# UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

KEVIN FIGUEIREDO DOS SANTOS

# ANÁLISE FRACTAL E MODELOS MATEMÁTICOS PARA A INVESTIGAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTOTÉRMICA DE *Candida albicans* USANDO NANOTUBOS DE CARBONO

BARRA DO GARÇAS-MT 2019

#### KEVIN FIGUEIREDO DOS SANTOS

# ANÁLISE FRACTAL E MODELOS MATEMÁTICOS PARA A INVESTIGAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTOTÉRMICA DE *Candida albicans* USANDO NANOTUBOS DE CARBONO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Mato Grosso como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Nara Cristina de Souza Co-orientador: Dr. Josmary Rodrigues Silva

# BARRA DO GARÇAS-MT 2019

# Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

D722a	dos Santos, Kevin Figueiredo. Análise Fractal e Modelos Matemáticos para a Investigação da Inativação Fototérmica de Candida albicans Usando Nanotubos de Carbono / Kevin Figueiredo dos Santos 2019 52 f. : il. color. ; 30 cm.
	Orientadora: Nara Cristina de Souza. Co-orientador: Josmary Rodrigues Silva. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Barra do Garças, 2019. Inclui bibliografia.
	1. nanomateriais. 2. viabilidade celular. 3. leis de escala. 4. microscopia de força atômica. 5. análise de imagens. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais

# Certificado de aprovação

**Título:** ANÁLISE FRACTAL E MODELOS MATEMÁTICOS PARA A INVESTIGAÇÃO DA INATIVAÇÃO FOTOTÉRMICA DE *Candida albicans* USANDO NANOTUBOS DE CARBONO

Autor: Kevin Figueiredo dos Santos

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Nara Cristina de Souza

Aprovado em 21 de fevereiro de 2019.

Comissão examinadora:

Profa. Drª. Nara C. de Souza Orientadora

live?

Profa. Dr<sup>a</sup>. Clarissa A. Olivati UNESP/Presidente Prudente – SP

Paula C. de S. Souto

Profa. Dr<sup>a</sup>. Paula Cristina de S. Souto UFMT/CUA

# DEDICATÓRIA

A minha família e ao Grupo de Materiais Nanoestruturados por todo apoio nesta jornada.

#### AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Gildo** e **Juscineide**, pelo imenso carinho e disposição em me ajudar. Sou profundamente grato por todo incentivo, pela paciência e por serem esse grande exemplo de conduta para mim.

As minhas irmãs, **Kimberly** e **Ariel**, e a minha prima **Thamires**, pelo suporte e os momentos de descontração. Muito obrigado pelas palavras de conforto!

A professora Dra. Nara C. de Souza e ao professor Dr. Josmary R. Silva pela gigantesca dedicação, por todo conhecimento compartilhado, pelas orientações e amizade ao longo dos anos. Sou imensamente grato pelas oportunidades, por toda paciência, pelos ensinamentos e todas as conquistas. A vocês meu eterno agradecimento! Agradeço também a "pequena" Alice, por toda energia e alegria trazida ao laboratório, arrancando sorrisos nos dias mais difíceis.

Aos meus amigos do PPGMat e ao Grupo de Materiais Nanoestruturados, **Romário**, **Filipe**, **Graciela**, **Tarquin**, **Karla**, **Hérica**, **Andrelina**, **Maria Fernanda**, **Alessandro**, **Leandro**, **Marco Antônio**, **Marcos**, **Tiego**, **Alberto**, **Rita**, **Thaynara**, **João** e **Rhudy**, por todas as brincadeiras e aprendizados. Em especial agradeço ao **Marcos**, pela parceria e amizade ao longo dos anos, assim como, pela referência como estudante. Gostaria de destacar também minha gratidão ao **Romário**, pela disposição e por todos os ensinamentos. Se analisarmos o trabalho a seguir, cada técnica e/ou experimento executado teve sem dúvida uma grande contribuição dessas pessoas. Muito obrigado pessoal!

Aos membros de bancas e todas as pessoas que colaboraram para o aperfeiçoamento e elaboração deste trabalho.

A Universidade Federal de Mato Grosso, **UFMT**, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, **PPGMat**, bem como, todos os professores que contribuíram para minha formação e aprendizagem.

A Marcia Helena secretária do PPGMat, pelo auxílio com documentações e processos.

Por fim, a CAPES e ao CNPq por todo apoio financeiro.

#### **RESUMO**

*Candida albicans* é responsável pela maioria das infecções nosocomiais que afetam pacientes imunocomprometidos. Antifúngicos sistêmicos podem promover a resistência microbiana, e isto tem levado a busca por tratamentos alternativos, tal como a terapia fototérmica, (PTT). A PTT parte da premissa de que a interação da radiação eletromagnética, geralmente radiação infravermelha, com um agente fototérmico gera aquecimento que pode levar à destruição de células tumorais e morte de microrganismos. Nanotubos de carbono, (CNTs), são uma classe de nanomateriais que têm potencial para aplicações em sistemas biomédicos, incluindo entrega controlada de fármacos, biossensores e scaffolds para engenharia de tecidos e medicina regenerativa. Além disso, por absorverem radiação na região do infravermelho, induzindo aumento da temperatura, são candidatos a agentes fototérmicos. Neste trabalho, a inativação fototérmica da C. albicans foi avaliada usando CNTs de múltiplas paredes associados à radiação laser no infravermelho próximo. Os mecanismos envolvidos na inativação, foram avaliados através de estudos de susceptibilidade celular e análise de imagens microscópicas associadas a modelos matemáticos e conceitos fractais. Os resultados indicam que o contato direto entre as células fúngicas e os CNTs sem irradiação, não levam à morte celular, ao passo que o processo mediado por laser é eficaz na inativação, que pode ter sido causada pela ruptura das paredes celulares. A aplicação das leis de escala e conceitos fractais indicam que nos grupos controles há dois regimes distintos delimitados pelo diâmetro médio do microrganismo. Para comprimentos maiores que esse diâmetro a superfície é descrita pelo modelo de Eden e, para comprimentos menores a superfície é quase-Euclidiana. Para os grupos irradiados de C. albicans + CNTs as superfícies apresentam apenas um regime, com fractais self-affine descritos por KPZ (Kardar-Parisi-Zhang). A análise da fractalidade do sistema descrita por modelos matemáticos podem auxiliar na identificação de novas estratégias para inativação de microrganismos e futuras aplicações de CNTs.

