaminada causam toxicidade provocando gases, diarreia e vômitos (MADIGAN, 2016).

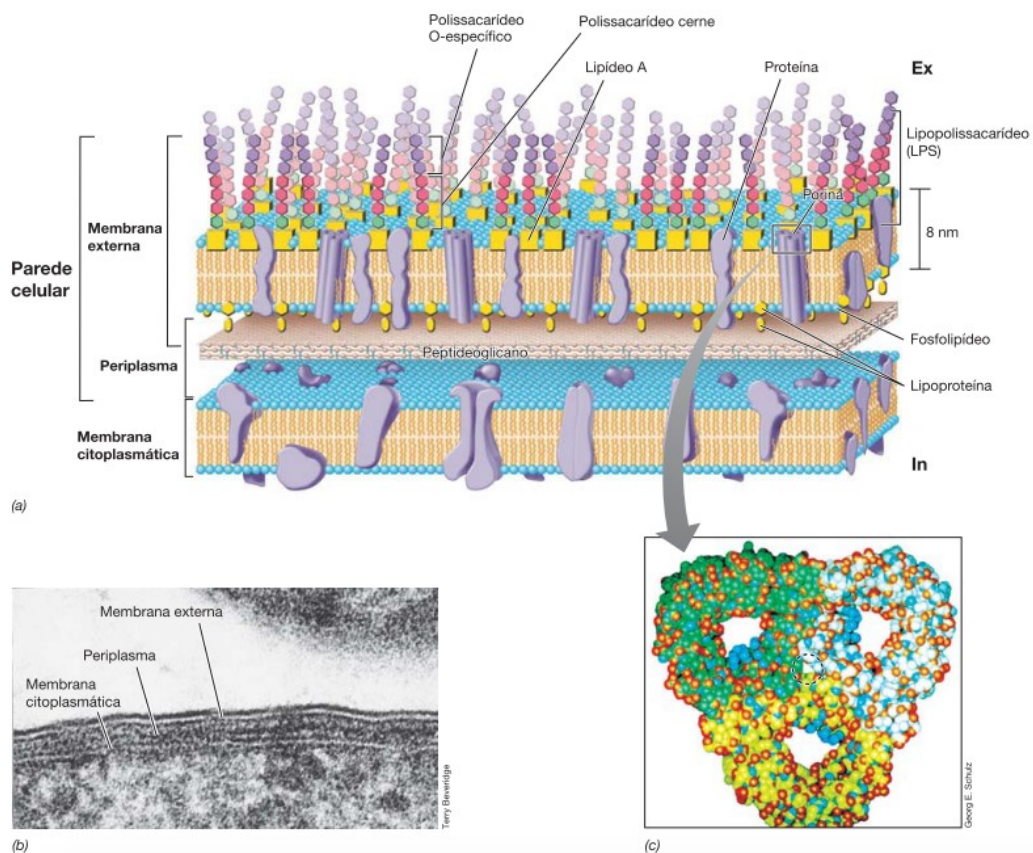


Figura 3 - Estrutura completa da membrana celular de bactérias do grupo Gram-negativa (a). Micrografia eletrônica de transmissão de *E. coli* indicando a membrana citoplasmática e a parede celular (b). Modelo molecular de proteína do tipo porina (c).

Fonte: Microbiologia de Brock (2016)

Jap e Walian relatam outro componente da membrana externa de relevância, denominado de porina (JAP; WALIAN, 1996). São materiais proteicos que situam entre o folheto externo e interno do envelope celular, e possuem caráter hidrofóbico. Além disso, as porinas apresentam um canal hidrofílico interno, que facilita a passagem de substâncias e macromoléculas (glicose, maltose, entre outras), para o interior da célula (JAP; WALIAN, 1996). A porina controla a entrada de solutos através de seus poros, sendo responsável pela permeabilidade da membrana externa (Fig.3).

Existe uma terceira classe de bactérias que apresentam estrutura da classe das Gram-negativas e da classe das Gram-positivas, denominada como Gram-indeterminada (BROWN et al., 2020). São evolutivamente semelhantes as bactérias Gram-positiva, no entanto, apresentam um arranjo morfológico similar a uma estrutura externa cerosa e impermeável (LEDERER, 1971). As Gram-indeterminadas também chamadas de Micobactérias possuem um peptidoglicano com espessura intermediária, ligada covalentemente a substâncias chamadas de arabinogalactanos ramificadas (AG) (Fig. 4).

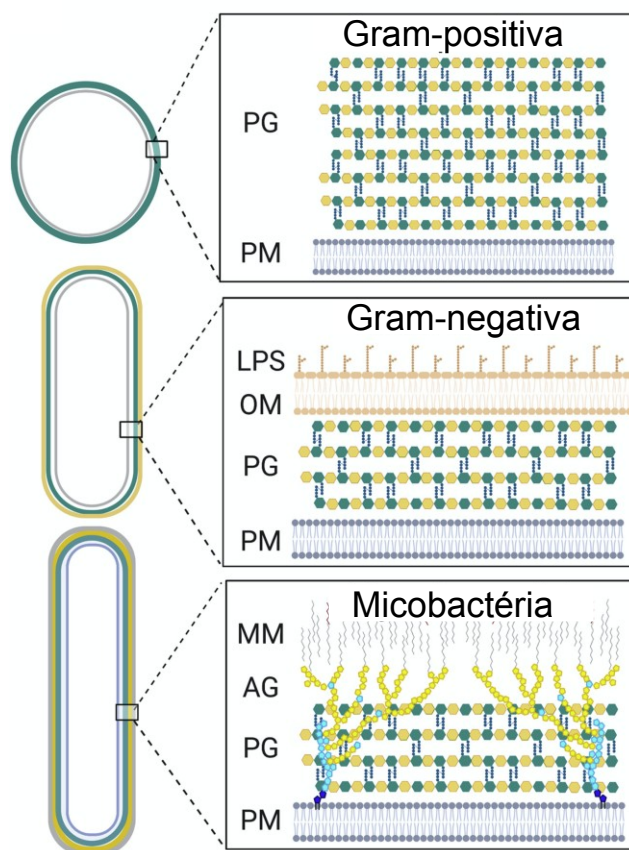


Figura 4 - Características estruturais da parede celular de Gram-positiva, Gram-negativa e Micobactéria. PG: peptidoglicano, PM: membrana plasmática, LPS: lipopolissacarídeo, MM: minhocamembrana, OM: membrana externa, AG: arabinogalactano.

Fonte: Alterado com permissão de Brown et al. (2020), (Elsevier).

O arabinogalactano atua como suporte para a membrana interna de ácidos micólicos. A membrana externa apresenta praticamente o dobro de ácidos micólicos, intercalados com glicolipídeos (DULBERGER et al., 2020). As três classes de bactérias possuem semelhanças na estrutura da parede celular (lipídio II) e diferenças (modificação lipídica). Essas modificações lipídicas contribuíram para a diferenciação das Gram-positivas, Gram-negativas e Micobactérias, e fornecem mecanismos que auxiliam na escolha da terapia antibiótica (BROWN et al., 2020).

2.4 MATERIAIS PARA FILTRAÇÃO

A separação de bactérias de sistemas aquosos pode ser processada por meio de centrífugas e filtros (LAM et al., 2019). Nas últimas décadas, a técnica de filtração tem sido amplamente aplicada no tratamento de água potável (LAM et al., 2019). Membranas de

filtração devem ser permeáveis, e possuem propriedades mecânicas adequadas para suportarem condições de alta pressão (LAU et al., 2012). Membranas filtros podem ser constituídas de um substrato poroso (suporte) que atua como base de sustentação mecânica para uma fina camada superior (revestimento). Essa camada de revestimento deve possibilitar a filtragem e, ainda induzir novas propriedades aos filtros, tais como atividade antimicrobiana e estabilidade (LAU et al., 2012).

Membranas eletrofiadas poliméricas (malhas) recebem destaque como material suporte para filtros. Essas malhas são altamente porosas e possuem uma excelente relação superfície/volume. Esse tipo de membrana pode proporcionar alta permeabilidade durante a filtragem da água, apresentando alto desempenho (RAMAKRISHNA et al., 2006; WANG et al., 2014).

A filtração realizada por meio de nanofibras é uma tecnologia reconhecida e dependendo do tipo de material polimérico empregado em sua confecção, auxilia na redução de contaminantes microbiológicos da água potável (KRYSTOSIAK et al., 2017). Um filtro nanocompósitos foi preparado através da associação de nanopartículas de prata (8%) e poliestireno. A membrana compósita apresentou atividade antibacteriana contra as espécies bacterianas *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae* em amostras de água (KRYSTOSIAK et al., 2017).

Outra abordagem para confecção de membranas filtros revestidos com camadas poliméricas se dá por meio da preparação de filmes finos usando a técnica layer-by-layer (WANG et al., 2014; SHEN et al., 2019; MA et al., 2014). O revestimento superficial deve proporcionar uma barreira hidrofílica para as membranas filtros, atuando como barreira anti-bioincrustação. Devido ao caráter hidrofóbico da parede celular das bactérias, estudos mostram que superfícies hidrofílicas devem suprimir a adesão de microrganismos na superfície dos filtros, evitando a formação de biofilme (MARTINS, A. F. et al., 2020b; DA CRUZ et al., 2020). O revestimento superficial (filmes fino) de substratos e filtros pode atribuir propriedade de anti-bioincrustação ao material final (TANG et al., 2015). Membranas modificadas com filmes finos a partir da deposição de camadas de polieletrólitos (PEMs) podem apresentar excelentes propriedades antimicrobianas. O revestimento deve aumentar a eficiência do processo de filtração, além de aumentar o tempo de vida útil do filtro. Por isso, esse estudo reporta pela primeira vez a produção de um novo revestimento hidrofílico via produção de PEMs. Sugerimos que esse tipo de revestimento pode ser usado em filtros destinados ao tratamento de água potável.

2.5 A TÉCNICA LAYER-BY-LAYER

A técnica camada por camada (layer-by-layer) é extensivamente aplicada no desenvolvimento de superfícies, filmes e membranas, pois se trata de um método simples e acessível (QIU et al., 2018). É um método multifuncional e prático para construir superfícies versáteis. A montagem layer-by-layer ocorre por meio da imersão intercalada de um substrato carregado positivamente ou negativamente em soluções de polieletrólitos. A deposição/adsorção de camadas de polieletrólitos (PEMs) na superfície de substratos sólidos (vidro, metais, sistemas poliméricos, e outros) depende da natureza do substrato, e pode ocorrer via estabelecimento de interações intermoleculares, (interação de ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo e van der Waals), ligação iônica e formação de ligação covalente (QIU et al., 2018).

A Fig. 5 apresenta um esquema ilustrando o processo de deposição de camadas (PEMs) sobre um substrato sólido com densidade de carga negativa (o substrato sólido é submetido a um processo aonde se adquire carga superficial negativa). Para induzir cargas superficiais negativas em substratos sólidos pode usar os métodos de oxidação por plasma (DA CÂMARA et al., 2019), oxidação química (como o uso de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (persulfato de sódio)) e irradiação UV/ O_3 (CURTI et al., 2002).

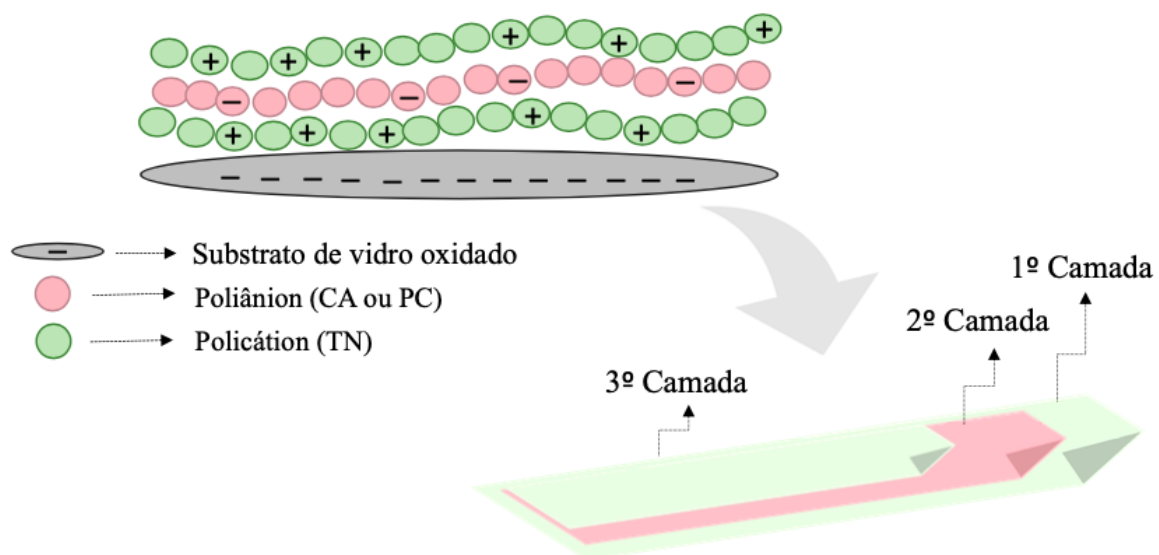


Figura 5 - Esquema de montagem/deposição/adsorção de multicamadas PEMs sobre um substrato sólido carregado negativamente.

Fonte - Facchi et al. (2020)

O número de camadas depositadas/adsorvidas na superfície pode ser controlado e, conseqüentemente, a espessura das PEMs podem ser arranjadas com precisão em nanoescala (SAQIB; ALJUNDI, 2016). Além disso, as características químicas e biológicas das PEMs podem ser otimizadas alterando os tipos de polieletrólitos em solução que serão depositados na superfície do substrato sólido (ARIGA et al., 2012; \. Modificação de superfícies com PEMs podem agregar ao substrato sólido propriedades ópticas, elétricas, químicas e biológicas.

Filmes finos obtidos via layer-by-layer têm sido usados como barreira de gás (PRIOLO et al., 2010; PRIOLO et al., 2011), superfícies com propriedades antimicrobianas (MARTINS, A. F. et al., 2020b), biossensores (IOST; CRESPILO, 2012), superfícies hemocompatíveis (SABINO et al., 2020), dispositivos para administração de medicamentos (agentes de cicatrização de feridas) e engenharia de tecidos (MARTINS, A. F. et al., 2018).

2.6. POLIELETRÓLITOS

2.6.1. Tanfloc

O tanfloc (TN) é um polímero orgânico de característica catiônica obtido através de taninos condensados (FACCHI et al., 2017a). O TN é produzido e comercializado pela empresa Tanac S.A localizada no município de Montenegro, Estado do Rio Grande do Sul. Os taninos condensados (matéria prima usada na produção do TN) são extraídos da espécie exótica invasora chamada *Acacia mearnsii* (GRAHAM et al., 2008a), popularmente conhecida como Acácia-Negra, da família Mimosaceae. O TN possui um grupo amino por cada unidade repetitiva de sua estrutura (Fig. 6). Esse grupo amina confere densidade de carga positiva em soluções aquosas em pH abaixo de 6,0, uma vez que o pK_a do TN é em torno de 6,0 (FACCHI et al., 2017a).

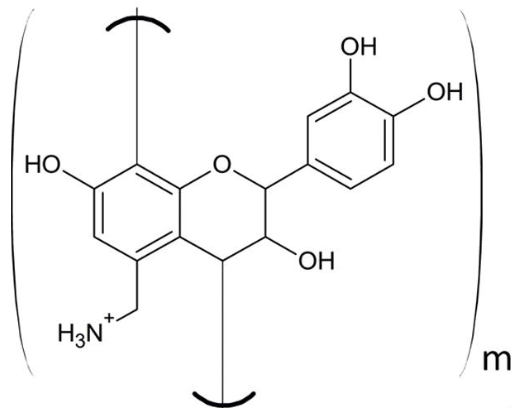


Figura 6 - Estrutura geral do derivado catiônico de tanino condensados (TN). Os cátions orgânicos do TN são estabilizados por contra íons cloreto.

Fonte: Martins, A. F. et al. (2018)

O TN possui capacidade coagulante e, por isso, em meio aquoso, pode precipitar proteínas, polissacarídeos e matéria orgânica. O TN possui alta massa molar e elevado conteúdo de grupos fenólicos em sua estrutura (GRUJIĆ et al., 2015). Sua estrutura geral é do tipo flavonoide (flavan-2-ol) (GUIL-GUERRERO et al., 2016). A estrutura do TN é afetada pelos processos de hidrólise-hidratação, principalmente sob fortes condições alcalinas (FACCHI et al., 2017a).

Os taninos condensados possuem amplas propriedades farmacológicas, tais como, reduzem o nível de colesterol, ação antimicrobiana, citocompatibilidade e hemocompatibilidade (DA CRUZ et al., 2020). A característica antimicrobiana do TN se dá através da presença dos grupos fenólicos e amino em sua estrutura. Grupos amino protonados podem interagir com o envelope microbiano carregado negativamente. Esse tipo de interação leva ao rompimento da parede celular, causando a morte de microrganismos (DA CRUZ et al., 2020). Já os grupos fenólicos podem acidificar o meio em que os microrganismos se encontram. Esse processo também pode levar à ruptura da membrana extracelular de bactérias (SABINO ET AL., 2020).

Um artigo de revisão abordou que as atividades bacteriostática e bactericida de taninos condensados ocorrem por meio da inativação de enzimas, tais como a carboximetil celulase, proteases e glutamato desidrogenase (GUIL-GUERRERO et al., 2016). Outro estudo mostrou que taninos condensados podem bloquear a fosforilação oxidativa, de bactérias, prejudicando o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991). Essa ação antimicrobiana, ocorre contra algumas cepas de bactérias patogênicas, tais como *E. coli*, *P.*

aeruginosa e *S. aureus* (GUIL-GUERRERO et al., 2016). Taninos condensados também possuem atividade fungicida contra *Candida albicans* (GUIL-GUERRERO et al., 2016).

Além do potencial antimicrobiano, atualmente o TN vem substituindo sais de alumínio ou ferro, utilizados como coagulantes inorgânicos convencionais, floculantes e auxiliares de coagulação em tratamento de água (FACCHI et al., 2017a). Os materiais à base de taninos possuem propriedades de biodegradabilidade e baixa toxicidade, sendo candidatos promissores para o desenvolvimento de filtros, filmes, membranas e outros materiais.

Acreditamos que devido ao caráter catiônico, o TN tenha melhores propriedades antimicrobianas em relação aos taninos condensados não modificados quimicamente. Por isso, sugerimos que o TN pode ser usado como um polieletrólito catiônico no preparo de PEMs com atividade antimicrobiana e antiadesiva. À presença de TN em PEMs pode promover novas superfícies com excelentes atividades antimicrobianas.

2.5.2 *Iota*-carragena

As carragenas são um grupo de polissacarídeos compostos por unidades de galactose sulfatada de alto peso molar, extraídas de algas vermelhas (*Rhodophyceae*) (OLMEDO-MARTÍNEZ et al., 2019). As carragenas são agrupadas de acordo com o número de grupos sulfato em suas unidades repetitivas da estrutura polimérica. Geralmente, as carragenas são classificadas em *iota*-carragena (CA), *kappa*-carragena e *lambda*-carragena. Nesse estudo, iremos aplicar somente a *iota*-carragena (CA). Esse polissacarídeo contém dois grupos sulfato por unidade de repetição (Fig. 7) (HU; PHAN, 2016).

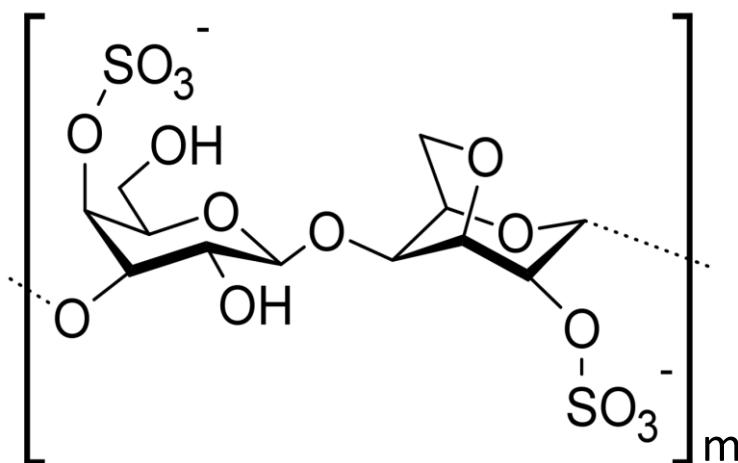


Figura 7 - Estrutura química da *iota*-carragena.

Fonte: Martins, A. F. et al. (2020b).

A CA é um polieletrólito aniônico ($pK_a \approx 2$) de cadeia linear, citocompatível e biodegradável que tem sido usado no desenvolvimento de nanocápsulas para liberação controlada de medicamentos e produtos alimentícios (LIU et al., 2012; ABBAS et al., 2015), fabricação de filmes finos e superfícies PEMs (MARTINS, A. F. et al., 2020a). A densidade de carga negativa da CA torna esse material um agente anti-adesivo (MARTINS, A. F. et al., 2020a). Portanto, a combinação de soluções de polieletrólitos de TN e CA via técnica layer-by-layer pode proporcionar PEMs com propriedades antimicrobianas.

2.5.3 Pectina

A pectina (PC) se trata de um polissacarídeo aniônico ($pK_a = 3,6-4,1$) que ocorre naturalmente em frutas, vegetais e na parede celular de plantas (DIAS et al., 2020). Industrialmente, a PC é extraída da biomassa de resíduos das cascas de frutas cítricas (85%), e resíduos provenientes do processamento de frutas e vegetais, tais como bagaço de maçã (14%) e polpa de beterraba (0,5%) (DRANCA; OROIAN, 2018). Assim como a CA, a PC é utilizada como agente gelificante em formulações da indústria alimentícia (como açúcar nos alimentos dietéticos e filmes biodegradáveis e comestíveis em embalagens de alimentos) (JAMSAZZADEH KERMANI et al., 2015; DIAS et al., 2020). Além disso, a pectina pode ser utilizada na área biomédica, especificamente na produção de filmes com propriedade cicatrizante (MUNARIN et al., 2012) e farmacêutica (produção de matrizes para encapsulação e liberação controlada de medicamentos) (SMISTAD et al., 2012).

A PC apresenta uma estrutura química complexa e ramificada (Fig. 8). A estrutura química da pectina (em torno de 60%) é composta de unidades repetitivas lineares de ácido D-galacturônico (HG) ligados por ligações $\alpha(1 \rightarrow 4)$ (Fig. 9) (YANG et al., 2020; BANERJEE et al., 2018; MARTINS, A. F. et al., 2020b). As unidades de ácido D-galacturônico podem ocorrer parcialmente esterificadas nas posições C6, C3 e C2 (DRANCA; OROIAN, 2018; YAPO, 2011).

A estrutura da PC ainda apresenta unidades ramnogalacturonano I (RG-I) formadas por resíduos de ácido D-galacturônico (dissacarídeos) ligados com unidades L-ramnose. Ainda, 20 a 80% das unidades de ácido D-galacturônico na estrutura RG-I estão ligados em

estruturas ramificadas ou lineares a base de L-arabinone e D-galactose (Fig. 8) (VORAGEN et al., 2009). As estruturas ramnagalacturonan II (RG-II) possuem unidades lineares de ácido D-galacturônico ramificadas com cadeias laterais mais complexas (Fig. 8). Estruturas de arabinogalactano (AG) e xilogalacturonano (XG) podem ser encontradas em quantidades menores (Fig. 8)

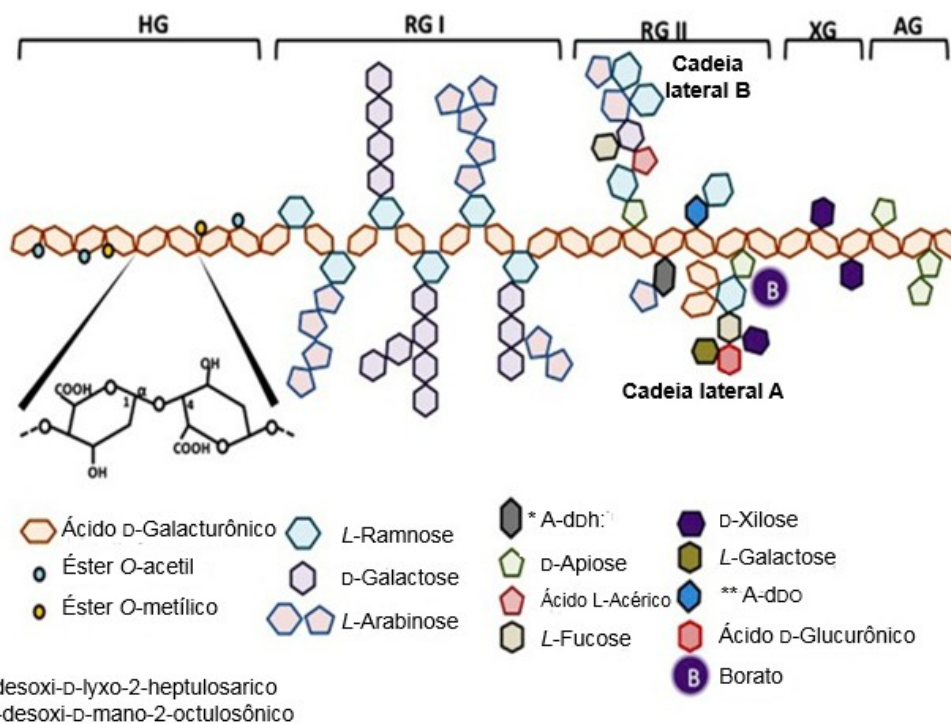


Figura 8 - Representação esquemática da estrutura complexa da pectina. AG = arabinogalactano; HG = homogalacturonano; RG = ramnagalacturonano; XG = xilogalacturonano.

Fonte: Leclere et al. (2013)

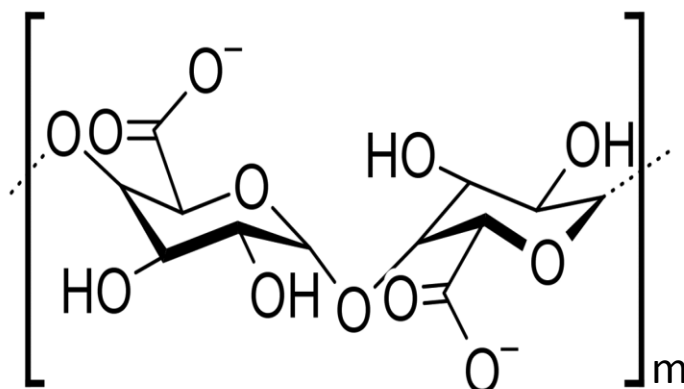


Figura 9 - Estrutura do ácido D-galacturônico (HG) ligadas por ligações $\alpha(1 \rightarrow 4)$ na estrutura química da pectina.

Fonte: Martins, A. F. et al. (2020b)

A composição química da PC varia de acordo com o grau de esterificação, massa molar, método e fonte de extração. PC com grau de esterificação maior que 50% são classificadas como PC de alto grau de esterificação (CHAN et al., 2017; NAQASH et al., 2017). Nesse estudo iremos aplicar uma PC de alto grau de O-esterificação (56%). Nesse caso, a PC se trata de um material mais hidrofóbico em relação a CA. A PC também será associada com o TN via técnica layer-by-layer, visando o preparo de PEMs com atividades antimicrobianas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir um revestimento polimérico com atividade antimicrobiana e antiadesiva por meio da técnica layer-by-layer, almejando evitar a formação de biofilme microbiano em superfícies.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar o tanfloc, polímero catiônico à base de taninos condensados.
- II. Realizar espectroscopia de fotoelétrons de raio-X para analisar a estrutura químicas das PEMs sobre o substrato de vidro oxidado.
- III. Realizar medidas de ângulo de contato para analisar a molhabilidade das PEMs.
- IV. Realizar microscopia de força atômica para avaliar a topografia das superfícies, observando o tamanho das suas espessuras através da rugosidade das PEMs.
- V. Realizar análise de ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier para avaliar a deposição das PEMs sobre um substrato de ouro oxidado.
- VI. Realizar teste estabilidade das PEMs em tampão PBS em pH 7,4 para avaliar a durabilidade das PEMs.
- VII. Preparar e caracterizar os materiais PEMs (filmes finos) à base de tanfloc/*iota*-carragena e tanfloc/pectina.
- VIII. Realizar testes de adesão e proliferação de bactérias para avaliar o potencial antimicrobiano das PEMs.

4. METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS

O derivado de tanino amino-funcionalizado (TN, massa molar de aproximadamente 600 kDa), comercialmente chamado de Tanfloc SG, foi graciosamente doado pela empresa Tanac SA (Montenegro-RS, Brasil) (LOPES et al., 2019; GRAHAM et al., 2008b). A pectina GENU[®] com grau de esterificação de 56% (material comercial com massa molar de 190 kDa) extraída da casca de laranja e a *iota*-carragenina GENUVISCO[®] (material comercial com massa molar de 277 kDa) foram gentilmente fornecidas pela CP Kelco (Limeira-SP, Brasil) (MARTINS, J. G.; DE OLIVEIRA et al., 2018; RAMIN et al., 2019).

4.2 PURIFICAÇÃO DO TANFLOC

O TN foi purificado pois apresenta resíduos de ácido fórmico em sua estrutura. Esse material é tóxico, por isso, realizamos a purificação do TN por diálise. O TN (10g) foi dissolvido em uma solução aquosa diluída de ácido acético (1,0% vol/vol). Em seguida, a solução de TN foi dialisada contra água deionizada (pH 5,5) por 12 h usando membranas de diálise (8,0 kDa, Sigma-Aldrich, EUA). Após diálise, a solução de TN foi removida das membranas de diálise, centrifugada a 600 rpm, congelada e liofilizada por 72 h, para posterior uso.

4.3 PREPARAÇÃO DAS MULTICAMADA DE POLIELETRÓLITOS

O procedimento experimental usado para construir as PEMs foi relatado por (DA CÂMARA et al., 2019; e MARTINS, A. F. et al., 2020b). As soluções de TN, CA e PC ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foram preparadas individualmente em tampão acetato de sódio/ácido acético ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 5,0), enquanto uma solução aquosa diluída de ácido acético (pH 4,0) foi usada para lavar as superfícies das PEMs. Antes de realizar as deposições das PEMs sobre

o substrato, todas as soluções foram filtradas (com filtros de nitrato de celulose 0,22 μm) e as superfícies de vidro oxidadas (discos de 8 mm de diâmetro e 0,1 mm de espessura) foram lavadas com 1,0 mL de solução de ácido acético (pH 4,0) sob agitação (100 rpm) por 6,0 min.

A oxidação da superfície de vidro (substrato de 8 mm de diâmetro e 0,1mm de espessura) foi realizada por meio de plasma de oxigênio durante 10 min. O vidro não apresenta carga, após oxidação a superfície do vidro apresentou carga negativa, tendo em vista que a modificação das multicamadas inicia e finaliza com o depósito do polycation (tanfloc). Após oxidação, a superfície do vidro foi lavada (6,0 min) e a solução de lavagem foi aspirada (DA CÂMARA et al., 2019; MARTINS, A. F. et al., 2020b). Em seguida, 1,0 mL de solução de TN (polycation) foi adicionado às superfícies de vidro oxidado sob agitação (100 rpm). Após 6,0 min, aspirou-se a solução de TN (polycation) e a superfície foi lavada com agitação por 6,0 min. Em seguida, a solução de lavagem foi aspirada e as soluções de poliânion (CA ou PC; 1,0 mL) foram depositadas nas superfícies de vidro oxidado contendo uma camada de TN (polycation). Este processo foi repetido para alcançar PEMs de 5 e 15 camadas, sendo a última camada terminada em polycation (TN).

Após a deposição de 5 ou 15 camadas, as PEMs foram lavadas (6,0 min) com a solução diluída de ácido acético (pH 4,0), e a solução de lavagem foi aspirada. Então água deionizada foi adicionada sobre as PEMs por 30s para remover o excesso de ácido acético da última etapa de lavagem. As PEMs foram mantidas em tampão fosfato (0,10 mol L⁻¹, PBS, pH 7,4) em uma placa de 48 poços por 12 h antes de realizar os testes antimicrobianos, bem como a caracterização das superfícies por meio de microscopia de força atômica (AFM). As PEMs preparadas a partir da deposição de *iota*-carragena/tanfloc e pectina/tanfloc foram denominados como (CA-TN)5, (CA-TN)15, (PC-TN)5 e (PC-TN)15, respectivamente. Os termos 5 e 15 representam o número de camadas depositadas/adsorvidas no substrato de vidro oxidado. A Fig. 10 ilustra o esquema de deposição das PEMs sobre o substrato de vidro oxidado.

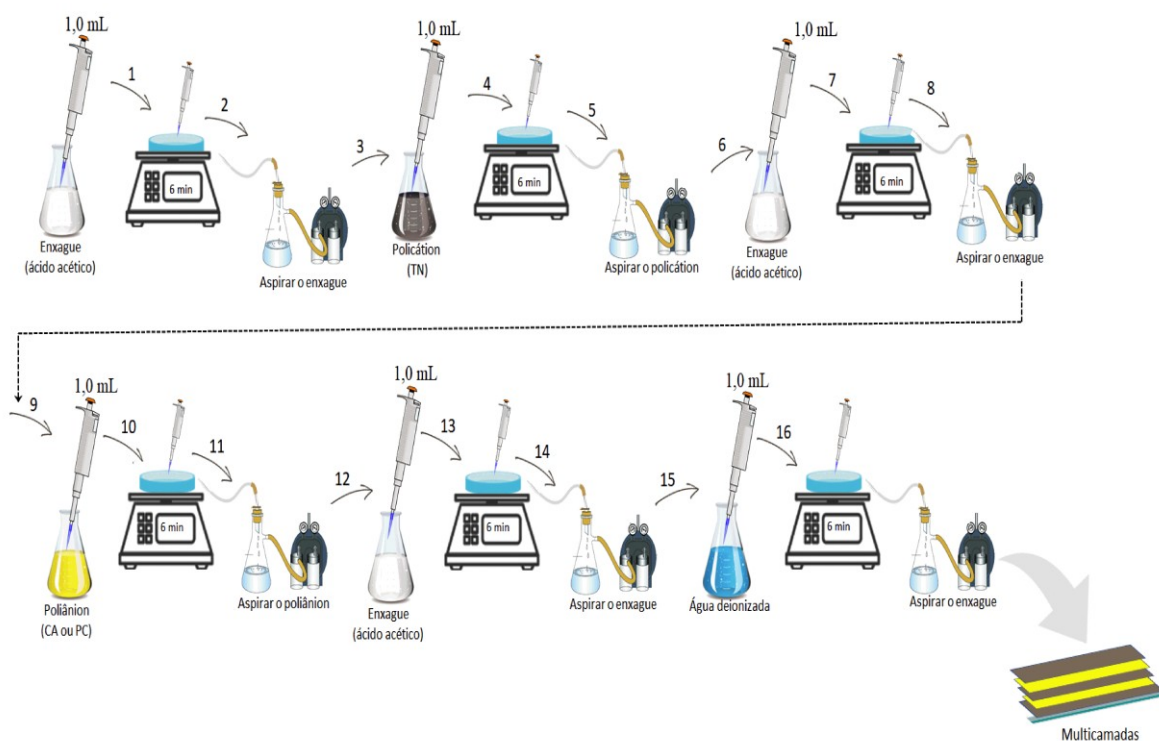


Figura 10 - Ilustração esquemática do processo de fabricação das PEMs, representando a deposição de 2 camadas de PEMs sobre um substrato (8,0 mm) de vidro oxidado. As soluções são depositadas sobre o substrato de vidro oxidado durante 6,0 min de agitação e, então, removidas (aspiradas).

Fonte – Autor (2021)

4.4 CARACTERIZAÇÃO

4.4.1 Espectroscopia de fotoelétrons de raio-X

A espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS) foi realizada para confirmar a deposição das PEMs sobre o substrato de vidro oxidado. O XPS foi operado com uma fonte de raios-X monocromática Al K α ($h\nu = 1486,6$ eV), um analisador hemisférico e um detector multicanal. Os espectros de alta resolução foram obtidos utilizando um analisador de energia de 23,5 eV com passos de 0,10 eV e um ponto de raio-X de 800 μ m. Todos os espectros foram obtidos com um ângulo de fotoelétrons de 45°. Os picos gaussianos obtidos no XPS de alta resolução foram ajustados de acordo com os grupos funcionais esperados usando o Origin versão 8.5. Essa análise foi realizada na Colorado State University (CSU), USA.

4.4.2 Medidas de ângulo de contato

A molhabilidade das PEMs foi avaliada por meio de medidas de ângulo de contato estático, usando o método da gota séssil com um goniômetro de ângulo de contato modelo Krüss DSA 10, Hamburgo, Alemanha. Os PEMs obtidos foram secos com $N_{2(g)}$ e, em seguida, o goniômetro depositou uma gota de água sobre a superfície das amostras. Medidas de ângulo de contato foram processadas por meio do software de imagem DSA 10 ($n = 3$). Essa análise foi realizada na Colorado State University (CSU), USA.

4.4.3 Ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier (FT-SPR)

A análise FT-SPR foi usada para avaliar a deposição das monocamadas de polieletrólitos sobre um substrato de ouro oxidado, conforme descrito por (HEDAYATI; KIPPER, 2018). Lâminulas de vidro revestidas com ouro (47 nm) foram oxidadas em ácido mercaptoundecanóico para realizar o ensaio FT-SPR com deposição das PEMs (ALMODÓVAR et al., 2011; BODDOHI et al., 2008). As lamínulas oxidadas foram adicionadas na célula de fluxo de um módulo SPR-100 em um espectrômetro Thermo Electron 8700 FT-IR. Uma bomba peristáltica Masterflex foi usada para bombear a solução de enxágue e soluções dos polissacarídeos através da célula de fluxo FT-SPR, com uma taxa de fluxo de $0,5 \text{ mLmin}^{-1}$. O interferômetro no instrumento FT-SPR foi usado para varrer comprimentos de onda em um ângulo fixo de incidência. Nesses experimentos, o FT-SPR foi operado usando uma fonte de luz branca/infravermelho próximo com um divisor de feixe CaF_2 no interferômetro e um detector. Os dados foram coletados usando o software Omnic 7,3 com resolução de 8 cm^{-1} de 6.000 a 12.000 cm^{-1} . As PEMs foram depositadas sobre as lamínulas. Primeiro, a lamínula oxidada foi lavada com uma solução aquosa de ácido acético (pH 4,0) por 6,0 min. Então, as PEMs foram depositadas na superfície da lamínula modificada, conduzido as soluções através da célula de fluxo na seguinte sequência: polication (TN), enxágue, poliânion (PC ou CA) e enxágue. A espessura das PEMs foi avaliada por FT-SPR de acordo com o procedimento relatado por (HEDAYATI; KIPPER, 2018).

4.4.4 Microscopia de força atômica (AFM)

O equipamento BioScope Resolve, modelo BIOAFM (Bruker) foi utilizado para avaliar a morfologia da superfície e a rugosidade das PEMs mantidas em PBS (pH 7,4) após 12 h de preparo (HEDAYATI; KIPPER, 2018; DA CÂMARA et al., 2019). As imagens de microscopia de força atômica (AFM) foram obtidas por meio de um cantilever de nitreto de silício em forma de V, com raio de ponta nominal de 20 nm, constante de mola de $0,35 \text{ Nm}^{-1}$. Todas as imagens foram obtidas em temperatura ambiente. A análise das imagens foi realizada no Software NanoScope Analysis versão 1,8. A área de imagem foi de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$. A rugosidade de superfície das PEMs foi fornecida pelo Software NanoScope Analysis. Essa análise foi realizada na Colorado State University (CSU), USA.

4.5 ESTABILIDADE DAS PEMs EM TAMPÃO PBS (pH 7,4)

Para avaliar a durabilidade, as PEMs recém obtidas foram mantidas em PBS (pH 7,4) por 7 dias a 37°C (MARTINS, A. F. et al., 2020b). Após, as PEMs foram removidas do PBS e secas com $\text{N}_{2(\text{g})}$ para posterior obtenção de espectros de XPS e medidas de ângulo de contato. Também, serão realizadas imagens AFM das PEMs após o teste de estabilidade em PBS. Estas análises foram realizadas na Colorado State University (CSU), USA.