**Palavras-chave:** nanomateriais, viabilidade celular, leis de escala, microscopia de força atômica, análise de imagens.

#### ABSTRACT

Candida albicans is responsible for the majority of nosocomial infections affecting immunocompromised patients. Systemic antifungals may promote microbial resistance, which has led to the search for alternative treatments, such as photothermal therapy (PTT). PTT assumes that the interaction of electromagnetic radiation with a photothermal agent generates heat that can lead to the destruction of tumor cells and the death of microorganisms. Carbon nanotubes (CNTs) have the potential for applications in biomedical systems, including acting as controlled deliverers of drugs, biosensors and scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. Furthermore, the absorption of radiation by CNTs in the infrared region induces an increase in temperature, which makes CNTs candidates for photothermal agents. In this work, the photothermal inactivation of C. albicans was evaluated by multiple wall CNTs associated with laser radiation in the near-infrared region. The mechanisms that are involved in inactivation were evaluated through cell susceptibility studies and an analysis of microscopic images that are associated with mathematical models and fractal concepts. The results indicate that direct contact between the cells and CNTs without irradiation does not lead to cell death, whereas the laser-mediated process is effective in inactivation. The application of the laws of scale and fractal concepts indicate that in the control groups, there are two distinct regimes that are delimited by the mean diameter of the microorganisms, as described by the Eden model and by the quasi-Euclidean surface. For the irradiated groups, the surfaces present only one regime described by KPZ. The analysis of the fractality of the system by mathematical models can help in the identification of new strategies for the inactivation of microorganisms.

Keywords: nanomaterials, cell viability, scale laws, atomic force microscopy, image analysis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Número de mortes associadas à AMR, comparado a outras grandes causas [9]12
Figura 2 -	Ilustração das estruturas: (a) grafite (em destaque o grafeno), (b) nanotubo de carbono de parede simples e (c) nanotubo de carbono de múltiplas paredes [33,34]
Figura 3 -	Eventos que conduzem ao efeito fototérmico [52]15
Figura 4 -	Exemplo de fractais: (a) estatístico (real) e (b) determinístico (teórico). Os quadros à esquerda mostram as figuras originais. Enquanto, os quadros à direita mostram sucessivas ampliações da região central [69]16
Figura 5 -	Representação das etapas de crescimento de uma superfície arbitrária [67]18
Figura 6 -	Exemplo de um aglomerado Eden formado a partir de uma linha [89]20
Figura 7 -	Viabilidade celular da dispersão de <i>C. albicans</i> . O grupo controle é composto da análise da dispersão de <i>C. albicans</i> ; <i>C. albicans</i> irradiada (50 J/cm <sup>2</sup> ); <i>C. albicans</i> + MWCNTs (sem irradiar). Os outros resultados são referentes a mistura das dispersões de <i>C. albicans</i> + MWCNTs irradiadas com diferentes fluências. Os grupos com resultados significativamente diferente entre si, estão indicados no gráfico
Figura 8 -	Microscopia de fluorescência das dispersões de <i>C. albicans</i> . A dimensão das barras de escala é 50 µm
Figura 9 -	Imagens de AFM para <i>C. albicans</i> (grupos controles e irradiados)35
Figura 10 -	Perfis de altura obtidos de uma seção transversal das imagens de microscopia de força atômica
Figura 11 -	Gráfico log-log da rugosidade, W, em função do tamanho da janela de varredura, L, para a superfície de <i>C. albicans</i> + MWCNTs. O detalhe na figura corresponde ao perfil de altura, indicando que o comprimento de crossover, $L_x$ , corresponde ao diâmetro médio dos fungos
Figura 12 -	Gráfico log-log da rugosidade, W, em função do tamanho da janela de varredura, L, para a superfície de <i>C. albicans</i> + MWCNTs irradiada com fluência de 30 J/cm <sup>2</sup>
Figura A1 -	Ilustração do sistema empregado para investigação do efeito fototérmico47

Figura A2 - Ambiente de processamento e análise de imagens Nanosurf Report v5.1......49

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFM	Microscopia de força atômica
AMR	Resistência antimicrobiana
ATCC	American type culture collection
CNTs	Nanotubos de carbono
CVD	Deposição química em fase vapor
D	Dimensão espacial
DF	Dimensão fractal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
$\mathbf{F}(\mathbf{x},\mathbf{t})$	Flutuação aleatória no processo de deposição
h(i,t)	Altura da coluna <i>i</i> no tempo <i>t</i>
h(x,t)	Altura da interface na posição x e no tempo t
$\overline{\mathbf{h}}(\mathbf{t})$	Altura média da superfície no tempo t
KPZ	Kardar-Parisi-Zhang
L	Tamanho da Janela analisada
Laser	Light amplification by stimulated emission of radiation
Lx	Comprimento de crossover
MWCNTs	Nanotubos de carbono de múltiplas paredes
Nd:YAG	Neodymium-doped yttrium aluminium garnet
NIR	Radiação no infravermelho próximo
РТА	Agentes fototérmicos
PTT	Terapia fototérmica
RNA	Ácido ribonucleico
SWCNTs	Nanotubos de carbono de parede simples
t <sub>sat</sub>	Tempo de saturação ou tempo de crossover
W(L,t)	Rugosidade da interface
W <sub>sat</sub>	Saturação da rugosidade da interface
α	Expoente de rugosidade
β	Expoente de crescimento
λ	Constante relacionada a tensão superficial
$\boldsymbol{\lambda}^{*}$	Constante associada ao crescimento lateral da interface
$\phi$	Número médio de partículas/células depositadas no sítio x

# SUMÁRIO

1	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3	INTRODUÇÃO	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Susceptibilidade da C. albicans	32
5.2	Análise microscópica	33
5.3	Leis de escala dinâmica e conceitos fractais	37
6	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41
	APÊNDICE A - METODOLOGIA	46
	APÊNDICE B – DIVULGAÇÃO DO TRABALHO	51

## 1 ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O primeiro capítulo da dissertação corresponde a revisão da literatura, bem como algumas considerações referente à teoria fractal e modelos de crescimento. A versão submetida do artigo é apresentada no segundo capítulo. Uma descrição mais detalhada da metodologia é descrita no APÊNDICE A e a divulgação do trabalho no APÊNDICE B.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Resistência antimicrobiana

A inserção de antimicrobianos na prática clínica mudou significativamente a maneira como as infecções são combatidas, contribuindo para diminuição nas taxas de morbidade e mortalidade da humanidade. A eficácia e confiabilidade dos antimicrobianos foram gravemente comprometidas nos últimos anos, devido a disseminação da resistência antimicrobiana, (AMR), entre os patógenos [1,2]. Segundo a organização mundial de saúde, resistência antimicrobiana é a capacidade de um microrganismo impedir que um antimicrobiano seja eficaz contra ele. Dessa forma, tratamentos convencionais se tornam ineficazes, as infecções persistem e podem se espalhar [3].

A AMR é um processo natural observado desde a descoberta dos primeiros antibióticos. Estes medicamentos criam um complexo conjunto de condições ambiente, que podem permitir o desenvolvimento de microrganismos resistentes por meio de mecanismos adaptativos, como mutações no genoma ou através da seleção de patógenos dentro de uma população mais suscetível [4,5]. Contudo, o uso inadequado ou excessivo de antimicrobianos, incluindo a utilização desregulada em animais e alimentos [4,6], intensificam a taxa com que a resistência antimicrobiana se desenvolve e propaga, tornando extremamente complicado o seu controle [7,8].

Pacientes infectados por microrganismos resistentes não respondem aos tratamentos tradicionais, consequentemente, é necessário maiores tempos de internação e/ou medicações alternativas, o que torna o custo terapêutico maior e aumenta as taxas de mortalidade [7,8]. Segundo O'Neill [9], em 2014 houve mais de 700 mil mortes ocasionadas por microrganismos resistentes, e se ações não forem tomadas, o número de mortes anuais poderá chegar a 10 milhões em 2050 (Figura 1).



Figura 1 – Número de mortes associadas à AMR, comparado a outras grandes causas [9].

A resistência antimicrobiana é um dos grandes desafios para a saúde pública [6,10]. No qual, dentre os microrganismos, as espécies do gênero *Candida* são particularmente preocupantes pois, são responsáveis por um grande número de infecções [11] e podem ocasionar sérios problemas de saúde, incluindo a morte [12,13].

#### 2.2 Candida albicans

Microrganismos do gênero *Candida* estão presentes na superfície da pele, cavidade bucal, tratos gastrointestinais e urogenitais do homem em uma relação de comensalismo. No entanto, se houver um desequilíbrio da microbiota ou deficiência do sistema imune do hospedeiro, estes fungos podem ocasionar infecções, por isso, são considerados oportunistas [14,15].

A *Candida albicans* é considerada a espécie predominante e mais patogênica do gênero, sendo responsável pela maioria das infecções nosocomiais que afetam indivíduos imunocomprometidos [16,17]. A complexa e dinâmica interação destes microrganismos com os tecidos [18], associado à sua capacidade de dimorfismo [19], formação de biofilmes [20] e resistência antimicrobiana [21], tornam complicados os tratamentos envolvendo estes patógenos.

Métodos alternativos têm sido investigados para o combate desses microrganismos, entre eles, a inativação fototérmica mediada por nanomateriais [22]. Esta abordagem pode ser extremamente efetiva, tendo em vista o enorme potencial e os resultados publicados envolvendo outros patógenos [23-26]. Nanotubos de carbono, CNTs, podem exibir vantagens comparados a outros nanomateriais [27], como a necessidade de baixas potências para gerar altos ganhos de temperatura.

#### 2.3 Nanotubos de carbono

A descoberta dos nanotubos de carbono é atribuída ao físico japonês Sumio Iijima [28]. Estes materiais são compostos de átomos de carbono arranjados em uma rede tubular [29-31]. Sua estrutura pode ser compreendida como uma ou mais camadas de grafite (grafeno) enroladas em forma cilíndrica [32].



**Figura 2** – Ilustração das estruturas: (a) grafite (em destaque o grafeno), (b) nanotubo de carbono de parede simples e (c) nanotubo de carbono de múltiplas paredes [33, 34].

Dessa forma, os CNTs podem ser classificados em dois tipos principais: (i) nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs), e (ii) nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNTs) [30,31], como ilustrado na Figura 2. Os SWCNTs consistem de apenas uma folha de grafite e apresentam um diâmetro típico entre 0,4-2 nm. Enquanto que, os MWCNTs são formados por diversas camadas de grafite concêntricas e possuem um diâmetro em torno de 2-100 nm [35].

As fortes ligações covalente entre átomos de carbono fazem com que os CNTs apresentem um dos maiores módulos de elasticidade conhecidos [36]. Estes materiais possuem uma grande área superficial [30], são quimicamente inertes à corrosão e termicamente estáveis a elevadas temperaturas [37]. Além disso, os CNTs podem ser metálicos ou semicondutores conforme a configuração e diâmetro de sua estrutura [38]. Por outro lado, a existência de fortes interações de Van der Waals entre CNTs, conduzem a uma baixa solubilidade e alta aglomeração, limitando suas aplicações [39,40]. Felizmente, métodos físico-químicos têm sido investigados e desenvolvidos para modificar a superfície destes materiais. Este processo é conhecido como funcionalização, melhorando consideravelmente a capacidade de dispersão, solubilização e biocompatibilidade dos CNTs [29,41].

No âmbito biomédico, os CNTs podem ocasionar danos ao DNA e membrana celular, induzindo toxicidade através de estresse oxidativo, modificação de atividades mitocondriais, síntese de proteínas e alteração de rotas metabólicas intracelulares [41,42]. Por estes motivos, CNTs vem sendo investigados no combate de patógenos [43-45].