4.6 ENSAIOS DE ADESÃO E PROLIFERAÇÃO DE BACTÉRIAS NAS PEMs

Os testes antimicrobianos foram realizados conforme descrito anteriormente por (MARTINS, A. F. et al., 2020b). *P. aeruginosa* (ATCC 15442) e *S. aureus* (ATCC 29213) foram descongeladas a 25°C após serem congeladas em uma solução de glicerol/água 1:1. As culturas foram centrifugadas (4700 rpm, 10 min), enquanto o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em caldo Luria Bertani Miller (LB) a 37°C . As culturas bacterianas foram incubadas em caldo líquido LB (37°C , 100 rpm). Após 24h de incubação, foram realizadas medidas de densidade óptica. Então, culturas de bactérias foram semeadas ($500 \mu\text{L}$) sobre as PEMs depositadas em disco de 6,0 mm de vidro oxidado em uma placa de 48 poços com densidade óptica ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) de 0,35 na concentração de

$2,8 \times 10^8$ células/mL. Após 6 e 24 h de incubação, as PEMs foram removidas da placa de 48 poços. As amostras foram submetidas ao processo de fixação e, então analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura (SEM) (MARTINS, A. F. et al., 2020b; MARTINS, J. G.; CAMARGO; et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020a).

O SEM foi utilizado para analisar a morfologia das bactérias aderidas nas superfícies das PEMs e amostras controle (filmes de poliestireno, PS) após 6 e 24 h de contato. Para isso, as amostras foram fixadas em solução 3,7% vol/vol de glutaraldeído, $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de cacodilato de sódio e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de sacarose por 45 min (solução primária). As amostras fixadas foram removidas da solução primária e, então adicionadas (10 min) em uma solução buffer à base de cacodilato de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e sacarose ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Após, as PEMs contendo as bactérias fixadas foram desidratadas em solução etanol/água com concentração de etanol em 35, 50, 70 e 100% durante 10 min em cada etapa de exposição. Por fim, as amostras fixadas e desidratadas foram armazenadas em um dessecador até serem analisadas por SEM.

As amostras fixadas foram revestidas com uma fina camada de ouro para permitir a visualização de imagens SEM. As imagens foram obtidas aplicando-se uma tensão de aceleração de feixe de elétrons de 10 a 15 kV em um equipamento SEM modelo JEOL JSM-6500F. As amostras foram fotografadas nas ampliações de 1000× para contagem do número de bactérias aderidas nas superfícies das amostras (cinco imagens por amostra) e 3500× para analisar a morfologia celular das mesmas ($n = 3$). Determinou-se o número de bactérias aderidas por área de superfície (número de bactérias/cm² de superfícies) usando o software ImageJ. Para isso, foi considerando apenas os microrganismos com morfologia regular aderidos na superfície das PEMs.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente usando análise da ANOVA com o teste de Tukey, com nível de significância de 5% (GraphPad Prism 6.0).

1

2 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

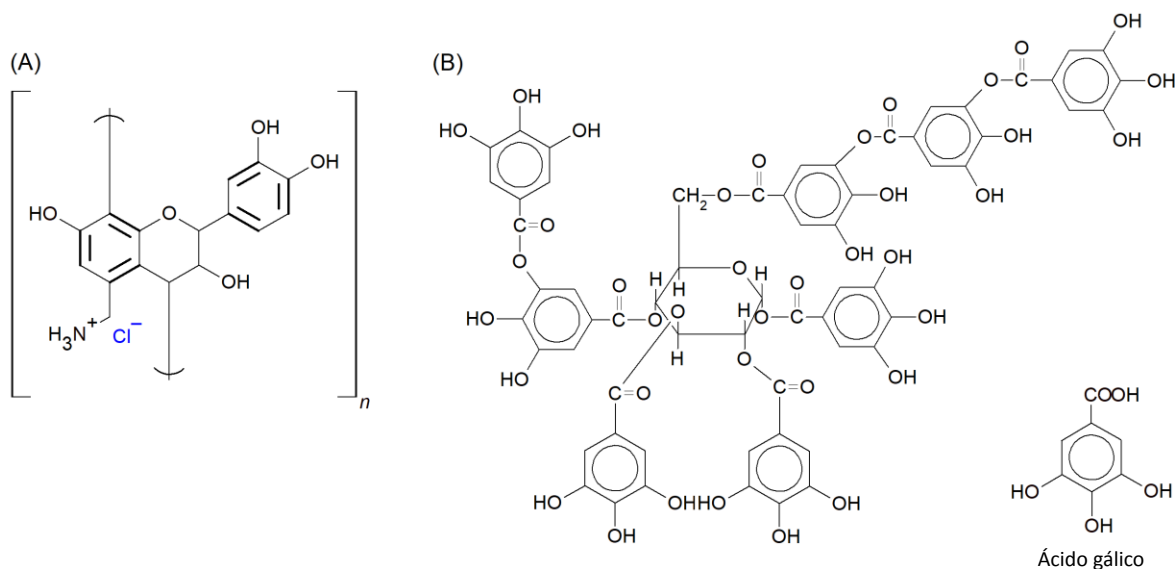
3

4 5.1 Caracterização do derivado de tanino amino-funcionalizado

5

6 O TN é obtido pela reação de taninos condensados na presença de cloreto de
7 amônio ou aminas monossobstituídas e ácido fórmico (FACCHI et al., 2017b). O TN é um
8 derivado de tanino condensado amino-funcionalizado formado por unidades típicas de
9 flavan-3-ol. Os flavonóides compreendem estruturas com dois anéis aromáticos
10 frequentemente ligados a cadeias de três carbonos contendo um heteroátomo de oxigênio
11 (GUIL-GUERRERO et al., 2016). A estrutura TN compreende um cátion orgânico (amino-
12 funcionalizado) estabilizado por contra-íons de cloreto (Fig. 11A). Essa estrutura já foi
13 caracterizada por FTIR, SEM e espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS)
14 (FACCHI et al., 2017b; MARTINS, A. F. et al., 2018). A caracterização mostrou que o TN
15 também apresenta taninos hidrolisados em sua estrutura (Fig.11B). Os taninos condensados
16 são baseados em polímeros de unidades flavan-3-ol, enquanto os taninos hidrolisáveis são
17 frequentemente moléculas com núcleo central D-glucose parcial ou totalmente
18 esterificadas com moléculas de ácido gálico (Fig.11) (GUIL-GUERRERO et al., 2016).

19



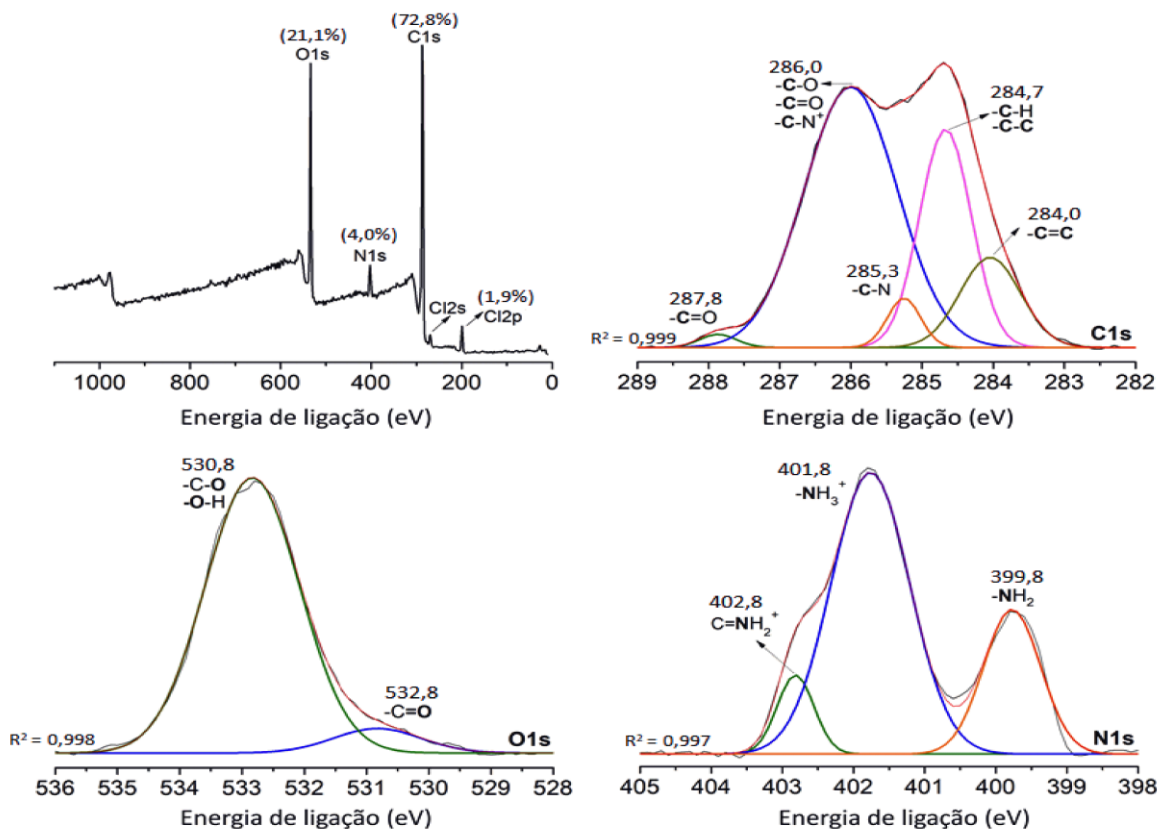
20

21 **Figura 11** - Estruturas químicas do derivado de tanino catiônico (A) e taninos hidrolisados
22 com base em moléculas de ácido gálico esterificadas com frações D-glucose (B).

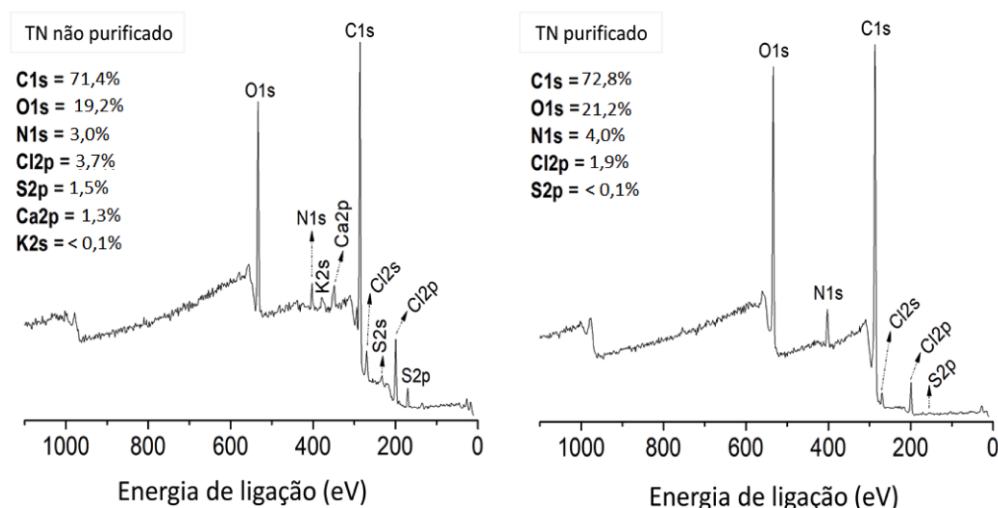
23 **Fonte** – Facchi et al. (2020)

24

25 A Figura 12 apresenta espectros XPS (survey e alta resolução) do TN dialisado
 26 (purificado). O espectro de XPS (survey) mostra a presença de picos característicos
 27 relacionados ao oxigênio (O_{1s} a 531 eV), nitrogênio (N_{1s} a 401 eV), carbono (C_{1s} a 285 eV)
 28 e cloro (Cl_{2p} a 200 eV) (Fig. 12). A Fig. 13 exibe o espectro XPS do TN não purificado. A
 29 diálise remove conteúdos de enxofre, potássio, cálcio e excesso de cloro da estrutura do
 30 TN. Cálcio, potássio e enxofre são elementos essenciais que promovem o crescimento de
 31 plantas (FROMM, 2010; LIKUS-CIEŚLIK, PIETRZYKOWSKI, 2017). Após a diálise,
 32 esses elementos foram removidos da estrutura do TN. No entanto, o cloreto é o contra-íon
 33 do cátion TN (Fig. 11A). Após a diálise, o conteúdo de cloro diminuiu de 3,7 para 1,9%
 34 (Fig. 12). O excesso de cloro no TN obtido é fornecido a partir do cloreto de amônio usado
 35 na síntese do TN (FACCHI et al., 2017b; MARTINS, A. F. et al., 2018). Além disso, após
 36 a diálise, os conteúdos O_{1s}, C_{1s} e N_{1s} aumentam ligeiramente na estrutura do TN (Fig.13).
 37



38 **Figura 12** - Espectro XPS (survey) do TN obtido após o processo de purificação e
 39 espectros XPS de alta resolução dos envelopes C_{1s}, O_{1s} e N_{1s}.
 40 **Fonte** – Facchi et al. (2020)
 41
 42
 43



44
45 **Figura 13** - Espectros de XPS (survey) do TN: antes da purificação (A) e após a
46 purificação (B).

47 **Fonte** – Facchi et al. (2020)

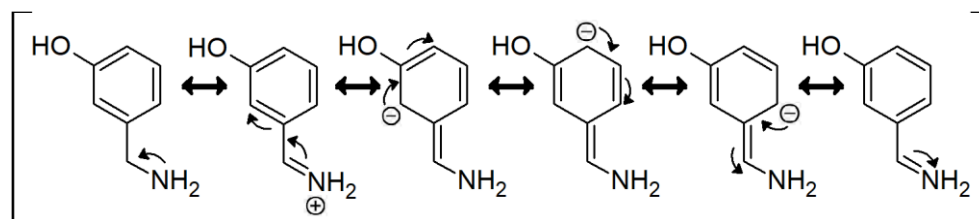
48
49

50 Os espectros XPS de alta resolução para os envelopes C_{1s} e O_{1s} confirmam que os
51 taninos hidrolisados ocorrem no TN (Fig. 12). Os picos característicos atribuídos aos
52 grupos $-C=O$ (287,8 e 532,8 eV) encontrados nos envelopes C_{1s} e O_{1s} são atribuídos aos
53 grupos éster encontrados principalmente em polímeros de ácido gálico em taninos
54 hidrolisados (Fig. 12) (FARROKHNIA et al., 2019). O pico atribuído às ligações $-C-H$ e
55 $C-C$ (284,7 eV) deve ser atribuído principalmente às frações D-glicose dos taninos
56 hidrolisados e às cadeias de três carbonos com heteroátomo de oxigênio no TN condensado
57 (Fig. 11A) (FARROKHNIA et al., 2019).

58 No entanto, os picos $-C=O$ nos envelopes C_{1s} e O_{1s} atribuídos aos taninos
59 hidrolisáveis apresentam baixa intensidade. Taninos hidrolisados ocorrem em baixo teor
60 nas plantas, enquanto taninos condensados são abundantes (FACCHI et al., 2017b; GUIL-
61 GUERRERO et al., 2016). O pico em 284,0 eV é atribuído aos anéis aromáticos em
62 taninos condensados (Fig. 12) (PONCE et al., 2016). Grupos químicos como $-C-O$ e
63 $-O-H$ (286,0 e 530,8 eV) são características de redes de taninos condensados e
64 hidrolisados (GUIL-GUERRERO et al., 2016). A porção amino-funcionalizada
65 relacionada à estrutura TN é confirmada pela ocorrência de porções $-C-N$ (285,7 eV),
66 $-C-N^+$ (286,0 eV), $-NH_2$ (399,8 eV), $-NH_3^+$ (401,8 eV) e $-C=NH_2^+$ (402,8 eV) (ŠETKA
67 et al., 2019). O pico em 401,8 eV é confirmado a partir da estrutura de ressonância TN
68 (Fig. 14). A solução de TN foi dialisada em água deionizada a pH 5,5. Nesta condição, TN

69 (pK_a = 6,0) está parcialmente ionizado e fornece grupos -NH₂ e -NH₃⁺ (LOPES et al.,
 70 2019).

71



72

73 **Figura 14** - Estruturas de ressonância do cátion TN.

74 **Fonte** – Facchi et al. (2020)

75

76 Avaliamos as porcentagens relativas dos grupos -C=O, -NH₂ e -NH₃⁺ para
 77 entender como o TN pode interagir com polissacarídeos aniônicos para construir PEMs. A
 78 Tabela 1 apresenta as porcentagens relativas de -NH₂ e -NH₃⁺ para o nitrogênio
 79 determinado a partir das áreas de pico em 399,8 e 401,8 eV (envelope N_{1s}),
 80 respectivamente, e a porcentagem relativa de -C=O para o oxigênio determinado a partir
 81 das áreas de pico em 530,8 e 532,8 eV no envelope O_{1s} (Fig. 13). Como relatado em outro
 82 lugar, os taninos condensados são abundantes nas plantas (FACCHI et al., 2017b;
 83 MARTINS, A. F. et al., 2018). A baixa porcentagem relativa de grupos -C=O esterificados
 84 (7,5%) em taninos hidrolisados confirma este fato (Tabela 1).

85

86 **Tabela 1** - Porcentagens relativas de grupos químicos na estrutura do TN purificado
 87 determinadas por análise XPS.

| -NH ₂ (%) ^a | -NH ₃ ⁺ (%) ^a | -C=O (%) ^b |
|-----------------------------------|--|-----------------------|
| 27 | 73 | 7,5 |

88 ^aPorcentagens relativas de -NH₂ e -NH₃⁺ em relação ao conteúdo total de nitrogênio determinadas a partir
 89 das áreas de pico no espectro XPS de alta resolução para o envelope N_{1s}.

90 ^bPorcentagens relativas de -C=O em relação ao conteúdo total de oxigênio determinadas a partir das áreas de
 91 pico no espectro XPS de alta resolução para o envelope O_{1s}.

92

93

94 5.2 Caracterização das PEMs

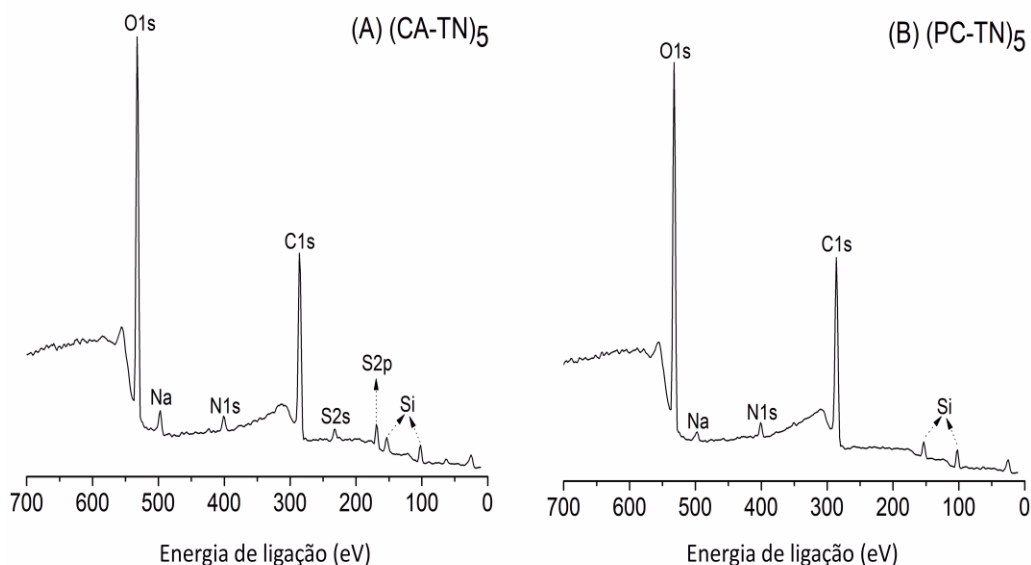
95

96 5.2.1 Espectroscopia de fotoelétrons de raios-X (XPS)

97

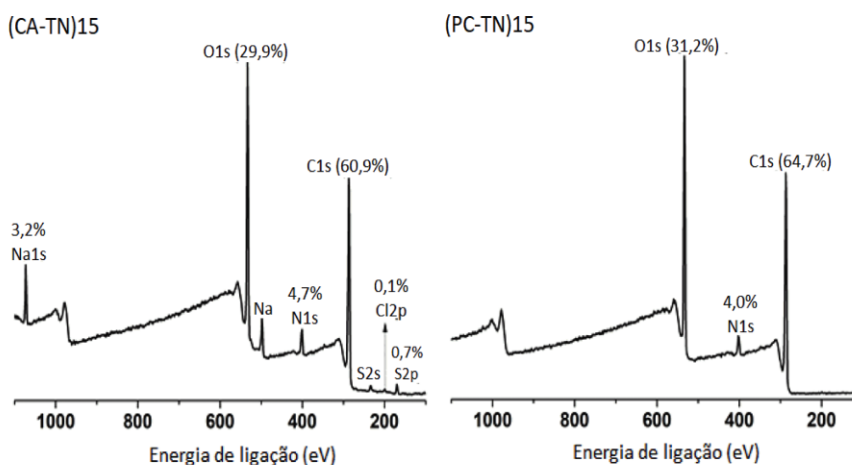
98

99 A Fig. 15 mostra os espectros XPS (survey) das PEMs com 5 camadas, enquanto a
 100 Fig. 16 apresenta os espectros XPS (survey) das PEMs com 15 camadas. Cinco camadas de
 101 PEMs não recobrem totalmente a superfície do vidro oxidado (Fig. 15). Isso é confirmado
 102 pela ocorrência de picos de silício nos espectros XPS (ORÉFICE; BRENNAN, 1998), os
 103 quais são atribuídos ao substrato de vidro subjacente (Fig. 15).