Entretanto, a variabilidade das características dos CNTs, tornam a avaliação de sua toxicidade extremamente complexa [42]. A toxicidade de CNTs depende de fatores como: comprimento [47], diâmetro [48], funcionalização [46], concentração [43], tempo de contato [43], dispersante [43], e forma da célula avaliada [46]. Portanto, para que estes materiais sejam amplamente utilizados, inclusive em um ambiente clínico, suas propriedades biológicas, comportamento e desempenho precisam ser rigorosamente compreendidas [42]. Os principais mecanismos propostos para a atividade antimicrobiana dos nanotubos de carbono são: através da penetração, o que provoca danos à parede/membrana celular e posteriormente pode resultar no extravasamento de materiais citoplasmáticos; e efeitos devido a redes de nanotubos aglomeradas à superfície das células, o que aumenta o estresse celular e inibe o crescimento [44,46].

#### 2.4 Terapia fototérmica

A terapia fototérmica, (PTT), fundamenta-se na combinação de agentes fototérmicos (PTA) e radiação eletromagnética para promover uma seletiva e minimamente invasiva alternativa para o tratamento de câncer via hipertermia [32,49] e inativação de microrganismos [23,24,50,51].

A ação fototérmica pode ser compreendida através do esquema apresentado na Figura 3. No qual, um agente fototérmico absorve fótons e sofre uma transição para um estado eletrônico excitado. Em seguida, ocorre a dissipação da energia do PTA excitado via decaimento não-radiativo (relaxação dos níveis de energia vibracional), com conversão em energia térmica [52], que difunde-se rapidamente para o ambiente externo ao PTA, aumentando a temperatura local [27,53]. Esse aumento da temperatura pode ocasionar danos celulares, como a desnaturação de proteínas, lise celular, mudanças conformacionais no DNA e RNA, aumento do estresse oxidativo, necrose ou apoptose [27,54-56].



Figura 3 – Eventos que conduzem ao efeito fototérmico [52].

Um agente fototérmico adequado deve absorver fortemente a luz no comprimento de onda desejado e apresentar um predominante decaimento não-radiativo, transformando rapidamente a energia do fóton absorvido em relaxamento vibracional e energia térmica [52,57]. Os CNTs possuem uma alta capacidade de absorver radiação na região do infravermelho próximo, (NIR), onde os tecidos biológicos são consideravelmente transparentes [58,59], e podem gerar elevadas temperaturas quando expostos a esta radiação [27,60]. Além disso, a maior massa e disponibilidade de elétrons por estrutura, fazem com que os MWCNTs sejam capazes de absorver mais radiação na região NIR do que os SWCNTs [61]. Portanto, estes materiais podem ser mais efetivos em mediar ações fototérmicas, que podem ser aplicada no tratamento de câncer [56,61,62] e inativação de microrganismos [23,24,26].

#### **2.5 Fractais**

As estruturas de uma grande variedade de objetos na natureza tais como montanhas, nuvens, árvores e rios, e os estudados em laboratório como por exemplo, redes neurais, colônias de microrganismos e superfícies rugosas, frequentemente não podem ser descritas por conceitos da Geometria Euclidiana, devido à enorme complexidade e irregularidade [63,64]. Por exemplo, células nervosas observadas em duas dimensões, não são retas (1D) e não cobrem completamente a área bidimensional (2D), seus valores dimensionais estão entre 1 e 2 [65]. Com o desenvolvimento da Geometria Fractal muitos aspectos do comportamento físico dessas estruturas podem ser compreendidos [63].

O termo *fractal* foi introduzido em 1975 por B. B. Mandelbrot para descrever estruturas que são invariantes sobre mudanças de escala de observação, ou seja, exibem uma perfeita auto-semelhança à diferentes escalas de análise [66-68]. Apesar de ser uma idealização teórica, inúmeros objetos apresentam este comportamento, pelo menos à nível estatístico e para um limitado intervalo de escalas de investigação [68,69], como ilustrado na Figura 4.



**Figura 4** – Exemplo de fractais: (a) estatístico (real) e (b) determinístico (teórico). Os quadros à esquerda mostram as figuras originais. Enquanto, os quadros à direita mostram sucessivas ampliações da região central [69].

Objetos fractais podem ser classificados em duas formas, *self-similar* e *self-affine*. Os fractais *self-similar* são isotrópicos, ou seja, suas estruturas são invariantes se o fator de

mudança de escala for o mesmo em todas as direções [63,67]. Enquanto que, os fractais *self-affine* são anisotrópicos, ou seja, suas estruturas permanecem inalteradas quando o fator de mudança de escala se modifica com a direção [63,67].

#### 2.6 Dimensão fractal

Os fractais podem ser caracterizados por um parâmetro chamado de dimensão fractal, DF [70]. A DF é uma forma de medir o grau de ocupação no espaço por esses objetos [69,71] e assume valores não inteiros aumentando com a complexidade do objeto. Dessa forma, a DF é também uma maneira de quantificar a complexidade da forma [68,70]. Portanto, uma estrutura fractal apresenta 3 características fundamentais: auto-similaridade - parte de sua estrutura é semelhante ao todo; invariância de escala - sua forma não se altera com mudanças de escala de observação; e possui uma dimensão não inteira (DF) [70].

A análise fractal é extremamente útil para obter informações sobre sistemas dinâmicos que modelam fenômenos físicos, uma vez que fornece informações fundamentais para previsão de seu comportamento [72]. As aplicações envolvem a área biomédica [73-75], sistemas automontados [78,79], assim como estudos de meios porosos [64], solos [80], e cristais [81]. Além disso, para o crescimento de colônias de microrganismos [76,77] o uso destes fundamentos permite avaliar alterações morfológicas de estruturas, que podem estar relacionadas com a patogenicidade [82], contribuindo com o entendimento a respeito do processo de inativação celular [77,83].

#### 2.7 Leis de escala

A morfologia de uma superfície arbitrária e como esta evolui no tempo é influenciada por um grande número de fatores. No entanto, frequentemente podem ser definidas simples relações de escala que capturam os mecanismos essenciais que contribuem para sua formação e dinâmica de crescimento [67].

Uma superfície pode ser definida como um conjunto de partículas agregadas com diferentes alturas [79]. Assim, para caracterizar sua formação é necessário a introdução de

duas funções: a altura média da superfície e a rugosidade da interface [67]. A altura média da superfície,  $\overline{h}$ , pode ser definida como:

$$\overline{h}(t) \equiv \frac{1}{L} \sum_{i=1}^{L} h(i,t) \tag{1}$$

Sendo que h(i,t) corresponde à altura da coluna i no tempo t, e L é o tamanho da janela analisada. Deste modo, se a taxa de crescimento for constante, a altura média aumenta linearmente com o tempo:

$$h(t) \propto t$$
 (2)

Enquanto que, a rugosidade da interface, W(L,t), é descrita por flutuações em torno da altura média:

$$W(L,t) \equiv \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{i=1}^{L} \left[ h(i,t) - \bar{h}(t) \right]^2}$$
(3)



Figura 5 – Representação das etapas de crescimento de uma superfície arbitrária [67].

Em geral, o crescimento de uma superfície pode ser descrito por duas etapas: uma inicial com grande variação da rugosidade em função do tempo, seguida de uma estabilização ou saturação da rugosidade da interface, onde  $W(L,t) \sim W_{sat}$ , como ilustrado na Figura 5. Dessa forma, o tempo para atingir a saturação é chamado de tempo de crossover ou tempo de saturação (*t*<sub>sat</sub>). Para tempos menores que *t*<sub>sat</sub>, W(L,t) aumenta como uma potência do tempo:

$$W(L, t) \propto t^{\beta}$$
 para t < t<sub>sat</sub> (4)

19

sendo  $\beta$  o expoente de crescimento, que caracteriza a dependência temporal do processo de formação da superfície.

Quando a observação é feita em tempos superiores ao  $t_{sat}$ , existe uma relação entre o tamanho da janela analisada (L) e o valor de W(L,t). Esta relação é expressa pela lei de potência:

$$W_{sat}(L) \propto L^{\alpha} \quad \text{para t} > t_{sat}$$
 (5)

sendo  $\alpha$  o expoente de rugosidade, que caracteriza a interface saturada. Este expoente pode ser relacionado com a dimensão fractal da superfície, através da relação:

$$DF = D - \alpha \tag{6}$$

onde D é a dimensão espacial de imersão do objeto fractal (1, 2 ou 3).

Os valores de  $\alpha$  e DF permite distinguir morfologias que exibem similar rugosidade do ponto de vista macroscópico, mas são completamente distintas microscopicamente [84,85]. Para  $\alpha$ =1, temos um fractal *self-similar* e um fractal *self-affine* para 0< $\alpha$ <1, sendo que, quanto maior o coeficiente de rugosidade ou a dimensão fractal, mais rugosa é a superfície [84,85].

#### 2.8 Modelos de crescimento

As leis de escala podem ser descritas em detalhes microscópicos por modelos teóricos discretos ou expandidas em equações estocásticas que levam em conta princípios de simetria e conservação [67]. Dessa forma, o comportamento de escala e os respectivos expoentes críticos podem ser frequentemente associados a modelos matemáticos, para buscar descrever os mecanismos que regem a formação e evolução de interfaces.

#### 2.8.1 Modelo de Eden

O modelo de Eden foi introduzido em 1961 para investigação da formação de colônias celulares, tais como, culturas de microrganismos e tecidos biológicos [86]. Este modelo

propõe que o crescimento ocorra a partir de uma região de nucleação, por exemplo, uma única partícula ou linha. Dessa forma, novas partículas são adicionadas e ocuparão regiões vizinhas aleatoriamente, com igual probabilidade em todos os sítios da interface [67,87,88].

A Figura 6 apresenta um exemplo de aglomerado formado pelo modelo Eden. Este exibe uma estrutura compacta, exceto por alguns sítios vazios próximos a borda, e uma superfície bastante sinuosa. Os valores dos expoentes de rugosidade e crescimento quando  $D=3 \ são, \alpha \sim 0.20 \ [67,87] e \beta \sim 0.11 \ [90].$ 



Figura 6 – Exemplo de um aglomerado Eden formado a partir de uma linha [89].

#### 2.8.2 Modelo de Kardar-Parisi-Zhang

Em 1986 Kardar, Parisi e Zhang propuseram um modelo para a evolução do perfil de crescimento de interfaces [91]. Este propõe que uma superfície cresce como resultado da deposição de partículas/células e do relaxamento produzido por um crescimento lateral e dessorção. A equação diferencial não linear estocástica que descreve a dinâmica do modelo de KPZ é dada por:

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \lambda \nabla^2 h + \frac{\lambda^*}{2} (\nabla h)^2 + \phi + F(x,t)$$
(7)

O primeiro termo no segundo membro  $(\lambda \nabla^2 h)$  indica a suavização da superfície.  $\lambda$  é um coeficiente relacionado a tensão de superfície. O termo não linear  $\frac{\lambda^*}{2}(\nabla h)^2$  se refere ao crescimento lateral da interface.  $\phi$  é o número médio de partículas/células depositadas no sítio x, e F(x,t) consiste na flutuação aleatória no processo de deposição [6730].

Os expoentes de rugosidade e crescimento para D=1, podem ser obtidos analiticamente e seus valores são  $\alpha = 1/2$  e  $\beta = 1/3$  [91,92]. Este resultado é idêntico ao obtido

pelo modelo de Eden em 1D. Apesar desta correspondência, para maiores dimensões, efeitos de borda alteram os valores previstos pela classe KPZ [67].

Embora não seja possível a solução analítica da equação KPZ quando D>1, o uso de resultados numéricos nos permite obter boas estimativas para os expoentes de rugosidade e crescimento [67]. Dessa forma, estudos encontraram em 3D um coeficiente de rugosidade variando entre  $\alpha$ ~0,3 e 0,4 [67,93-96] e um  $\beta$ ~0,18 [95].

## REFERÊNCIAS

[1] E.D. Brown, G.D. Wright, Antibacterial drug discovery in the resistance era, Nature. 529 (2016) 336–343. doi:10.1038/nature17042.

[2] A. Travis, O. Chernova, V. Chernov, R. Aminov, Antimicrobial drug discovery: lessons of history and future strategies, Expert Opin. Drug Discov. 13 (2018) 983–985. doi:10.1080/17460441.2018.1515910.