104
 105 **Figura 15** - Espectros XPS (survey) das PEMs preparadas com 5 camadas.
 106 **Fonte** – Facchi et al. (2020)

107
 108 Para estudos adicionais, escolheu-se trabalhar com as PEMs de 15 camadas, uma
 109 vez que 15 camadas de PEMs recobrem totalmente o substrato de vidro oxidado (Fig. 16)
 110 (DA CÂMARA et al., 2019; MARTINS, A. F. et al., 2020b). Com 15 camadas não se
 111 observa picos atribuídos aos átomos de silício provenientes do substrato adjacente de vidro
 112 (Fig. 16).



113

114 **Figura 16** - Espectros XPS (survey) das PEMs preparadas com 15 camadas.

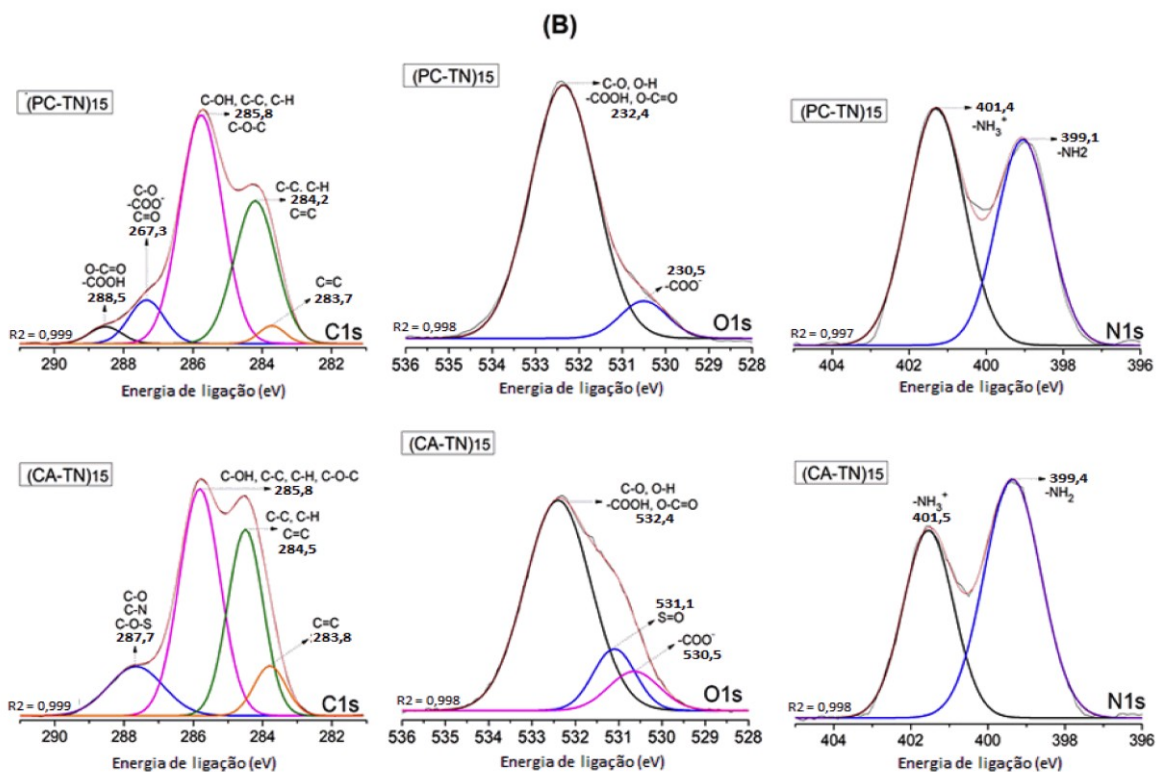
115 **Fonte** – Facchi et al. (2020)

116 Todos os espectros XPS (survey) apresentam picos referentes aos átomos de
117 carbono (C_{1s} em 285 eV) e átomos de oxigênio (O_{1s} em 531 eV) atribuídos aos
118 polissacarídeos CA, PC e o derivado de tanino condensado TN (Fig. 16). O espectro XPS
119 da superfície (CA-TN)15 mostra picos característicos atribuídos às cadeias de TN e CA.
120 Os picos atribuídos ao N_{1s} (400 eV) e enxofre (S_{2p} e S_{2s} em 164 e 226 eV (HUANG et al.,
121 2016) confirmam a ocorrência de TN e CA na superfície (CA-TN)15, respectivamente
122 (Fig. 15)). Mesmo após a lavagem, se observa ocorrência de átomos de sódio (Na_{1s} =
123 3,2%) no espectro XPS da amostra (CA-TN)15 (Fig. 16). O grupo $-OSO_3H$ ($pK_a = 2,2$)
124 está ionizado na condição de pH 5,0. Então, os íons Na^+ fornecidos a partir do tampão de
125 ácido acético-acetato de sódio podem interagir eficientemente com os locais aniônicos de $-$
126 OSO_3^- nas redes CA.

127 Além disso, as carragenas comerciais são frequentemente extraídas de algas usando
128 resinas catiônicas, seguidas de uma etapa de neutralização realizada com hidróxido de
129 sódio (ROBAL et al., 2017). O tampão acetato de sódio-ácido acético, bem como os
130 tratamentos de neutralização das carragenas podem ser as fontes prováveis dos contra-íons
131 Na^+ na amostra (CA-TN)15 (Fig. 12). O espectro XPS da PEM (PC-TN)15 mostra um pico
132 N_{1s} atribuído a estrutura do TN. O espectro XPS também não indicou picos de átomos de
133 enxofre e sódio (Fig. 16). As imagens de AFM mostradas a seguir, indicam que a PEM
134 CA-TN apresenta menor rugosidade em comparação com as PEM PC-TN. A PEM CA-TN
135 parece ser mais compacta. Esse fato pode dificultar a remoção de íons sódio da superfície
136 (CA-TN)15 durante o processo de lavagem.

137 A Figura 17 apresenta os espectros XPS de alta resolução para envelopes C_{1s} , O_{1s} e
138 N_{1s} , obtidos das PEMs com 15 camadas. Todos os espectros XPS de alta resolução dos
139 envelopes C_{1s} e O_{1s} contêm picos atribuídos aos grupos químicos característicos (C–C, C–
140 O e O–H) encontrados nas estruturas do TN, PC e CA. Os envelopes C_{1s} apresentam sinais
141 C=C (aproximadamente em 283 e 284 eV) e C–N (287,7 eV) atribuídas às porções
142 fenólicas e aminas nas cadeias do TN (Fig. 17). Os picos atribuídos ao ânion carboxilato ($-$
143 COO^- e C=O em 287,3 eV), ácido carboxílico e porções éster ($-COOH$ e O–C=O em
144 288,5 eV) confirmam a presença de PC na superfície (PC-TN)15. Os locais ésteres são
145 atribuídos aos grupos *O*-metoxilados da PC (MARTINS, J. G.; DE OLIVEIRA et al.,
146 2018) e a possível presença de taninos hidrolisados no TN (FARROKHANIA et al., 2019).

147 Os picos atribuídos ao grupo C–O–S (287,7 eV (RAMIN et al., 2019), envelope C_{1s}) e
 148 S=O (531,1 eV (WANG et al., 2016), envelope O_{1s}) confirmam que a CA ocorre na
 149 superfície da PEM (CA-TN)₁₅.
 150



151 **Figura 17** - Espectros XPS de alta resolução dos envelopes C_{1s}, O_{1s} e N_{1s} obtidas das
 152 PEMs com 15 camadas.
 153

154 **Fonte** – Facchi et al. (2020)
 155

156 Os envelopes O_{1s} e N_{1s} identificam porções aniônicas (-COO⁻ a 530,5 eV
 157 (MARTINS, J. G., CAMARGO et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2019), sítios S=O em
 158 531,1 eV (WANG et al., 2016) e grupos catiônicos (-NH₃⁺ em torno de 401 eV
 159 (MARTINS, J. G., CAMARGO et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2019) correspondentes
 160 as estruturas de PC, CA e TN, respectivamente. Os envelopes O_{1s} também mostram picos
 161 atribuídos aos grupos éster e ácido carboxílico (-COOH e O-C=O em 532,4 eV),
 162 enquanto os envelopes N_{1s} fornecem picos de amina protonada (-NH₃⁺ a 401,4 e 401,5 eV)
 163 (MARTINS, J. G., CAMARGO et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2019) e não protonada
 164 (-NH₂ em 399,1 e 399,4 eV (MARTINS, J. G., CAMARGO et al., 2018 ; DE OLIVEIRA
 165 et al., 2019) encontrados nas cadeias de TN.

166 A condição de pH 5,0 é utilizada para obter PEMs, porque fornece polieletrólitos
 167 ionizados (quitosana, TN, heparina, sulfato de condroitina, CA, PC e outros) em solução

168 (MARTINS, A. F. et al., 2020b; DA CÂMARA et al., 2019). Estudos recentes de PEMs
169 (revestimentos à base de TN/heparina, TN/sulfato de condroitina, quitosana/CA e
170 quitosana/PC) preparadas nessa condição de pH, mostram citocompatibilidade sobre
171 células de mamíferos (MARTINS, A. F. et al., 2020b). Os resultados de XPS confirmam
172 que as PEMs (PC-TN)15 e (CA-TN)15 são estabilizadas pela ocorrência de interações
173 coulômbicas entre os grupos -COO^- ($\text{pK}_a = 3,6-4,1$) (OFORI-KWAKYE, FELL, 2001) e -NH_3^+
174 ($\text{pK}_a = 6,0$), e -OSO_3^- e -NH_3^+ , respectivamente (FACCHI et al., 2016).

175 À presença de sítios não ionizados (-OH , -NH_2 e -COOH) também pode ajudar a
176 manter a superfície das PEMs, pois esses grupos interagem entre si por meio de interações
177 intermoleculares (especialmente a interação de ligações de hidrogênio) entre cadeias
178 poliméricas. Portanto, as PEMs são principalmente estabelecidas por meio do
179 estabelecimento de forças coulômbicas e interações de ligação de hidrogênio entre as
180 cadeias poliméricas (DA CÂMARA et al., 2019).

181 Existem pequenas diferenças nas intensidades de pico relativas dos grupos -NH_3^+ e
182 -NH_2 (Fig. 17). A intensidade de pico do grupo -NH_3^+ na superfície (CA-TN)15 é menor
183 que a intensidade de pico do mesmo grupo -NH_3^+ na superfície (PC-TN)15 (Fig. 17). Em
184 pH 5,0, a CA apresenta maior densidade de carga negativa, porque contém dois locais -OSO_3^-
185 por cada unidade de repetição de dissacarídeos. Enquanto a PC mostra menor
186 densidade aniônica devido ao seu alto grau de *O*-metoxilação (MARTINS, J. G. e DE
187 OLIVEIRA et al., 2018; RAMIN et al., 2019). Existem mais grupos -OSO_3^- disponíveis
188 para interagir com porções -NH_3^+ nas cadeias de TN. Esse fato deve diminuir a intensidade
189 do pico do grupo -NH_3^+ na superfície (CA-TN)15. Além disso, o excesso de -OSO_3^- deve
190 interagir com os íons Na^+ (contra-íons fornecidos pelo tampão acetato-ácido acético (pH
191 5,0), ou íons Na^+ supostamente provenientes do processo de produção da CA (ROBAL et
192 al., 2017). Isso é suportado pela incidência de átomos de sódio ($\text{Na}_{1s} = 3,2\%$) no espectro
193 XPS da amostra (CA-TN)15 (Fig. 17).

194

195

196 5.2.2 Medidas de ângulo de contato (WCAs)

197

198 Medidas de WCAs foram realizadas nas superfícies das PEMs e no substrato de
199 vidro nativo. A molhabilidade foi determinada pelo método da gota séssil (MARTINS, J.
200 G., e CAMARGO et al., 2018). O WCA medido sobre o vidro (substrato não oxidado) foi

201 de $62 \pm 0,1^\circ$, enquanto nas PEMs, os WCAs foram $22 \pm 0,4^\circ$ na superfície (CA-TN)15 e 49
 202 $\pm 0,1^\circ$ na superfície (PC-TN)15 (tabela 2). A PC é mais hidrofóbica que a CA, porque a PC
 203 apresenta elevado grau de *O*-metoxilação, enquanto o CA apresenta dois grupos sulfato
 204 ionizados por cada unidade de repetição (MARTINS, J. G., e DE OLIVEIRA et al., 2018;
 205 FACCHI et al. (2016). O alto conteúdo de grupos *O*-metilados nas cadeias de PC diminui
 206 seu potencial para interagir com moléculas de água por meio das interações de ligação de
 207 hidrogênio e íon-dipolo.

208

209 **Tabela 2-** Medidas de ângulo de contato com a água (WCA) determinadas nas superfícies
 210 das PEMs.

| PEMs | WCA (superfícies obtidas) ^a | WCA (após 7 dias em PBS) ^b |
|------------|--|---------------------------------------|
| (PC-TN) 15 | 49 ± 1 | 48 ± 3 |
| (CA-TN) 15 | 22 ± 4 | 26 ± 3 |

211 ^aResultados avaliados nas superfícies das PEMs recém obtidas. Após a etapa de lavagem realizada com água
 212 desionizada, as superfícies foram secas com $N_{2(g)}$ e os WCAs avaliados.

213 ^bResultados determinados após o teste de estabilidade. As PEMs foram mantidos em PBS (pH 7,4) por 7 dias
 214 a 37°C . Em seguida, as superfícies foram removidas do PBS, lavadas com água deionizada, secas com
 215 $N_{2(g)}$ e realizadas medidas de WCAs.

216

217

218 Os resultados aqui relatados concordam com as medidas de WCA realizadas em
 219 superfícies de PEM depositadas em substratos de vidro oxidado à base de heparina/TN (10
 220 camadas), sulfato de condroitina/TN (10 camadas), heparina/TN (11 camadas),
 221 PC/quitosana (15 camadas) e CA/quitosana (15 camadas) (DA CÂMARA et al., 2019;
 222 MARTINS, A. F. et al., 2020a). Essas PEMs conferem superfícies hidrofílicas (WCAs de
 223 aproximadamente 28 , 26 e 38° para as PEMs de sulfato de condroitina/TN (10 camadas),
 224 heparina/TN (10 camadas) e heparina/TN (11 camadas), respectivamente (DA CÂMARA
 225 et al., 2019), enquanto as PEMs de PC/quitosana e CA/quitosana indicaram WACs de 52 e
 226 25° , respectivamente (MARTINS, A. F. et al., 2020b).

227 A energia superficial mais baixa fornece WCAs mais elevados nas superfícies do
 228 vidro nativo e nas PEMs (PC-TN)15 e PC/quitosana (15 camadas), quando comparadas às
 229 superfícies (CA-TN)15 e CA/quitosana (15 camadas). A energia da superfície desempenha
 230 um papel essencial no estabelecimento de interações entre as superfícies das PEMs e
 231 células. Da Câmara et al. mostraram que PEMs baseados em glicosaminoglicanos/TN,
 232 montados em pH 5,0, apresentaram citocompatibilidade sobre células-tronco derivadas do
 233 tecido adiposo humano (células ADSCs) (DA CÂMARA et al., 2019). Nesse caso, a carga

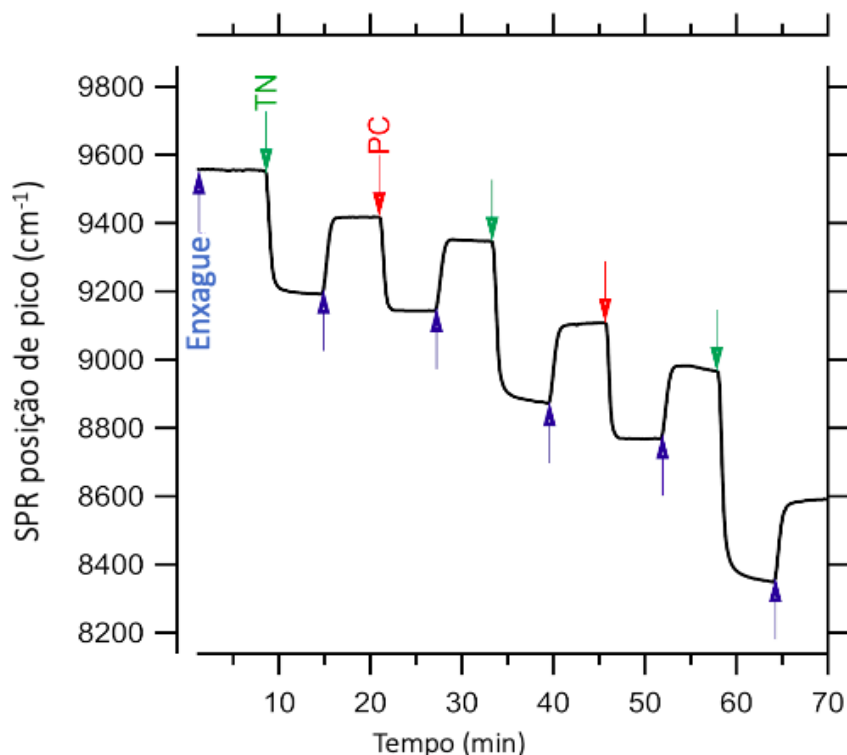
234 superficial e a camada terminal da PEM foram fatores determinantes para controlar a
235 resposta celular (DA CÂMARA et al., 2019; MARTINS, A. F. et al., 2020b). A PEM à
236 base de heparina/TN (11 camadas com a camada terminada em TN) foi a melhor superfície
237 para promover a adesão e crescimento celular de células tronco de humanos do tecido
238 adiposo (175×10^3 células por cm^2 de superfície de PEM após 7 dias de cultura celular),
239 tornando esse revestimento superficial potencialmente útil para regeneração de tecidos da
240 pele humana (DA CÂMARA et al., 2019; MARTINS, A. F. et al., 2020b).

241
242

243 5.2.3 Ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier (FT-SPR)

244

245 A montagem camada por camada da amostra (TN-PC)5 foi monitorada por
246 ressonância de plasma de superfície com transformada de Fourier (FT-SPR) (Fig. 18). Os
247 primeiros 6 min (seta azul) representam o enxágue das lamínulas de vidro oxidadas e
248 recobertas com ouro (substrato) com solução aquosa de ácido acético (pH 4,0). A seta
249 verde indica o início do próximo intervalo de 6 minutos quando a solução de polication
250 (TN) é introduzida na célula de fluxo. A grande queda na posição do pico FT-SPR durante
251 esta etapa é devido à adsorção do polication na superfície atribuída a diferença no índice de
252 refração do substrato antes e a após a deposição do polication (primeira camada).



253

254 **Figura 18** - Cinética representativa da deposição de PEMs (5 camadas) de TN-PC por
255 meio de medidas de FT-SPR (b). As setas representam o início das etapas de (azul),
256 adsorção de TN (policatión, seta verde) e adsorção de PC (poliânion, seta vermelha).

257 **Fonte** – Facchi et al. (2020)

258

259 Depois que a camada inicial de TN é adsorvida, o início de um enxágue
260 subsequente de 6 minutos é indicado pela segunda seta azul. Durante esta etapa de
261 enxágue, o pico de FT-SPR retorna a um valor próximo (mas não igual) ao valor inicial
262 obtido durante a primeira etapa de enxágue. A diferença entre a posição do pico FT-SPR
263 durante a primeira e a segunda etapa de enxágue deve-se à adsorção do derivado TN
264 carregado positivamente sobre o substrato oxidado. A seta vermelha indica o início do
265 próximo intervalo de 6 minutos quando a solução de poliânion (PC) é introduzida na célula
266 de fluxo. A sequência foi repetida até que uma PEM PC-TN de 5 camadas (terminando
267 com TN) fosse preparada. A análise FT-SPR sugeriu que a espessura dos PEMs de 5
268 camadas hidratadas com PBS foi de aproximadamente $5 \pm 0,5$ nm, enquanto para o PBS de
269 15 camadas hidratadas, a espessura foi de $16 \pm 0,9$ nm.

270

271

272 5.2.4 Microscopia de força atômica (AFM)

273

274 As imagens AFM fornecem informações sobre a topografia da superfície, bem
275 como a homogeneidade da superfície. A Figura 19 mostra imagens topográficas de AFM
276 tridimensionais representativas das superfícies PEMs montadas em pH 5,0 e fotografadas
277 em PBS após 1 e 7 dias de contato. A tabela 3 apresenta os parâmetros de rugosidade (R_q)
278 fornecidos pelo equipamento AFM. Os valores de R_q são usados para avaliar a rugosidade
279 da superfície. As PEMs preparados com 15 camadas mostram imagens AFM com
280 superfícies mais espessas e ásperas, em comparação com as PEMs preparadas com 5
281 camadas. Esse resultado concorda com os dados de XPS, nos quais indicaram que 5
282 camadas não foram suficientes para promover o recobrimento total do substrato de vidro.
283 No entanto, as PEMs PC-TN são mais espessas e ásperas que as PEMs CA-TN (Fig. 19). A
284 rugosidade aumenta à medida que o número de camadas aumenta (Fig. 19 e Tabela 3)
285 (BODDOHI et al., 2008; ALMODÓVAR et al., 2010).

286

287

Tabela 3 – Rugosidade média R_q (nm) das superfícies PEMs.

| Superfície | R_q (nm) após 1 dia em PBS | R_q (nm) após 7 dias em PBS |
|------------|------------------------------|-------------------------------|
|------------|------------------------------|-------------------------------|

288

| | | | |
|-----|-----------|------|------|
| (A) | (CA-TN)5 | 12±2 | 11±2 |
| | (CA-TN)15 | 23±3 | 60±9 |
| | (PC-TN)5 | 18±3 | 14±3 |
| | (PC-TN)15 | 31±5 | 41±6 |



(B)



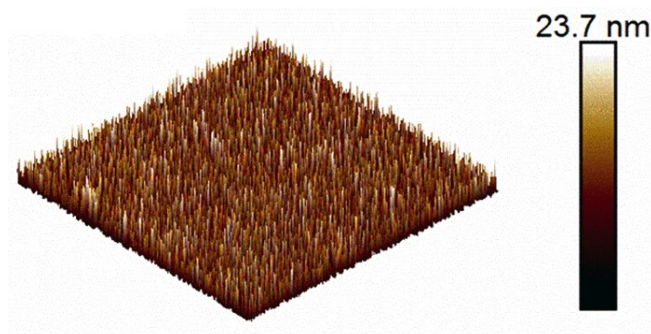
289

290 **Figura 19** - Imagens topográficas de AFM de $5,0 \mu\text{m} \times 5,0 \mu\text{m}$ representativas das PEMs
291 obtidas em PBS: (A) imagens obtidas após a exposição em PBS (pH 7,4) (1 dia) e (B)
292 imagens obtidas em PBS após 7 dias de exposição.

293 **Fonte** - Facchi et al. (2020).

294

295 As imagens AFM das PEMs são muito diferentes quando comparadas à
296 imagem AFM do substrato de vidro (Fig. 20). Portanto, o AFM confirma a deposição de
297 PEMs em substratos de vidro via técnica layer-by-layer.



298

299 **Figura 20** - Imagem AFM do substrato de vidro nativo (não oxidado).

300 **Fonte** - Facchi et al. (2020)

301

302 A PC é um polieletrólito mais fraco que a CA, porque os locais $-\text{COOH}$ na PC
303 ($\text{pK}_a=3, 6-4, 1$) estão parcialmente protonados em pH 5,0, enquanto os grupos $-\text{OSO}_3\text{H}$ na
304 CA ($\text{pK}_a = 2,2$) (OFORI-KWAKYE e FELL., 2001; RAMIN et al., 2019) estão em sua
305 grande maioria desprotonados. Portanto, em pH 5,0, acredita-se que a PC possa interagir

306 mais fortemente com o TN. A PC com alto grau de *O*-metoxilação (56%) foi associada
307 com o TN em solução tampão de pH 5,0. Esta condição de pH está próxima dos valores de
308 pK_a da PC (3, 6-4, 1) e TN (6,0). Além disso, as cadeias poliméricas de PC são mais
309 semelhantes a estrutura do TN, quando comparado a estrutura da CA. O TN possui uma
310 composição complexa que compreende taninos hidrolisados e condensados com sistemas
311 ramificados (GUIL-GUERRERO et al., 2016).

312 A PC usado aqui inclui 65% de resíduos de ácido D-galacturônico lineares ligados
313 por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ (LECLERE et al., 2013), com grau significativo de ramificação.
314 Entre 20 e 35% das unidades ramnogalacturonan-I (dissacarídeos de unidades de ácido
315 galacturônico ligadas a resíduos de L-ramnose) apresentam 20 a 80% de seus segmentos
316 substituídos por oligossacarídeos (LECLERE et al., 2013). Os grupos laterais incluem
317 principalmente resíduos de L-ramnose e D-galactose (linear ou ramificada). No entanto, a
318 estrutura da PC mostra estruturas de ramnogalacturonan-II com duas cadeias laterais
319 complexas ligadas a unidades de ácido D-galacturônico (LECLERE et al., 2013).

320 A CA (tipo *iota*) é um polissacarídeo linear, que apresenta dois locais de sulfato
321 ($pK_a=2,2$) por cada unidade de repetição de dissacarídeo. Em pH 5,0, esse polieletrólito
322 fornece soluções com alta densidade de carga negativa (RAMIN et al., 2019). Essas
323 declarações explicam por que as PEMs PC-TN apresentam rugosidade maior que as PEMs
324 CA-TN, e porque os PEMs baseados em TN têm rugosidade maior que os PEMs baseados
325 em quitosana (MARTINS, A. F. et al., 2020b).

326 As PEMs (PC-TN)₁₅ e (CA-TN)₁₅ possuem espessuras maiores que as PEMs
327 quitosana-PC ($R_q=3,5\text{nm}$), quitosana-CA ($R_q=2,6\text{nm}$) preparados com 15 camadas
328 (MARTINS, A. F. et al., 2020b). Como resultado, as superfícies preparadas com TN
329 apresentam maior rugosidade de superfície. Portanto, os PEMs construídos com estruturas
330 de polieletrólitos ramificados podem fornecer superfícies com maior rugosidade do que os
331 PEMs preparados com polieletrólitos lineares.

332

333

334 5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PEMs APÓS O TESTE DE ESTABILIDADE 335 REALIZADO EM PBS (7 DIAS)

336

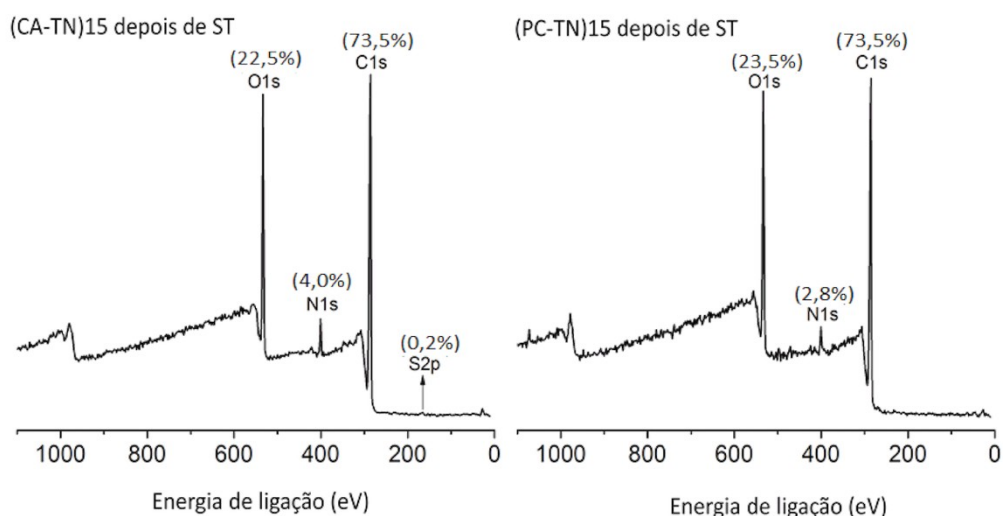
337 Todos as PEMs foram preparadas em pH 5,0. Esta condição de pH favorece a
338 protonação parcial do TN ($pK_a = 6,0$), resultando em grupos $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{NH}_2$ na estrutura do

339 TN (Fig. 17). A desprotonação parcial dos polieletrólitos deve permitir a automontagem
340 das cadeias poliméricas por meio de interações intermoleculares (ligação de hidrogênio e
341 dipolo-dipolo) (MARTINS, J. G. e DE OLIVEIRA; et al., 2018; DE OLIVEIRA et al.,
342 2020b; DE OLIVEIRA et al., 2019; MARTINS, J. G. et al., 2020).

343 Os espectros de XPS indicam que os PEMs permanecem na superfície do vidro
344 mesmo após a incubação em PBS por 7 dias (Fig. 21). A Tabela 4 mostra as porcentagens
345 atômicas relativas encontradas nas superfícies das PEMs determinadas por XPS antes e
346 depois do teste de estabilidade. O contato com PBS aumentou o conteúdo de C_{1s} e reduziu
347 os níveis de N_{1s} , O_{1s} e S_{2p} nas superfícies das PEMs. Este resultado está de acordo com
348 outro trabalho já relatado, que avaliou a estabilidade de PEMs à base de quitosana em PBS
349 (MARTINS, A. F. et al., 2020b).

350 Após a incubação em PBS, os espectros XPS mostram que o substrato de vidro
351 ainda está completamente coberto pelas PEMs (Fig. 21). No entanto, acredita-se que a
352 reorganização das cadeias poliméricas pode ocorrer após o contato com o PBS. A
353 automontagem deve alterar a porcentagem atômica relativa nas superfícies das PEMs
354 (Tabela 4). Portanto, os resultados dependem principalmente da composição da PEM (TN
355 e PC possuem estruturas químicas com alta heterogeneidade), bem como da área
356 superficial analisada no XPS.

357



358

359 **Figura 21** - Espectros de XPS (survey) das PEMs obtidas após o teste de estabilidade em
360 PBS (ST = indica após teste de estabilidade).

361

Fonte - Facchi et al. (2020)

362

363

364

365 **Tabela 4** - Conteúdos atômicos S_{2p}, C_{1s}, N_{1s} e O_{1s} determinados a partir das áreas de pico
 366 nos espectros de XPS obtidos antes (Fig. 15) e após (Fig. 20) o ensaio de estabilidade
 367 realizado em PBS por 7 dias a 37 °C.

| Superfície | Antes do ST (%) | | | | Depois do ST (%) | | | |
|------------|-----------------|------|-----|------|------------------|------|-----|------|
| | S2p | C1s | N1s | O1s | S2p | C1s | N1s | O1s |
| (CA-TN)15 | 0,7 | 60,9 | 4,7 | 29,9 | 0,2 | 73,5 | 4,0 | 22,5 |
| (PC-TN)15 | - | 64,7 | 4,0 | 31,2 | - | 73,5 | 2,8 | 23,5 |

368 ST = teste de estabilidade.

369

370

371 Também é possível que as PEMs apresentem dissolução parcial da bicamada
 372 superior; no entanto, esse efeito deve ser não significativo, uma vez que o TN é insolúvel
 373 em solução aquosa acima de pH 6,0 (MARTINS, A. F. et al., 2018). A durabilidade da
 374 PEM é confirmada a partir das medições de WCA. O WCA medido na superfície mais
 375 hidrofílica (CA-TN)15 aumentou ligeiramente de 22° (superfície conforme obtida) para
 376 26° após a exposição ao PBS (7 dias), enquanto o WCA determinado no (PC-TN)15 não
 foi alterado.

377

378 A presença das PEMs no substrato de vidro após teste de estabilidade pode ser
 379 confirmada a partir das imagens de AFM (Fig.19). A Figura 19B mostra imagens AFM das
 380 PEMs após 7 dias de exposição ao PBS. A Tabela 3 também representa os parâmetros
 381 de rugosidade da superfície (R_q) para estas PEMs. A rugosidade das PEMs (com 15
 382 camadas) aumentam após a exposição ao PBS. As PEMs devem se reorganizar devido à
 383 desprotonação parcial do TN em PBS. No entanto, a rugosidade das PEMs com 5 camadas
 384 diminuiu ligeiramente após 7 dias em PBS. A influência da reorganização das cadeias
 385 poliméricas deve ser minimizada quando as PEMs são formadas por apenas 5
 386 camadas. Imagens de AFM e dados de rugosidade da superfície evidenciam que todas as
 387 superfícies são estáveis em PBS, mesmo após 7 dias de contato (Fig. 19B). Esse fato
 viabiliza a aplicação das PEMs (revestimentos) em substratos sólidos.

388

389

390 5.4 ADESÃO INICIAL DE BACTÉRIAS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

391

392 Adesão e proliferação bacteriana com a formação de biofilme são questões críticas
 393 para o desenvolvimento de dispositivos biomédicos, filtros, embalagens, entre outros
 394 (VENKATRAMAN et al., 2008). A poluição nos ambientes aquáticos resulta em muitos
 395 males, incluindo acidificação da água, eutrofização, proliferação de microrganismo,

396 toxicidade direta em animais aquáticos, proliferação de agente patogênicos e formação de
397 biofilme causando danos econômicos na área de saneamento. Essa poluição pode afetar
398 adversamente a saúde humana (HONG et al., 2020).

399 Os biofilmes gerados por bactérias de importância ambiental e médica são: *E. coli*
400 (YANG et al., 2018), *Enterococcus faecalis* (PAPERS e RA, 2018), *Listeria*
401 *monocytogenes* (HUANG et al., 2018), *Salmonella sp.* (SARJIT e DYKES,
402 2017), *Gardnerella vaginalis* (CASTRO et al., 2017), *Staphylococcus aureus* e
403 *Pseudomonas aeruginosa* (SABINO et al., 2020).

404 Na área biomédica, a proliferação bacteriana e a formação de biofilme causam
405 hemorragias, coagulação do sangue e infecções (FRANZ et al., 2011 e VENKATRAMAN
406 et al., 2008). Na área ambiental, a formação de biofilme, causa a bioincrustação em
407 Estação de Tratamento de Água (ETA) e tubulações (TANG et al., 2013 e TANG et al.,
408 2015). Nesse sentido, o desenvolvimento de materiais de superfície com atividade
409 antiadesiva e antimicrobiana tem recebido atenção. Para superar problemas ocasionados
410 pela formação de biofilmes, propõem-se nesse estudo, o desenvolvimento de revestimentos
411 antimicrobianos à base de TN.

412 Avaliamos o potencial das PEMs em suprimir a formação de biofilme bacteriano
413 contra bactérias Gram-positiva (*S. aureus*) e Gram-negativa (*P. aeruginosa*). O número de
414 células bacterianas aderidas nas PEMs com integridade normal, ou seja, forma esférica
415 (coco) e para *S. aureus*, bacilo (forma de bastonete). Para *P. aeruginosa*, foi determinado
416 nas superfícies das PEMs e poliestireno (PS, controle negativo) (Tabela 5). O número de
417 células aderidas por cm² na superfície das PEMs e PS foi estimado em triplicata por meio
418 da contagem de células microbianas em imagens SEM (1000×) (Figs. 22, 23, 24 e 25).
419 Além disso, comparamos os resultados de adesão bacteriana nas PEMs à base de TN com
420 os resultados fornecidos sobre as PEMs à base de quitosana publicado em um estudo
421 anterior por nosso grupo de pesquisa (MARTINS, A. F. et al., 2020b). O PS é
422 citocompatível e não possui atividade antimicrobiana e antiadesiva contra bactérias
423 (VENKATRAMAN et al., 2008 e CHA et al., 2019). Devido a essas propriedades, o PS foi
424 escolhido como controle negativo para avaliar as atividades antimicrobianas das PEMs
425 (FOLLMANN et al., 2012).

426

427

428

429

430

431 **Tabela 5** - Número de células bacterianas com integridade normal aderidas por cm² nas
432 superfícies das PEMs e PS determinado após 6 e 24h de contato.

| Superfície | <i>S. aureus</i> (6 h) | <i>S. aureus</i> (24 h) | <i>P. aeruginosa</i> (6 h) | <i>P. aeruginosa</i> (24 h) | Ref |
|------------|------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| PS | 86±36*** | 446±91*** | 974±279**** | 2515±366**** | - |
| (CA-TN)15 | 5±3 | 9±3 | 5±2 | 4±3 | Este estudo |
| (PC-TN)15 | 6±4 | 8±3 | 0 | 3±2 | Este estudo |
| (PC-CS)15 | 23±4 | 18±12 | 11±4 | 47±25 | Martins, A. F. et al. (2020b) |
| (CA-CS)15 | 51±9 | 40±8 | 23±18 | 11±8 | Martins, A. F. et al. (2020b) |

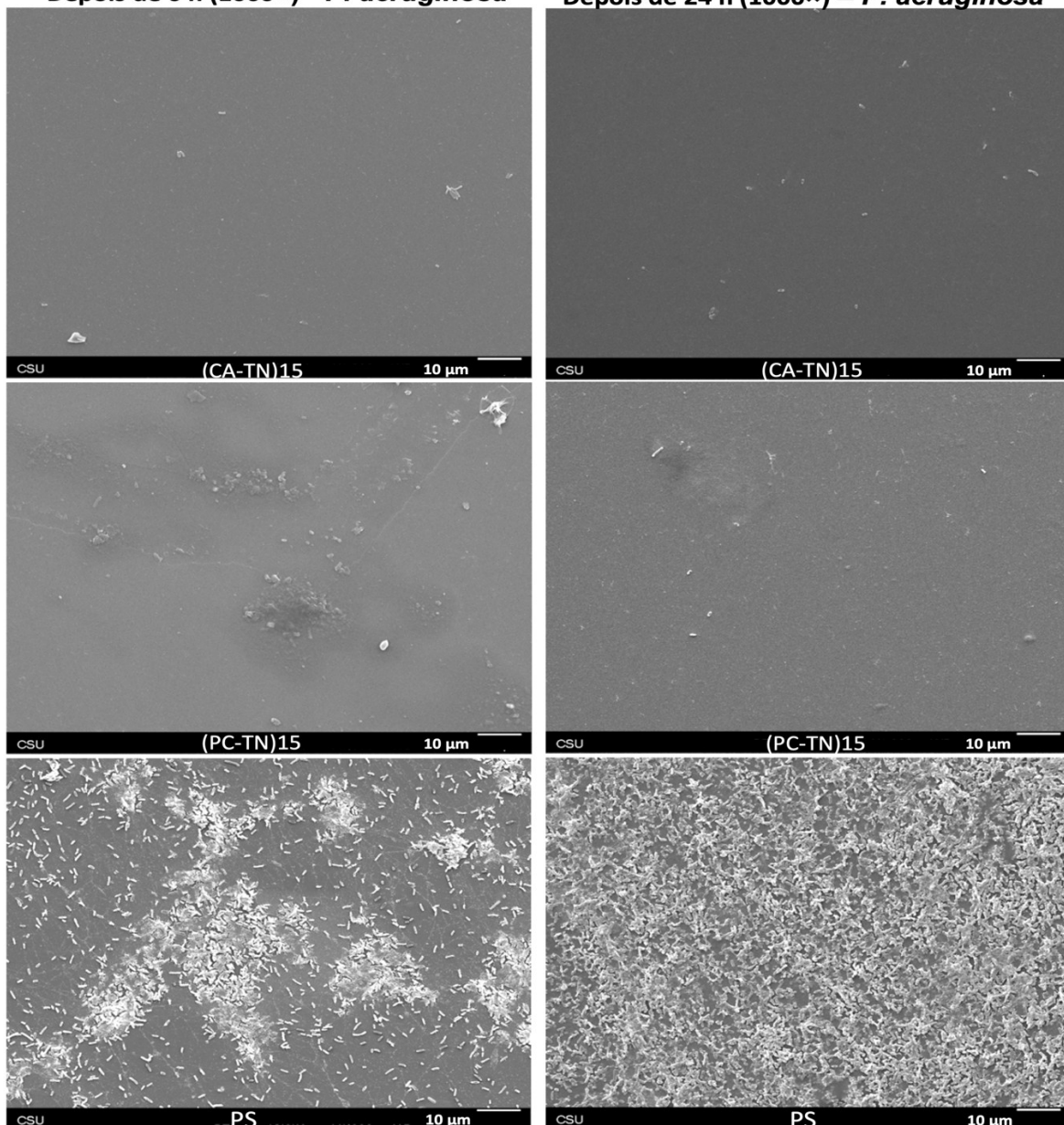
433

Resultados com diferenças significativas (***) e **** indicam $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$. (CA = *iota*-carragena, PC = pectina, TN = derivado de tanino, CS = quitosana, controle PS = poliestireno para cultura de tecidos).