[3] WHO, World Health Organization. Antimicrobial resistance, WHO. (2018). <a href="https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/">https://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/</a>. Acesso em: 17 dez. 2018.

[4] A.Y. Hwang, J.G. Gums, The emergence and evolution of antimicrobial resistance: Impact on a global scale, Bioorg. Med. Chem. 24 (2016) 6440–6445. doi:10.1016/j.bmc.2016.04.027.

[5] K. Eggleston, R. Zhang, R.J. Zeckhauser, The Global Challenge of Antimicrobial Resistance: Insights from Economic Analysis, Int. J. Environ. Res. Public Health. 7 (2010) 3141–3149. doi:10.3390/ijerph7083141.

[6] W. Xiong, Y. Sun, Z. Zeng, Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals, Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (2018) 18377–18384. doi:10.1007/s11356-018-1852-2.

[7] J. O'Neill, Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, Rev. Antimicrob. Resist. (2016) 1–80.

[8] J.R. Leal, J. Conly, E.A. Henderson, B.J. Manns, How externalities impact an evaluation of strategies to prevent antimicrobial resistance in health care organizations, Antimicrob. Resist. Infect. Control. 6 (2017) 53. doi:10.1186/s13756-017-0211-2.

[9] J. O'Neill, Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations, Rev. Antimicrob. Resist. (2014) 1–20.

[10] G. Cheng, M. Dai, S. Ahmed, H. Hao, X. Wang, Z. Yuan, Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance, Front. Microbiol. 7 (2016) 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.00470.

[11] N. Whibley, S.L. Gaffen, Beyond Candida albicans: Mechanisms of immunity to nonalbicans Candida species, Cytokine. 76 (2015) 42–52. doi:10.1016/j.cyto.2015.07.025.

[12] J. Mensa, C. Pitart, F. Marco, Treatment of critically ill patients with candidemia, Int. J. Antimicrob. Agents. 32 (2008) S93–S97. doi:10.1016/S0924-8579(08)70007-4.

[13] D. Williams, M. Lewis, Pathogenesis and treatment of oral candidosis, J. Oral Microbiol. 3 (2011) 5771. doi:10.3402/jom.v3i0.5771.

[14] E. Munin, L.M. Giroldo, L.P. Alves, M.S. Costa, Study of germ tube formation by Candida albicans after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), J. Photochem. Photobiol. B Biol. 88 (2007) 16–20. doi:10.1016/j.jphotobiol.2007.04.011.

[15] J. Kim, P. Sudbery, Candida albicans, a major human fungal pathogen, J. Microbiol. 49 (2011) 171–177. doi:10.1007/s12275-011-1064-7.

[16] L.P. Samaranayake, W. Keung Leung, L. Jin, Oral mucosal fungal infections, Periodontol. 2000. 49 (2009) 39–59. doi:10.1111/j.1600-0757.2008.00291.x.

[17] A. Krishnan P, Fungal infections of the oral mucosa, Indian J. Dent. Res. 23 (2012) 650–659. doi:10.4103/0970-9290.107384.

[18] P.-W. Tsai, Y.-T. Chen, P.-C. Hsu, C.-Y. Lan, Study of Candida albicans and its interactions with the host: A mini review, BioMedicine. 3 (2013) 51–64. doi:10.1016/j.biomed.2012.12.004.

[19] C.A. Kumamoto, M.D. Vinces, Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to Candida albicans virulence, Cell. Microbiol. 7 (2005) 1546–1554. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00616.x.

[20] J. Chandra, D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, M.A. Ghannoum, Biofilm Formation by the Fungal Pathogen Candida albicans: Development, Architecture, and Drug Resistance, J. Bacteriol. 183 (2001) 5385–5394. doi:10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001.

[21] D.M. Arana, C. Nombela, J. Pla, Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of Candida albicans to phagocytes, J. Antimicrob. Chemother. 65 (2010) 54–62. doi:10.1093/jac/dkp407.

[22] M. Shahnawaz Khan, H.N. Abdelhamid, H.-F. Wu, Near infrared (NIR) laser mediated surface activation of graphene oxide nanoflakes for efficient antibacterial, antifungal and wound healing treatment, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 127 (2015) 281–291. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.12.049.

[23] J.-W. Kim, E. V. Shashkov, E.I. Galanzha, N. Kotagiri, V.P. Zharov, Photothermal antimicrobial nanotherapy and nanodiagnostics with self-assembling carbon nanotube clusters, Lasers Surg. Med. 39 (2007) 622–634. doi:10.1002/lsm.20534.

[24] N. Levi-Polyachenko, C. Young, C. MacNeill, A. Braden, L. Argenta, S. Reid, Eradicating group A streptococcus bacteria and biofilms using functionalised multi-wall carbon nanotubes, Int. J. Hyperth. 30 (2014) 490–501. doi:10.3109/02656736.2014.966790.

[25] L. Mocan, I. Ilie, F.A. Tabaran, C. Iancu, O. Mosteanu, T. Pop, C. Zdrehus, D. Bartos, T. Mocan, C. Matea, Selective Laser Ablation of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus with IgG Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes, J. Biomed. Nanotechnol. 12 (2016) 781–788. doi:10.1166/jbn.2016.2221.

[26] T. Akasaka, M. Matsuoka, T. Hashimoto, S. Abe, M. Uo, F. Watari, The bactericidal effect of carbon nanotube/agar composites irradiated with near-infrared light on Streptococcus mutans, Mater. Sci. Eng. B. 173 (2010) 187–190. doi:10.1016/j.mseb.2010.01.001.

[27] D. Boldor, N.M. Gerbo, W.T. Monroe, J.H. Palmer, Z. Li, A.S. Biris, Temperature Measurement of Carbon Nanotubes Using Infrared Thermography, Chem. Mater. 20 (2008) 4011–4016. doi:10.1021/cm800428e.

[28] S. Iijima, Helical microtubes of graphitic carbon, Lett. to Nat. 354 (1991) 56–58.

[29] L. Lacerda, A. Bianco, M. Prato, K. Kostarelos, Carbon nanotubes as nanomedicines: From toxicology to pharmacology, Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (2006) 1460–1470. doi:10.1016/j.addr.2006.09.015.