435

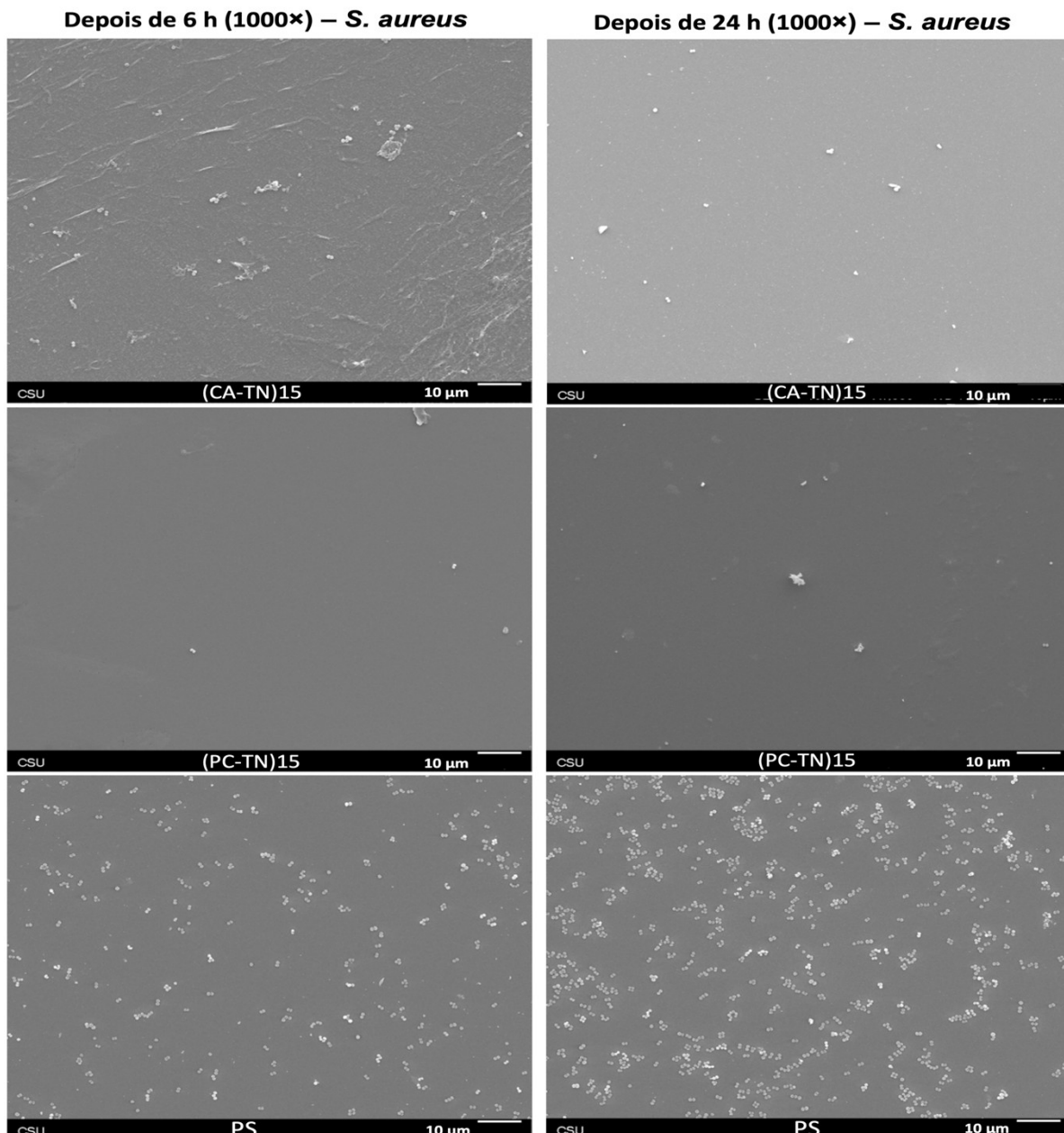
Depois de 6 h (1000×) - *P. aeruginosa*

Depois de 24 h (1000×) - *P. aeruginosa*



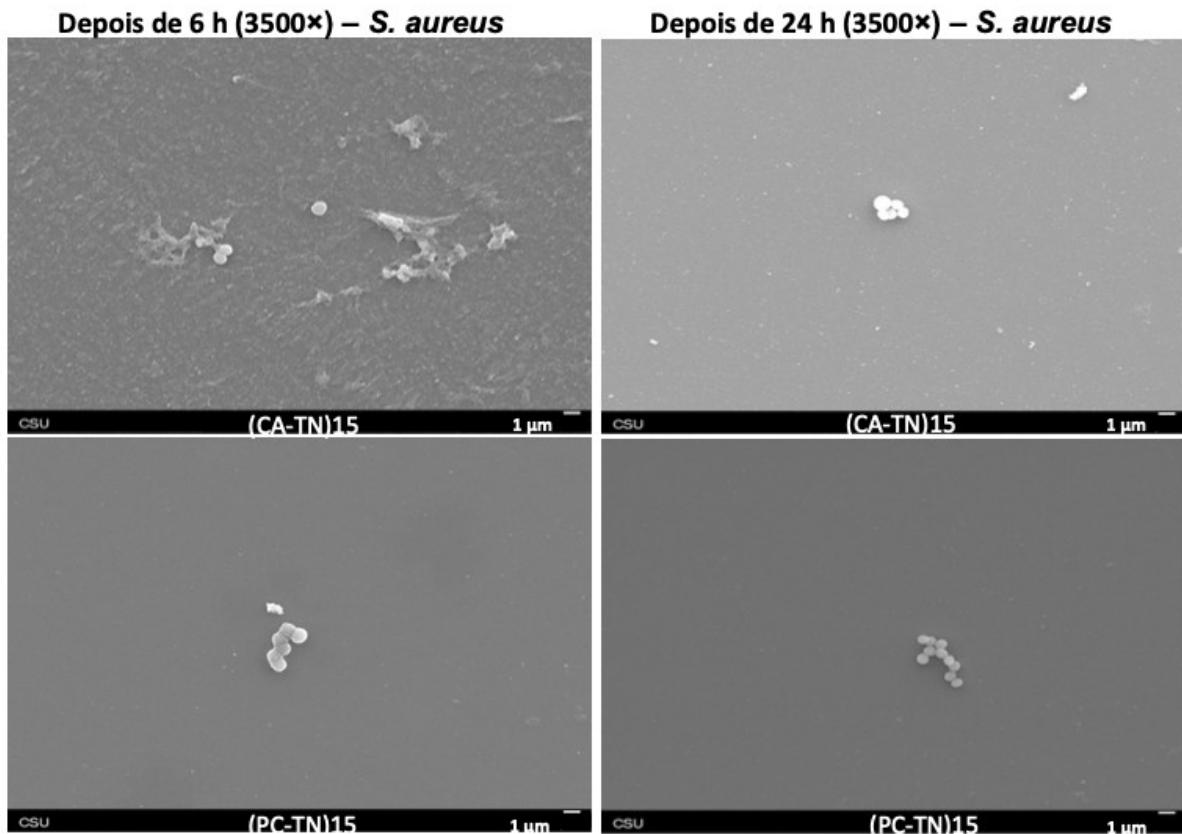
436

437 **Figura 22** - Imagens SEM das PEMs e PS incubados com *P. aeruginosa* por 6 h e 24 h a
438 37 °C. (CA = *iota*-carragenina, PC = pectina, TN = derivado de tanino e PS = controle de
439 poliestireno de cultura de tecidos.
440 **Fonte** - Facchi et al. (2020)



441 **Figura 23** - Imagens SEM das PEMs e PS incubados com *S. aureus* por 6 h e 24 h a 37
442 °C. (CA = *iota*-carragenina, PC = pectina, TN = derivado de tanino e PS = controle de
443 poliestireno de cultura de tecidos.
444 **Fonte** - Facchi et al. (2020)

445
446
447
448
449
450



452 **Figura 24** - Imagens SEM das PEMs e PS incubados com *S. aureus* por 6 h e 24 h a 37
453 °C. (CA = *iota*-carragenina, PC = pectina, TN = derivado de tanino e PS = controle de
454 poliestireno de cultura de tecidos.
455

456 **Fonte** - Facchi et al. (2020)

457

458

459

460

461

462

463

464

465

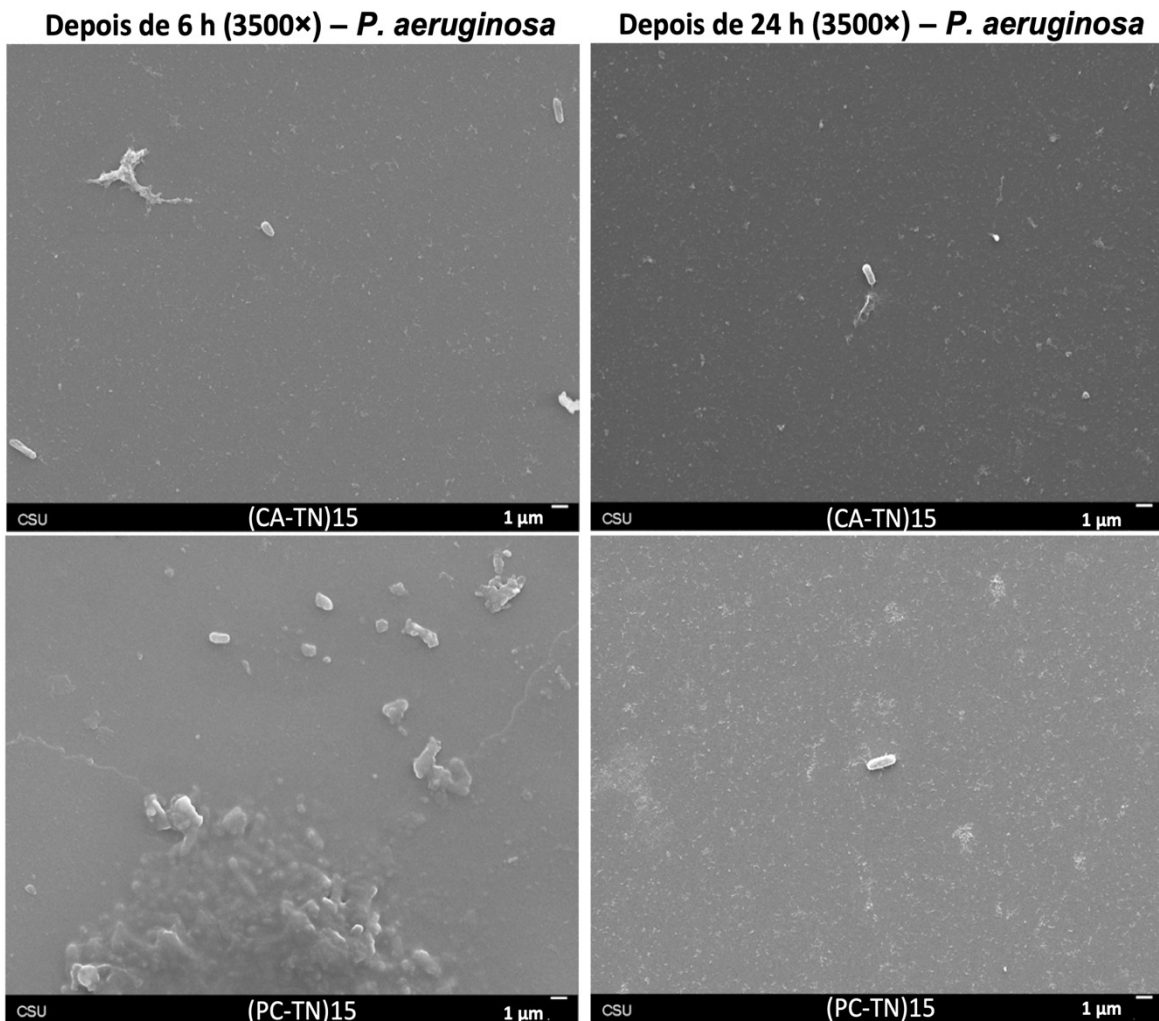
466

467

468

469

470



472
473 **Figura 25** - Imagens SEM das PEMs e PS incubados com *P. aeruginosa* por 6 h e 24 h a
474 37 °C. (CA = *iota*-carragenina, PC = pectina, TN = derivado de tanino e PS = controle de
475 poliestireno de cultura de tecidos.

476 **Fonte** - Facchi et al. (2020)

477

478

479

480 Os resultados apresentados na Tabela 5 são confirmados pelas imagens SEM das
481 PEMs em contato com as bactérias (Figs. 22, 23, 24 e 25). Observa-se um conteúdo muito
482 baixo de células bacterianas com integridade normal aderida nas PEMs à base de TN em
483 comparação com o controle PS (Tabela 5, Figs. 22, 23, 24 e 25). As PEMs (CA-TN)15 e
484 (PC-TN)15 exibem propriedades antiadesivas e bactericidas sobre bactérias Gram-positiva
485 e Gram-negativa. Comparado ao PS, o número de células microbianas aderidas nas PEMs
486 é muito baixo. Além disso, as células *S. aureus* e *P. aeruginosa* aderidas nas PEMs
apresentam formato irregular (Figs. 22, 23, 24 e 25).

487 Relatou-se que as PEMs de PC-quitosana e CA-quitosana (PEMs com 15 camadas,
488 sendo a última camada terminada com quitosana) montadas em pH 5,0 apresentaram
489 atividade antiadesiva e antimicrobiana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (MARTINS, A. F.
490 et al., 2020b). No entanto, as PEMs à base de quitosana não foram eficazes na prevenção
491 da adesão de células *S. aureus* nas primeiras 6 h de ensaio (MARTINS, A. F. et al, 2020b).
492 Além disso, parece que a ação antimicrobiana das PEMs à base de quitosana é expressa
493 após 24 h (MARTINS, A. F. et al., 2020b).

494 Fu et al. também mostrou que PEMs de heparina/quitosana (PEMs com 12
495 camadas, sendo a última camada terminada em quitosana) depositadas em substratos de
496 poli(tereftalato de etileno) funcionalizado com grupos aminos apresentaram atividades
497 antimicrobiana e antiadesiva contra *E. coli* (Gram-negativa). Nesse caso, as PEMs foram
498 preparadas em diferentes condições de pH (2,9, 3,8 e 6,0). Os resultados antimicrobianos
499 foram comparados com os resultados promovidos pelo filme nativo de poli(tereftalato de
500 etileno) (controle negativo) (FU et al., 2005). No entanto, como indicado por meio de
501 imagens SEM, várias células *E. coli* com integridade normal foram encontradas na
502 superfície da PEM à base de heparina/quitosana após 4 h de incubação (FU et al., 2005).

503 Follmann et al. relataram que PEMs à base de heparina/N,N,N-trimetilquitosana
504 apresentaram excelentes propriedades antimicrobianas contra *E. coli* (FOLLMANN et al.,
505 2012). A N,N,N-trimetilquitosana é frequentemente obtida a partir da metilação redutiva
506 de grupos amino nas redes de quitosana, usando o iodometano como agente redutor
507 (MARTINS et al., 2014 e VENKATRAMAN et al., 2008). O uso do iodometano tem
508 algumas desvantagens; é caro, volátil, reativo e ambientalmente desfavorável (MARTINS
509 et al., 2014). Aqui, pela primeira vez, apresentamos que PEMs à base de um derivado de
510 tanino catiônico pode fornecer revestimentos com características bactericida e antiadesiva.
511 Esses revestimentos têm potencial para evitar à formação de biofilme bacteriano já nas
512 primeiras horas de contato.

513 Fu e pesquisadores, bem como Follmann e colaboradores justificaram a capacidade
514 antiadesiva das PEMs à base de heparina/quitosana e heparina/N,N,N-trimetilquitosana
515 quanto à presença de densidade de cargas negativas na superfície das PEMs. A densidade
516 de carga negativa ocorre devido à presença de grupos sulfato ($-OSO_3^-$) e carboxilato
517 ($-COO^-$) provenientes da heparina, respectivamente (FOLLMANN et al., 2012 e FU et al.,
518 2005). Essas porções promovem superfícies hidrofílicas, diminuindo os WCAs das

519 superfícies em comparação com a superfícies do controle nativo de PS (FOLLMANN et
520 al., 2012) e poli(tereftalato de etileno), respectivamente (FOLLMANN et al., 2012 e FU et
521 al., 2005).

522 As paredes celulares bacterianas de espécies Gram-negativa possuem uma fina
523 camada de glicoproteínas coberta por uma camada espessa formada principalmente por
524 lipoproteínas e lipídios, enquanto as paredes celulares de bactérias Gram-positiva são
525 compostas principalmente por 15 a 40 camadas interconectadas de peptidoglicano
526 (MARTINS et al., 2014). Conforme relatado, superfícies hidrofóbicas, como as fornecidas
527 no PS e poli (tereftalato de etileno), podem interagir com as paredes celulares das
528 bactérias, favorecendo a adesão e o crescimento microbiano (FOLLMANN et al., 2012).
529 As PEMs devem fornecer superfícies hidrofílicas e duráveis para impedir a ligação e o
530 crescimento de células microbianas, bem como matar as células bacterianas aderidas.

531 A molhabilidade da superfície, a topografia e o pH de montagem devem influenciar
532 a adesão inicial e as atividades antimicrobianas das PEMs. No entanto, atribuímos as
533 propriedades antiadesivas e antimicrobianas significativas das PEMs à base de TN contra
534 *S. aureus* e *P. aeruginosa* à presença de grupos polifenólicos e catiônicos do TN. A
535 estrutura do TN contém estruturas típicas de flavonoides. Os materiais à base de
536 flavonóides têm atividades antimicrobianas atribuídas a capacidade para formarem
537 complexos com proteínas solúveis na membranas extracelulares bacterianas.

538 Os flavonoides podem interferir no funcionamento das membranas microbianas e
539 promover a morte celular (GUIL-GUERRERO et al., 2016). As PEMs (PC-TN)15 e (CA-
540 TN)15 foram preparadas em pH 5,0 e dados de XPS confirmaram à presença de grupos
541 $-NH_3^+$ em ambas as superfícies das PEMs. O polímero TN é composto principalmente de
542 taninos condensados contendo sítios $-NH_3^+$ (FACCHI et al., 2017b e LOPES et al., 2019 e
543 MARTINS, A. F. et al., 2018). As porções $-NH_3^+$ podem interagir eletrostaticamente com
544 o fosfolipídio aniônico dipalmitoil fosfatidil glicerol; o principal componente das
545 membranas celulares das bactérias (Gram-negativa e Gram-positiva). Esse tipo de
546 interação aumenta a permeabilidade da membrana e promove o vazamento de materiais
547 intracelulares (lactato desidrogenase, ácido nucleico e glicose) e suprime o transporte de
548 nutrientes para as células microbianas (MUÑOZ-BONILLA e FERNÁNDEZ-GARCÍA,
549 2012 e FOLLMANN et al., 2016). Todos esses eventos podem causar a morte de bactérias.