[30] H. He, L.A. Pham-Huy, P. Dramou, D. Xiao, P. Zuo, C. Pham-Huy, Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine, Biomed Res. Int. 2013 (2013) 1–12. doi:10.1155/2013/578290.

[31] M.I. Sajid, U. Jamshaid, T. Jamshaid, N. Zafar, H. Fessi, A. Elaissari, Carbon nanotubes from synthesis to in vivo biomedical applications, Int. J. Pharm. 501 (2016) 278–299. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.01.064.

[32] A. Sanginario, B. Miccoli, D. Demarchi, Carbon Nanotubes as an Effective Opportunity for Cancer Diagnosis and Treatment, Biosensors. 7 (2017) 9. doi:10.3390/bios7010009.

[33] M. Kim, J. Jang, C. Cha, Carbon nanomaterials as versatile platforms for theranostic applications, Drug Discov. Today. 22 (2017) 1430–1437. doi:10.1016/j.drudis.2017.05.004.

[34] N.L. Teradal, R. Jelinek, Carbon Nanomaterials in Biological Studies and Biomedicine, Adv. Healthc. Mater. 6 (2017) 1700574. doi:10.1002/adhm.201700574.

[35] E. Bekyarova, Y. Ni, E.B. Malarkey, V. Montana, J.L. McWilliams, R.C. Haddon, V. Parpura, Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine, J. Biomed. Nanotechnol. 1 (2005) 3–17. doi:10.1166/jbn.2005.004.

[36] J. Wang, Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review, Electroanalysis. 17 (2005) 7–14. doi:10.1002/elan.200403113.

[37] J.J. Davis, K.S. Coleman, B.R. Azamian, C.B. Bagshaw, M.L.H. Green, Chemical and Biochemical Sensing with Modified Single Walled Carbon Nanotubes, Chem. - A Eur. J. 9

(2003) 3732-3739. doi:10.1002/chem.200304872.

[38] G. Pagona, N. Tagmatarchis, Carbon Nanotubes: Materials for Medicinal Chemistry and Biotechnological Applications, Curr. Med. Chem. 13 (2006) 1789–1798. doi:10.2174/092986706777452524.

[39] M. Karimi, N. Solati, M. Amiri, H. Mirshekari, E. Mohamed, M. Taheri, M. Hashemkhani, A. Saeidi, M.A. Estiar, P. Kiani, A. Ghasemi, S.M.M. Basri, A.R. Aref, M.R. Hamblin, Carbon nanotubes part I: preparation of a novel and versatile drug-delivery vehicle, Expert Opin. Drug Deliv. 12 (2015) 1071–1087. doi:10.1517/17425247.2015.1003806.

[40] V. Țucureanu, A. Matei, A.M. Avram, FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study, Crit. Rev. Anal. Chem. 46 (2016) 502–520. doi:10.1080/10408347.2016.1157013.

[41] S. Vardharajula, S.Z. Ali, P.M. Tiwari, E. Eroğlu, K. Vig, V.A. Dennis, S.R. Singh, Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications, Int. J. Nanomedicine. 7 (2012) 5361–5374. doi:10.2147/IJN.S35832.

[42] R. Alshehri, A.M. Ilyas, A. Hasan, A. Arnaout, F. Ahmed, A. Memic, Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity, J. Med. Chem. 59 (2016) 8149–8167. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01770.

[43] L.R. Arias, L. Yang, Inactivation of Bacterial Pathogens by Carbon Nanotubes in Suspensions, Langmuir. 25 (2009) 3003–3012. doi:10.1021/la802769m.

[44] M.R. Hartono, A. Kushmaro, X. Chen, R.S. Marks, Probing the toxicity mechanism of multiwalled carbon nanotubes on bacteria, Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (2018) 5003–5012. doi:10.1007/s11356-017-0782-8.

[45] M. Olivi, E. Zanni, G. De Bellis, C. Talora, M.S. Sarto, C. Palleschi, E. Flahaut, M. Monthioux, S. Rapino, D. Uccelletti, S. Fiorito, Inhibition of microbial growth by carbon nanotube networks, Nanoscale. 5 (2013) 9023–9029. doi:10.1039/c3nr02091f.

[46] H. Chen, B. Wang, D. Gao, M. Guan, L. Zheng, H. Ouyang, Z. Chai, Y. Zhao, W. Feng, Broad-Spectrum Antibacterial Activity of Carbon Nanotubes to Human Gut Bacteria, Small. 9 (2013) 2735–2746. doi:10.1002/smll.201202792.

[47] C. Yang, J. Mamouni, Y. Tang, L. Yang, Antimicrobial Activity of Single-Walled Carbon Nanotubes: Length Effect, Langmuir. 26 (2010) 16013–16019. doi:10.1021/la103110g.

[48] S. Kang, M. Herzberg, D.F. Rodrigues, M. Elimelech, Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter!, Langmuir. 24 (2008) 6409–6413. doi:10.1021/la800951v.

[49] Z. Bao, X. Liu, Y. Liu, H. Liu, K. Zhao, Near-infrared light-responsive inorganic nanomaterials for photothermal therapy, Asian J. Pharm. Sci. 11 (2016) 349–364. doi:10.1016/j.ajps.2015.11.123.

[50] N.J. Millenbaugh, J.B. Baskin, M.N. DeSilva, W.R. Elliott, R.D. Glickman,

Photothermal killing of Staphylococcus aureus using antibody-targeted gold nanoparticles, Int. J. Nanomedicine. 10 (2015) 1953–1960. doi:10.2147/IJN.S76150.

[51] R.S. Norman, J.W. Stone, A. Gole, C.J. Murphy, T.L. Sabo-Attwood, Targeted Photothermal Lysis of the Pathogenic Bacteria, Pseudomonas aeruginosa , with Gold Nanorods, Nano Lett. 8 (2008) 302–306. doi:10.1021/nl0727056.

[52] A. Blázquez-Castro, L.L. Colombo, S.I. Vanzulli, J.C. Stockert, NIR laser pointer for in vivo photothermal therapy of murine LM3 tumor using intratumoral China ink as a photothermal agent, Lasers Med. Sci. 33 (2018) 1307–1315. doi:10.1007/s10103-018-2483-z.