550 Os compostos à base de flavonoides (materiais fenólicos) também exibem ação
551 antimicrobiana contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (GUIL-GUERRERO et al., 2016).
552 Em alguns casos, compostos fenólicos (unidades de flavan-3-ol), como catequina e
553 epicatequina têm sido mais ativos que antibióticos (tetraciclina ou vancomicina em
554 concentrações semelhantes) (GUIL-GUERRERO et al., 2016). A atividade antimicrobiana
555 de ácidos fenólicos pode surgir devido à acidificação do citoplasma microbiano (GUIL-
556 GUERRERO et al., 2016). No entanto, fatores relacionados à lipofilicidade, como à
557 presença de grupos hidroxila e metoxil em substâncias químicas à base de flavonóides,
558 bem como a saturação de cadeias laterais, podem influenciar na atividade antimicrobiana
559 (GUIL-GUERRERO et al., 2016). Sugere-se que os anéis aromáticos com elevada
560 densidade de elétrons livre (nas cadeias fenólicas do TN, Fig. 5), bem como as porções
561 com densidade de carga negativa nas estruturas da CA (grupos sulfato), PC (grupos
562 carboxilato) e TN (grupos carboxilato provenientes de taninos hidrolisáveis), podem
563 impedir a fixação bacteriana nas superfícies das PEMs.

564 Conforme relatado em outros lugares, o fosfolipídio aniônico dipalmitoil fosfatidil
565 glicerol é o principal componente das paredes celulares de bactérias (Gram-negativa e
566 Gram-positiva) (MARTINS et al., 2014 e FOLLMANN et al., 2016). A repulsão entre o
567 fosfolipídio aniônico e os grupos carregados negativamente (porções sulfato, carboxilato e
568 fenólico) nas PEMs deve suprimir a adesão microbiana. A presença de TN nos PEMs
569 melhora o comportamento antiadesivo porque o TN contém grande disponibilidade de
570 elétrons em anéis aromáticos devido à sua estrutura química de tanino condensado.

571 O tampão de ácido acético-acetato usado para formar as PEMs também pode
572 fornecer íons H_3O^+ residuais e livres nas superfícies das PEMs. A liberação desses íons
573 pode promover a morte de bactérias. No entanto, todas as PEMs foram lavadas em água
574 deionizada, mantidas em PBS (12h) e, também esterilizadas em PBS por 30 min (sob
575 irradiação UV) antes de realizar os ensaios antimicrobianos.

576
577

578 6. CONCLUSÃO

579

580 As multicamadas de polieletrólitos (PEMs) desenvolvidas pela deposição de
581 polieletrólitos comerciais (derivado de tanino catiônico (TN), *iota*-carragena (CA) e

582 pectina (PC) na superfície de vidro oxidado, demonstraram excelente atividade bactericida
583 e antiadesiva contra bactérias Gram-negativa e Gram-positiva. As PEMs podem impedir a
584 ligação e o crescimento de células microbianas, podendo ser usado para revestir
585 dispositivos biomédicos, embalagens, tubulações, filtros, etc. A nova superfície
586 desenvolvida pode ter grande potencial quanto à supressão de formação de biofilmes
587 microbianos. Mostrou-se que as PEMs à base de TN podem significativamente evitar o
588 crescimento de bactérias Gram-negativa e Gram-positiva, impedindo assim os estágios
589 iniciais de colonização bacteriana. Além disso, o baixo número de bactérias aderidas nas
590 superfícies das PEMs ocorreram com estruturas danificadas, mesmo após apenas 6 h de
591 incubação. A forte ação antimicrobiana das PEMs ocorre devido à presença de sítios
592 $-NH_3^+$ e porções fenólicas na estrutura do TN. À presença de sítios aniônicos e hidrofílicos
593 (sulfato, carboxilato e a elevada densidade de elétrons nos anéis aromáticos fenólicos na
594 estrutura dos taninos) deve fornecer potencial antiadesivo contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*.
595 As PEMs podem impedir a deposição e o crescimento bactérias, sendo revestimentos
596 apropriados para serem aplicados em sistemas que exijam proteção contra proliferação de
597 bactérias e formação de bioincrustação.

598

599 7. REFERÊNCIAS

600

601

602 ABBAS, S.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; et al. Fabrication of polymeric
603 nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly.
604 **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81–92, 2015. Elsevier B.V. Disponível em:
605 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.10.006>>..

606

607 ABOU TALEB, M.; MOWAFI, S.; EL-SAYED, H. Utilization of keratin or sericin-based
608 composite in detection of free chlorine in water. **Journal of Molecular Structure**, v.
609 1202, 2020.

610

611 Água. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/agua.html>>. Acesso em: 27/7/2019.
612 Água | ONU Brasil. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/acao/agua/>>. Acesso em:
613 27/7/2019a.

614

615 Água | ONU Brasil. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/acao/agua/>>. Acesso em:
616 28/10/2019b.

617

618 AIOLA, S.; AMICO, G.; BATTAGLIA, P.; BATTISTELLI, E. The Large-Scale
619 Polarization Explorer (LSPE). **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193,

620 2002. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1208.0281>>. .
621
622 ALLISON, D. G.; LAMBERT, P. A. **Modes of Action of Antibacterial Agents**. Elsevier
623 Ltd, 2014.
624 ALMODÓVAR, J.; BACON, S.; GOGOLSKI, J.; KISIDAY, J. D.; KIPPER, M. J.
625 Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayer surface coatings can enhance
626 mesenchymal stem cell response to adsorbed growth factors. **Biomacromolecules**, v. 11, n.
627 10, p. 2629–2639, 2010.
628
629 ALMODÓVAR, J.; PLACE, L. W.; GOGOLSKI, J.; ERICKSON, K.; KIPPER, M. J.
630 Layer-by-layer assembly of polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers: A
631 spectroscopic study of hydrophilicity, composition, and ion pairing. **Biomacromolecules**,
632 v. 12, n. 7, p. 2755–2765, 2011.
633
634 ARIGA, K.; JI, Q.; MCSHANE, M. J.; et al. CM24-728 review.pdf. , 2012.
635
636 BANERJEE, J.; SINGH, R.; VIJAYARAGHAVAN, R.; et al. A hydrocolloid based
637 biorefinery approach to the valorisation of mango peel waste. **Food Hydrocolloids**, v. 77,
638 p. 142–151, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em:
639 <<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.09.029>>. .
640
641 BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes E Aplicações De Taninos
642 E Tanases Em Alimentos. **Alimentos & Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 63–72, 2004.
643
644 BODDOHI, S.; KILLINGSWORTH, C. E.; KIPPER, M. J. Polyelectrolyte multilayer
645 assembly as a function of pH and ionic strength using the polysaccharides chitosan and
646 heparin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 2021–2028, 2008.
647
648 BRASIL, I. M.; GOMES, C.; PUERTA-GOMEZ, A.; CASTELL-PEREZ, M. E.;
649 MOREIRA, R. G. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating
650 enhances quality of fresh-cut papaya. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1,
651 p. 39–45, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em:
652 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.01.005>>. .
653
654 BROWN, A. R.; GORDON, R. A.; HYLAND, S. N.; SIEGRIST, M. S.; GRIMES, C. L.
655 Chemical Biology Tools for Examining the Bacterial Cell Wall. **Cell Chemical Biology**, v.
656 27, n. 8, p. 1052–1062, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em:
657 <<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.07.024>>. .
658
659 BROWN, S.; SANTA MARIA, J. P.; WALKER, S. Wall teichoic acids of gram-positive
660 bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 313–336, 2013.
661
662 DA CÂMARA, P. C. F.; BALABAN, R. C.; HEDAYATI, M.; et al. Novel cationic
663 tannin/glycosaminoglycan-based polyelectrolyte multilayers promote stem cells adhesion
664 and proliferation. **RSC Advances**, v. 9, n. 44, p. 25836–25846, 2019.
665
666 CARRA, I.; FERNANDEZ LOZANO, J.; AUTIN, O.; BOLTON, J. R.; JARVIS, P.
667 Disinfection by-product formation during UV/Chlorine treatment of pesticides in a novel
668 UV-LED reactor at 285 nm and the mitigation impact of GAC treatment. **Science of the**

669 **Total Environment**, v. 712, p. 136413, 2020. Elsevier B.V. Disponível em:
670 <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136413>>. .
671

672 CASTRO, J.; FRANÇA, A.; BRADWELL, K. R.; et al. Comparative transcriptomic
673 analysis of *Gardnerella vaginalis* biofilms vs. planktonic cultures using RNA-seq. **npj**
674 **Biofilms and Microbiomes**, v. 3, n. 1, p. 0–1, 2017. Springer US. Disponível em:
675 <<http://dx.doi.org/10.1038/s41522-017-0012-7>>. .
676

677 CERCHIER, P.; PEZZATO, L.; MOSCHIN, E.; et al. Antifouling properties of different
678 Plasma Electrolytic Oxidation coatings on 7075 aluminium alloy. **International**
679 **Biodeterioration and Biodegradation**, v. 133, n. June, p. 70–78, 2018. Elsevier Ltd.
680 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.06.005>>. .
681

682 CHA, Y.; SON, B.; RYU, S. Effective removal of staphylococcal biofilms on various food
683 contact surfaces by *Staphylococcus aureus* phage endolysin LysCSA13. **Food**
684 **Microbiology**, v. 84, n. February, p. 103245, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em:
685 <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103245>>. .
686

687 CHAN, S. Y.; CHOO, W. S.; YOUNG, D. J.; LOH, X. J. Pectin as a rheology modifier:
688 Origin, structure, commercial production and rheology. **Carbohydrate Polymers**, v. 161,
689 p. 118–139, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em:
690 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.12.033>>. .
691

692 CHOI, O. K.; HENDREN, Z.; KIM, G. D.; DONG, D.; LEE, J. W. Influence of activated
693 sludge derived-extracellular polymeric substance (ASD-EPS) as bio-flocculation of
694 microalgae for biofuel recovery. **Algal Research**, v. 45, n. June 2019, p. 101736, 2020.
695 Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101736>>. .
696

697 COSTA, C. L.; LIMA, R. F. DE; PAIXÃO, G. C.; PANTOJA, L. D. M. Avaliação da
698 qualidade das águas subterrâneas em poços do estado do Ceará, Brasil. **Semina: Ciências**
699 **Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 2, p. 171–180, 2013.
700

701 DA CRUZ, J. A.; DA SILVA, A. B.; RAMIN, B. B. S.; et al. Poly(vinyl alcohol)/cationic
702 tannin blend films with antioxidant and antimicrobial activities. **Materials Science and**
703 **Engineering C**, v. 107, n. August 2019, p. 110357, 2020. Elsevier. Disponível em:
704 <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110357>>. .
705

706 CURTI, P. S.; DE MOURA, M. R.; RADOVANOVIC, E.; et al. Surface modification of
707 polystyrene and poly(ethylene terephthalate) by grafting poly(N-isopropylacrylamide).
708 **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1175–1180, 2002.
709

710 DIAS, I. P.; BARBIERI, S. F.; FETZER, D. E. L.; CORAZZA, M. L.; SILVEIRA, J. L.
711 M. Effects of pressurized hot water extraction on the yield and chemical characterization of
712 pectins from *Campomanesia xanthocarpa* Berg fruits. **International Journal of Biological**
713 **Macromolecules**, v. 146, p. 431–443, 2020. Elsevier B.V. Disponível em:
714 <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.261>>. .
715

716 DRANCA, F.; OROIAN, M. Extraction, purification and characterization of pectin from
717 alternative sources with potential technological applications. **Food Research**

718 **International**, v. 113, p. 327–350, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em:
719 <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.065>>. .
720

721 DULBERGER, C. L.; RUBIN, E. J.; BOUTTE, C. C. The mycobacterial cell envelope —
722 a moving target. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 47–59, 2020. Springer US.
723 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>>. .
724

725 FACCHI, D. P.; LIMA, A. C.; DE OLIVEIRA, J. H.; et al. Polyelectrolyte complexes
726 based on alginate/tanfloc: Optimization, characterization and medical application.
727 **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 129–138, 2017a.
728 Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.033>>. .
729

730 FACCHI, D. P.; LIMA, A. C.; DE OLIVEIRA, J. H.; et al. Polyelectrolyte complexes
731 based on alginate/tanfloc: Optimization, characterization and medical application.
732 **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 129–138, 2017b.
733 Elsevier. Disponível em:
734 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813016328264>>. Acesso em:
735 27/7/2019.
736

737 FACCHI, S. P.; DE OLIVEIRA, A. C.; BEZERRA, E. O. T.; et al. Polycationic condensed
738 tannin/polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers prevent microbial adhesion and
739 proliferation. **European Polymer Journal**, v. 130, n. April, p. 109677, 2020. Elsevier.
740 Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109677>>. .
741

742 FACCHI, S. P.; SCARIOT, D. B.; BUENO, P. V. A.; et al. Preparation and cytotoxicity of
743 N-modified chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery. **International Journal of**
744 **Biological Macromolecules**, v. 87, p. 237–245, 2016.
745

746 FARROKHANIA, M.; KARIMI, S.; ASKARIAN, S. Strong Hydrogen Bonding of Gallic
747 Acid during Synthesis of an Efficient AgNPs Colorimetric Sensor for Melamine Detection
748 via Dis-synthesis Strategy. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 7, n. 7, p.
749 6672–6684, 2019. research-article, American Chemical Society.
750

751 FOLLMANN, H. D. M.; MARTINS, A. F.; GEROLA, A. P.; et al. Antiadhesive and
752 antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of TMC/heparin complexes.
753 **Biomacromolecules**, v. 13, n. 11, p. 3711–3722, 2012.
754

755 FOLLMANN, H. D. M.; MARTINS, A. F.; NOBRE, T. M.; et al. Extent of shielding by
756 counterions determines the bactericidal activity of N,N,N-trimethyl chitosan salts.
757 **Carbohydrate Polymers**, v. 137, p. 418–425, 2016. Elsevier Ltd.
758

759 FRANZ, S.; RAMMELT, S.; SCHARNWEBER, D.; SIMON, J. C. Immune responses to
760 implants - A review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials.
761 **Biomaterials**, v. 32, n. 28, p. 6692–6709, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em:
762 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.078>>. .
763

764 FROMM, J. Wood formation of trees in relation to potassium and calcium nutrition. **Tree**
765 **Physiology**, v. 30, n. 9, p. 1140–1147, 2010.
766

767 FU, J.; JI, J.; YUAN, W.; SHEN, J. Construction of anti-adhesive and antibacterial
768 multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan. **Biomaterials**, v. 26,
769 n. 33, p. 6684–6692, 2005.
770
771 GOMES, F. A.; JÚNIOR, S. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO**
772 **FRANCISCO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS.**
773 2013.
774
775 GRAHAM, N.; GANG, F.; FOWLER, G.; WATTS, M. Characterisation and coagulation
776 performance of a tannin-based cationic polymer: A preliminary assessment. **Colloids and**
777 **Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 327, n. 1–3, p. 9–16, 2008a.
778
779 GRAHAM, N.; GANG, F.; FOWLER, G.; WATTS, M. Characterisation and coagulation
780 performance of a tannin-based cationic polymer: A preliminary assessment. **Colloids and**
781 **Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 327, n. 1–3, p. 9–16, 2008b.
782 Elsevier. Disponível em:
783 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775708003750>>. Acesso em:
784 28/7/2019.
785
786 GRUJIĆ, S. M.; RADOJEVIĆ, I. D.; VASIĆ, S. M.; ČOMIĆ, L. R.; TOPUZOVIĆ, M. D.
787 Antimicrobial and antibiofilm activities of secondary metabolites from *Vinca minor* L.
788 **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 572–578, 2015.
789
790 GUIL-GUERRERO, J. L.; RAMOS, L.; MORENO, C.; et al. Antimicrobial activity of
791 plant-food by-products: A review focusing on the tropics. **Livestock Science**, v. 189, p.
792 32–49, 2016. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.021>>. .
793
794 HEDAYATI, M.; KIPPER, M. J. Atomic force microscopy of adsorbed proteoglycan
795 mimetic nanoparticles: Toward new glycocalyx-mimetic model surfaces. **Carbohydrate**
796 **Polymers**, v. 190, p. 346–355, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em:
797 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.023>>. .
798
799 HEDAYATI, M.; NEUFELD, M. J.; REYNOLDS, M. M.; KIPPER, M. J. The quest for
800 blood-compatible materials: Recent advances and future technologies. **Materials Science**
801 **and Engineering R: Reports**, v. 138, n. March, p. 118–152, 2019. Elsevier. Disponível
802 em: <<https://doi.org/10.1016/j.mser.2019.06.002>>. .
803
804 HERNANDEZ-MONTELONGO, J.; LUCCHESI, E. G.; GONZALEZ, I.; et al.
805 Hyaluronan/chitosan nanofilms assembled layer-by-layer and their antibacterial effect: A
806 study using *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Colloids and Surfaces**
807 **B: Biointerfaces**, v. 141, p. 499–506, 2016. Elsevier B.V. Disponível em:
808 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.028>>. .
809
810 HERZBERG, M.; ELIMELECH, M. Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of
811 biofilm-enhanced osmotic pressure. **Journal of Membrane Science**, v. 295, n. 1–2, p. 11–
812 20, 2007.
813
814 HOBOT, J. A. **Bacterial Ultrastructure**. Elsevier Ltd, 2014.
815

816 HONG, P.; WU, X.; SHU, Y.; et al. Bioaugmentation treatment of nitrogen-rich
817 wastewater with a denitrifier with biofilm-formation and nitrogen-removal capacities in a
818 sequencing batch biofilm reactor. **Bioresource Technology**, v. 303, n. 7, p. 122905, 2020.
819 Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122905>>. .
820

821 HU, B.; PHAN, S. H. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy.
822 **Pharmacological Research**, v. 108, p. 57–64, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em:
823 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2016.04.010>>. .
824

825 HUANG, H.; SCHWAB, K.; JACANGELO, J. G. Pretreatment for low pressure
826 membranes in water treatment: A review. **Environmental Science and Technology**, v. 43,
827 n. 9, p. 3011–3019, 2009.
828

829 HUANG, J. Q.; WANG, Z.; XU, Z. L.; et al. Three-Dimensional Porous Graphene Aerogel
830 Cathode with High Sulfur Loading and Embedded TiO₂ Nanoparticles for Advanced
831 Lithium-Sulfur Batteries. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 42, p. 28663–
832 28670, 2016.
833

834 HUANG, Y.; MORVAY, A. A.; SHI, X.; et al. Comparison of oxidative stress response
835 and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* serotypes 4b and 1/2a. **Food Control**, v.
836 85, p. 416–422, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em:
837 <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.007>>. .
838

839 HUMPHRIES, M.; WILKINSON, A. E.; EDWARDS, B.; THOMPSON, J. S. The
840 densities of bacterial cell walls. **Biochemical Society Transactions**, v. 9, n. 5, p. 436–437,
841 1981.

842 IOST, R. M.; CRESPILO, F. N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry:
843 Applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1,
844 p. 1–10, 2012. Elsevier B.V. Disponível em:
845 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.040>>. .
846

847 JAMSAZZADEH KERMANI, Z.; SHPIGELMAN, A.; PHAM, H. T. T.; VAN LOEY, A.
848 M.; HENDRICKX, M. E. Functional properties of citric acid extracted mango peel pectin
849 as related to its chemical structure. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 424–434, 2015. Elsevier
850 Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.018>>. .
851

852 JAP, B. K.; WALIAN, P. J. Structure and functional mechanism of porins. **Physiological**
853 **Reviews**, v. 76, n. 4, p. 1073–1088, 1996.
854

855 KANG, S. T.; SUBRAMANI, A.; HOEK, E. M. V.; DESHUSSES, M. A.;
856 MATSUMOTO, M. R. Direct observation of biofouling in cross-flow microfiltration:
857 Mechanisms of deposition and release. **Journal of Membrane Science**, v. 244, n. 1–2, p.
858 151–165, 2004.
859

860 KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems &**
861 **Environment**, v. 74, n. 1–3, p. 65–76, 1999. Elsevier. Disponível em:
862 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880999000304>>. Acesso em:
863 27/7/2019.
864

865 KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E. Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a
866 comparative study. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2–3, p. 131–
867 138, 2001.

868

869 KIM, S. H.; KWAK, S. Y.; SOHN, B. H.; PARK, T. H. Design of TiO₂ nanoparticle self-
870 assembled aromatic polyamide thin-film-composite (TFC) membrane as an approach to
871 solve biofouling problem. **Journal of Membrane Science**, v. 211, n. 1, p. 157–165, 2003.
872

873 KRYSZOSIAK, P.; TOMASZEWSKI, W.; MEGIEL, E. High-density polystyrene-grafted
874 silver nanoparticles and their use in the preparation of nanocomposites with antibacterial
875 properties. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 498, p. 9–21, 2017. Disponível
876 em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002197971730293X>>. Acesso em:
877 30/7/2019.

878

879 LAM, Z.; ANLAUF, H.; NIRSCHL, H. Roller discharge of thin film filter cakes from
880 membranes: A key to the thin film filtration. **Separation and Purification Technology**, v.
881 221, n. February, p. 38–43, 2019. Elsevier. Disponível em:
882 <<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.03.062>>. .
883

884 LAU, W. J.; ISMAIL, A. F.; MISDAN, N.; KASSIM, M. A. A recent progress in thin film
885 composite membrane: A review. **Desalination**, v. 287, p. 190–199, 2012. Elsevier B.V.
886 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2011.04.004>>. .
887

888 LECLERE, L.; CUTSEM, P. VAN; MICHIELS, C. Anti-cancer activities of pH- or heat-
889 modified pectin. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4 OCT, n. October, p. 1–8, 2013.
890

891 LEDERER, E. The mycobacterial cell wall. **Pure and Applied Chemistry**, v. 25, n. 1, p.
892 135–166, 1971.
893

894 LI, J.; WANG, X.; ZHANG, T.; et al. A review on phospholipids and their main
895 applications in drug delivery systems. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 1. abr.
896 2015. Shenyang Pharmaceutical University.
897

898 LIKUS-CIEŚLIK, J.; PIETRZYKOWSKI, M. Vegetation development and nutrients
899 supply of trees in habitats with high sulfur concentration in reclaimed former sulfur mines
900 Jeziórko (Southern Poland). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n.
901 25, p. 20556–20566, 2017.
902

903 LIU, Y.; YANG, J.; ZHAO, Z.; et al. Formation and characterization of natural
904 polysaccharide hollow nanocapsules via template layer-by-layer self-assembly. **Journal of**
905 **Colloid and Interface Science**, v. 379, n. 1, p. 130–140, 2012. Elsevier Inc. Disponível
906 em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.04.058>>. .
907

908 LOPES, A. P.; SOUZA, P. R.; BONAFÉ, E. G.; et al. Purified glycerol is produced from
909 the frying oil transesterification by combining a pre-purification strategy performed with
910 condensed tannin polymer derivative followed by ionic exchange. **Fuel Processing**
911 **Technology**, v. 187, n. November 2018, p. 73–83, 2019. Elsevier. Disponível em:
912 <<https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2019.01.014>>. .
913

914 MA, H.; BURGER, C.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Fabrication and characterization of
 915 cellulose nanofiber based thin-film nanofibrous composite membranes. **Journal of**
 916 **Membrane Science**, v. 454, p. 272–282, 2014.

917

918 MARTINS, A. F.; FACCHI, S. P.; DA CÂMARA, P. C. F.; et al. Novel poly(ϵ -
 919 caprolactone)/amino-functionalized tannin electrospun membranes as scaffolds for tissue
 920 engineering. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 525, p. 21–30, 2018. Academic
 921 Press. Disponível em:
 922 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979718304454>>. Acesso em:
 923 28/7/2019.

924

925 MARTINS, A. F.; FACCHI, S. P.; FOLLMANN, H. D. M.; et al. Antimicrobial activity of
 926 chitosan derivatives containing N-quaternized moieties in its backbone: A review.
 927 **International Journal of Molecular Sciences**, 2014.

928

929 MARTINS, A. F.; VLCEK, J.; WIGMOSTA, T.; et al. Chitosan/iota-carrageenan and
 930 chitosan/pectin polyelectrolyte multilayer scaffolds with antiadhesive and bactericidal
 931 properties. **Applied Surface Science**, v. 502, p. 144282, 2020a. Elsevier B.V. Disponível
 932 em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2019.144282>>. .

933

934 MARTINS, A. F.; VLCEK, J.; WIGMOSTA, T.; et al. Chitosan/iota-carrageenan and
 935 chitosan/pectin polyelectrolyte multilayer scaffolds with antiadhesive and bactericidal
 936 properties. **Applied Surface Science**, v. 502, p. 144282, 2020b. Disponível em:
 937 <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433219330983>>. Acesso em:
 938 29/10/2019.

939

940 MARTINS, J. G.; CAMARGO, S. E. A.; BISHOP, T. T.; et al. Pectin-chitosan membrane
 941 scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. **Carbohydrate Polymers**,
 942 v. 197, n. April, p. 47–56, 2018. Elsevier. Disponível em:
 943 <<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.062>>. .

944

945 MARTINS, J. G.; FACCHI, D. P.; BERTON, S. B. R.; et al. Removal of Cu(II) from
 946 aqueous solutions imparted by a pectin-based film: Cytocompatibility, antimicrobial,
 947 kinetic, and equilibrium studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.
 948 152, p. 77–89, 2020.

949

950 MARTINS, J. G.; DE OLIVEIRA, A. C.; GARCIA, P. S.; KIPPER, M. J.; MARTINS, A.
 951 F. Durable pectin/chitosan membranes with self-assembling, water resistance and
 952 enhanced mechanical properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 188, p. 136–142, 2018.
 953 Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.112>>. .

954

955 MAZIYA, K.; DLAMINI, B. C.; MALINGA, S. P. Hyperbranched polymer nanofibrous
 956 membrane grafted with silver nanoparticles for dual antifouling and antibacterial properties
 957 against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. **Reactive**
 958 **and Functional Polymers**, v. 148, n. January, p. 104494, 2020. Elsevier. Disponível em:
 959 <<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104494>>. .

960

961 MCGINNIS, S.; SPENCER, S.; FIRNSTAHL, A.; et al. Human Bacteroides and total
 962 coliforms as indicators of recent combined sewer overflows and rain events in urban

963 creeks. **Science of The Total Environment**, v. 630, p. 967–976, 2018. Elsevier.
 964 Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969718304984>>.
 965 Acesso em: 27/7/2019.

966

967 MADIGAN, Michael T., MARTINKO , John M., BENDER, Kelly S., BUCKLEY ,
 968 Daniel H., STAHL, David A. **Microbiologia de Brock**. 14^o ed. 2016.

969

970 Ministério da Saúde. Disponível em:
 971 <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html?mobile>.
 972 Acesso em: 27/7/2019.

973

974 MUNARIN, F.; TANZI, M. C.; PETRINI, P. Advances in biomedical applications of
 975 pectin gels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 681–689,
 976 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.07.002>> .

977

978 MUÑOZ-BONILLA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Polymeric materials with
 979 antimicrobial activity. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 37, n. 2, p. 281–339,
 980 2012.

981

982 NAQASH, F.; MASOODI, F. A.; RATHER, S. A.; WANI, S. M.; GANI, A. Emerging
 983 concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A Review.
 984 **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 227–239, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em:
 985 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.058>> .

986

987 NGUYEN, P. A.; FIELD, C. M.; GROEN, A. C.; MITCHISON, T. J.; LOOSE, M. **Using**
 988 **supported bilayers to study the spatiotemporal organization of membrane-bound**
 989 **proteins**. Elsevier Ltd, 2015.

990

991 OFORI-KWAKYE, K.; FELL, J. T. Biphasic drug release: The permeability of films
 992 containing pectin, chitosan and HPMC. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226,
 993 n. 1–2, p. 139–145, 2001.

994

995 DE OLIVEIRA, A. C.; SABINO, R. M.; SOUZA, P. R.; et al. Chitosan/gellan gum ratio
 996 content into blends modulates the scaffolding capacity of hydrogels on bone mesenchymal
 997 stem cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 106, n. October 2019, p. 110258,
 998 2020a. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110258>> .

999

1000 DE OLIVEIRA, A. C.; SABINO, R. M.; SOUZA, P. R.; et al. Chitosan/gellan gum ratio
 1001 content into blends modulates the scaffolding capacity of hydrogels on bone mesenchymal
 1002 stem cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 106, n. October 2019, p. 110258,
 1003 2020b. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110258>> .

1004

1005 DE OLIVEIRA, A. C.; VILSINSKI, B. H.; BONAFÉ, E. G.; et al. Chitosan content
 1006 modulates durability and structural homogeneity of chitosan-gellan gum assemblies.
 1007 **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 114–123, 2019. Elsevier
 1008 B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.110>> .

1009

1010 OLMEDO-MARTÍNEZ, J. L.; VEGA-RIOS, A.; ARMANDO ZARAGOZA-
 1011 CONTRERAS, E. Influence of iota-carrageenan on the morphology and electrical

1012 properties of poly(ortho-phenylenediamine) based copolymers. **Synthetic Metals**, v. 258,
1013 n. August, p. 116192, 2019. Elsevier. Disponível em:
1014 <<https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2019.116192>>. .
1015

1016 ORÉFICE, R. L.; BRENNAN, A. Evaluation of the interactions between polymeric chains
1017 and surfaces with different structures performed by an atomic force microscope. **Materials**
1018 **Research**, v. 1, n. 1, p. 19–28, 1998.
1019

1020 PAPERS, M. C. P.; RA, M. L75\$4 edvhg txdqwlwdwlyh surwhrplfv ri vwurqj dqg zhdn
1021 elrilop iruphuv ri. , 2018.
1022

1023 PASMORE, M.; TODD, P.; SMITH, S.; et al. Effects of ultrafiltration membrane surface
1024 properties on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm initiation for the purpose of reducing
1025 biofouling. **Journal of Membrane Science**, v. 194, n. 1, p. 15–32, 2001.
1026

1027 PEREIRA KECHINSKI, C. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
1028 SUL ESCOLA DE ENGENHARIA DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA
1029 QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
1030 AVALIAÇÃO DO USO DE OZÔNIO E DE OUTROS TRATAMENTOS
1031 ALTERNATIVOS PARA A CONSERVAÇÃO DO MAMÃO PAPAIA (Carica pa.
1032 2007.
1033

1034 PONCE, A.; BROSTOFF, L. B.; GIBBONS, S. K.; et al. Elucidation of the Fe(III) Gallate
1035 Structure in Historical Iron Gall Ink. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 10, p. 5152–5158,
1036 2016.
1037

1038 PRANANTYO, D.; XU, L. Q.; KANG, E. T.; CHAN-PARK, M. B. Chitosan-Based
1039 Peptidopolysaccharides as Cationic Antimicrobial Agents and Antibacterial Coatings.
1040 **Biomacromolecules**, v. 19, n. 6, p. 2156–2165, 2018.
1041

1042 PRIOLO, M. A.; GAMBOA, D.; HOLDER, K. M.; GRUNLAN, J. C. Super gas barrier of
1043 transparent polymer-clay multilayer ultrathin films. **Nano Letters**, v. 10, n. 12, p. 4970–
1044 4974, 2010.
1045

1046 PRIOLO, M. A.; HOLDER, K. M.; GAMBOA, D.; GRUNLAN, J. C. Influence of clay
1047 concentration on the gas barrier of clay-polymer nanobrick wall thin film assemblies.
1048 **Langmuir**, v. 27, n. 19, p. 12106–12114, 2011.
1049

1050 QIU, X.; LI, Z.; LI, X.; ZHANG, Z. Flame retardant coatings prepared using layer by layer
1051 assembly: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, n. September 2017, p. 108–
1052 122, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.09.194>>. .
1053

1054 RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W. E.; et al. Electrospun nanofibers: Solving
1055 global issues. **Materials Today**, v. 9, n. 3, p. 40–50, 2006. Elsevier Ltd. Disponível em:
1056 <[http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(06\)71389-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(06)71389-X)>. .
1057

1058 RAMIN, B. B. S.; RUFATO, K. B.; SABINO, R. M.; et al. Chitosan/iota-
1059 carrageenan/curcumin-based materials prepared by precipitating miscible solutions
1060 prepared in ionic liquid. **Journal of Molecular Liquids**, v. 290, p. 1–10, 2019.

1061
1062 ROBAL, M.; BRENNER, T.; MATSUKAWA, S.; et al. Monocationic salts of
1063 carrageenans: Preparation and physico-chemical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p.
1064 656–667, 2017. Elsevier B.V.
1065
1066 SABINO, R. M.; KAUK, K.; MADRUGA, L. Y. C.; et al. Enhanced hemocompatibility
1067 and antibacterial activity on titania nanotubes with tanfloc/heparin polyelectrolyte
1068 multilayers. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 108, n. 4, p. 992–
1069 1005, 2020.
1070 SAQIB, J.; ALJUNDI, I. H. Membrane fouling and modification using surface treatment
1071 and layer-by-layer assembly of polyelectrolytes: State-of-the-art review. **Journal of Water**
1072 **Process Engineering**, v. 11, p. 68–87, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em:
1073 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.03.009>>. .
1074
1075 SARJIT, A.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of trisodium phosphate and sodium
1076 hypochlorite against Salmonella biofilms on abiotic surfaces with and without soiling with
1077 chicken juice. **Food Control**, v. 73, p. 1016–1022, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em:
1078 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.003>>. .
1079
1080 SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p.
1081 3875–3883, 1991.
1082
1083 ŠETKA, M.; CALAVIA, R.; VOJKŮVKA, L.; et al. Raman and XPS studies of ammonia
1084 sensitive polypyrrole nanorods and nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10,
1085 2019.
1086
1087 SHEN, B.; ZHANG, D.; WEI, Y.; et al. Preparation of Ag doped keratin/PA6 nanofiber
1088 membrane with enhanced air filtration and antimicrobial properties. **Polymers**, v. 11, n. 9,
1089 p. 1–13, 2019.
1090
1091 SIDDIQI, M. **Environmental Health Criteria 216 DISINFECTANTS AND**
1092 **DISINFECTANT BY-PRODUCTS**. 2004.
1093
1094 SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. **Cold Spring**
1095 **Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010. Cold Spring Harbor
1096 Laboratory Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452953>>.
1097 Acesso em: 30/7/2019.
1098
1099 SMISTAD, G.; BØYUM, S.; ALUND, S. J.; SAMUELSEN, A. B. C.; HIORTH, M. The
1100 potential of pectin as a stabilizer for liposomal drug delivery systems. **Carbohydrate**
1101 **Polymers**, v. 90, n. 3, p. 1337–1344, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em:
1102 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.002>>. .
1103
1104 SMITH, M. C.; CRIST, R. M.; CLOGSTON, J. D.; MCNEIL, S. E. Zeta potential: a case
1105 study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Analytical and Bioanalytical**
1106 **Chemistry**, v. 409, n. 24, p. 5779–5787, 2017. Analytical and Bioanalytical Chemistry.
1107
1108 SPERANDEO, P.; MARTORANA, A. M.; POLISSI, A. The Lpt ABC transporter for
1109 lipopolysaccharide export to the cell surface. **Research in Microbiology**, v. 170, n. 8, p.

1110 366–373, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em:
1111 <<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2019.07.005>>. .
1112

1113 STEITZ, R.; LEINER, V.; SIEBRECHT, R.; REGINE V. KLITZING. Influence of the
1114 ionic strength on the structure of polyelectrolyte films .pdf. **Elsevier**, v. 163, n. 1, p. 63–70,
1115 2000.
1116

1117 TANG, L.; GU, W.; YI, P.; et al. Bacterial anti-adhesive properties of polysulfone
1118 membranes modified with polyelectrolyte multilayers. **Journal of Membrane Science**, v.
1119 446, p. 201–211, 2013. Elsevier. Disponível em:
1120 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.memsci.2013.06.031>>. .
1121

1122 TANG, L.; HUYNH, K. A.; FLEMING, M. L.; LARRONDE-LARRETICHE, M.; CHEN,
1123 K. L. Imparting antimicrobial and anti-adhesive properties to polysulfone membranes
1124 through modification with silver nanoparticles and polyelectrolyte multilayers. **Journal of**
1125 **Colloid and Interface Science**, v. 451, p. 125–133, 2015. Elsevier Inc. Disponível em:
1126 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.051>>. .
1127

1128 TSAGKARI, E.; SLOAN, W. T. Impact of Methylobacterium in the drinking water
1129 microbiome on removal of trihalomethanes. **International Biodeterioration and**
1130 **Biodegradation**, v. 141, n. July 2018, p. 10–16, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em:
1131 <<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.07.015>>. .
1132

1133 UNICEF. 2,1 Bilhões De Pessoas Não Têm Acesso a Água Potável Em Casa, E Mais Do
1134 Dobro De Pessoas Não Tem Acesso a Saneamento Seguro. , 2017. Disponível em:
1135 <[https://www.unicef.org/angola/comunicados-de-imprensa/21-bilhoes-de-pessoas-nao-](https://www.unicef.org/angola/comunicados-de-imprensa/21-bilhoes-de-pessoas-nao-tem-acesso-agua-potavel-em-casa-e-mais-do-dobro)
1136 [tem-acesso-agua-potavel-em-casa-e-mais-do-dobro](https://www.unicef.org/angola/comunicados-de-imprensa/21-bilhoes-de-pessoas-nao-tem-acesso-agua-potavel-em-casa-e-mais-do-dobro)>. .
1137

1138 VENKATRAMAN, S.; BOEY, F.; LAO, L. L. Implanted cardiovascular polymers:
1139 Natural, synthetic and bio-inspired. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 33, n. 9, p.
1140 853–874, 2008.
1141

1142 VIANA, J. L. M.; DOS SANTOS, S. R. V.; DOS SANTOS FRANCO, T. C. R.;
1143 ALMEIDA, M. A. P. Occurrence and partitioning of antifouling booster biocides in
1144 sediments and porewaters from Brazilian Northeast. **Environmental Pollution**, v. 255,
1145 2019.
1146

1147 VORAGEN, A. G. J.; COENEN, G. J.; VERHOEF, R. P.; SCHOLS, H. A. Pectin, a
1148 versatile polysaccharide present in plant cell walls. **Structural Chemistry**, v. 20, n. 2, p.
1149 263–275, 2009.
1150

1151 WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future.
1152 **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 195–226, 2009. Elsevier. Disponível em:
1153 <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975008001109>>. Acesso em:
1154 28/7/2019.
1155

1156 WANG, J.; CHEN, H. Catalytic ozonation for water and wastewater treatment: Recent
1157 advances and perspective. **Science of the Total Environment**, v. 704, p. 135249, 2020.
1158 Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135249>>. .

1159
1160 WANG, J.; GONG, T.; XIAN, Q. Formation of haloacetic acids from different organic
1161 precursors in swimming pool water during chlorination. **Chemosphere**, v. 247, p. 125793,
1162 2020. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125793>>.
1163
1164 WANG, L.; FANG, F.; LIU, Y.; LI, J.; HUANG, X. Facile preparation of heparinized
1165 polysulfone membrane assisted by polyfopamine/polyethyleneimine co-deposition for
1166 simultaneous LDL selectivity and biocompatibility. **Applied Surface Science**, v. 385, p.
1167 308–317, 2016. Elsevier B.V. Disponível em:
1168 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2016.05.134>>.
1169
1170 WANG, X.; FANG, D.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Nanofiltration membranes based on thin-
1171 film nanofibrous composites. **Journal of Membrane Science**, v. 469, p. 188–197, 2014.
1172
1173 YANG, G.; TAN, H.; LI, S.; et al. Application of engineered yeast strain fermentation for
1174 oligogalacturonides production from pectin-rich waste biomass. **Bioresource Technology**,
1175 v. 300, p. 122645, 2020. Elsevier Ltd. Disponível em:
1176 <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122645>>.
1177
1178 YANG, X.; WANG, H.; HE, A.; TRAN, F. Biofilm formation and susceptibility to
1179 biocides of recurring and transient Escherichia coli isolated from meat fabrication
1180 equipment. **Food Control**, v. 90, p. 205–211, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em:
1181 <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.050>>.
1182
1183 YAPO, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins -
1184 A new hypothetical model. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 373–385, 2011.
1185 Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.05.065>>.
1186
1187 ZHOU, S.; XIA, Y.; LI, T.; et al. Degradation of carbamazepine by UV/chlorine advanced
1188 oxidation process and formation of disinfection by-products. **Environmental Science and**
1189 **Pollution Research**, v. 23, n. 16, p. 16448–16455, 2016.
1190
1191 ZHU, J.; HOU, J.; ZHANG, Y.; et al. Polymeric antimicrobial membranes enabled by
1192 nanomaterials for water treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 550, n. December
1193 2017, p. 173–197, 2018. Elsevier B.V. Disponível em:
1194 <<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.12.071>>.
1195