[53] M. Camerin, S. Rello, A. Villanueva, X. Ping, M.E. Kenney, M.A.J. Rodgers, G. Jori, Photothermal sensitisation as a novel therapeutic approach for tumours: Studies at the cellular and animal level, Eur. J. Cancer. 41 (2005) 1203–1212. doi:10.1016/j.ejca.2005.02.021.

[54] J.R. Lepock, Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage, Int. J. Hyperth. 19 (2003) 252–266. doi:10.1080/0265673031000065042.

[55] T.A. Okhai, C.J. Smith, Principles and Application of RF System for Hyperthermia Therapy, in: Hyperthermia, InTech, 2013: pp. 171–184. doi:10.5772/55108.

[56] Z. Sobhani, M.A. Behnam, F. Emami, A. Dehghanian, I. Jamhiri, Photothermal therapy of melanoma tumor using multiwalled carbon nanotubes, Int. J. Nanomedicine. 12 (2017) 4509–4517. doi:10.2147/IJN.S134661.

[57] N. Sahadev, A.A. Anappara, Photothermal effect in solid-state MWCNT: Possible signatures of thermal anisotropy, J. Appl. Phys. 124 (2018) 145104. doi:10.1063/1.5030461.

[58] J.-G. Yu, F.-P. Jiao, X.-Q. Chen, X.-Y. Jiang, Z.-G. Peng, D.-M. Zeng, D.-S. Huang, Irradiation-mediated carbon nanotubes' use in cancer therapy, J. Cancer Res. Ther. 8 (2012) 348–354. doi:10.4103/0973-1482.103511.

[59] A. Joshi, S. Punyani, S.S. Bale, H. Yang, T. Borca-Tasciuc, R.S. Kane, Nanotubeassisted protein deactivation, Nat. Nanotechnol. 3 (2008) 41–45. doi:10.1038/nnano.2007.386.

[60] N.W. Shi Kam, M. O'Connell, J.A. Wisdom, H. Dai, Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction, Proc. Natl. Acad. Sci. 102 (2005) 11600–11605. doi:10.1073/pnas.0502680102.

[61] J.W. Fisher, S. Sarkar, C.F. Buchanan, C.S. Szot, J. Whitney, H.C. Hatcher, S. V. Torti, C.G. Rylander, M.N. Rylander, Photothermal Response of Human and Murine Cancer Cells to Multiwalled Carbon Nanotubes after Laser Irradiation, Am. Assoc. Cancer Res. 70 (2010) 9855–9864. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0250.

[62] A. Burke, X. Ding, R. Singh, R.A. Kraft, N. Levi-Polyachenko, M.N. Rylander, C. Szot, C. Buchanan, J. Whitney, J. Fisher, H.C. Hatcher, R. D'Agostino, N.D. Kock, P.M. Ajayan, D.L. Carroll, S. Akman, F.M. Torti, S. V. Torti, Long-term survival following a single treatment of kidney tumors with multiwalled carbon nanotubes and near-infrared radiation,

Proc. Natl. Acad. Sci. 106 (2009) 12897-12902. doi:10.1073/pnas.0905195106.

[63] P. Meakin, Fractal aggregates, Adv. Colloid Interface Sci. 28 (1988) 249–331. doi:10.1016/0001-8686(87)80016-7.

[64] B. Yu, Analysis of Flow in Fractal Porous Media, Appl. Mech. Rev. 61 (2008) 050801. doi:10.1115/1.2955849.

[65] E. Fernández, H.F. Jelinek, Use of Fractal Theory in Neuroscience: Methods, Advantages, and Potential Problems, Methods. 24 (2001) 309–321. doi:10.1006/meth.2001.1201.

[66] P. Meakin, Fractal structures, Prog. Solid State Chem. 20 (1990) 135–233. doi:10.1016/0079-6786(90)90001-V.

[67] A.-L. Barabási, H.E. Stanley, Fractal Concepts in Surface Growth, 1 ed., Cambridge University Press, New York, 1995.

[68] G. Landini, Fractals in microscopy, J. Microsc. 241 (2011) 1-8. doi:10.1111/j.1365-2818.2010.03454.x.

[69] R. Jullien, Aggregation phenomena and fractal aggregates, Contemp. Phys. 28 (1987) 477–493. doi:10.1080/00107518708213736.

[70] F.E. Lennon, G.C. Cianci, N.A. Cipriani, T.A. Hensing, H.J. Zhang, C. Chen, S.D. Murgu, E.E. Vokes, M.W. Vannier, R. Salgia, Lung cancer—a fractal viewpoint, Nat. Rev. Clin. Oncol. 12 (2015) 664–675. doi:10.1038/nrclinonc.2015.108.

[71] S.S. Cross, The application of fractal geometric analysis to microscopic images, Micron. 25 (1994) 101–113. doi:10.1016/0968-4328(94)90057-4.

[72] J. Aguirre, R.L. Viana, M.A.F. Sanjuán, Fractal structures in nonlinear dynamics, Rev. Mod. Phys. 81 (2009) 333–386. doi:10.1103/RevModPhys.81.333.

[73] S. Havlin, S.V. Buldyrev, A.L. Goldberger, R.N. Mantegna, S.M. Ossadnik, C.-K. Peng, M. Simons, H.E. Stanley, Fractals in biology and medicine, Chaos, Solitons & Fractals. 6 (1995) 171–201. doi:10.1016/0960-0779(95)80025-C.

[74] A. Bitler, R. Dover, Y. Shai, Fractal properties of macrophage membrane studied by AFM, Micron. 43 (2012) 1239–1245. doi:10.1016/j.micron.2012.04.009.

[75] A. Bitler, R.S. Dover, Y. Shai, Fractal properties of cell surface structures: A view from AFM, Semin. Cell Dev. Biol. 73 (2018) 64–70. doi:10.1016/j.semcdb.2017.07.034.

[76] T. TRESCHER, Influência da Inativação Fotodinâmica sobre a Viabilidade e Dinâmica de Crescimento de Candida albicans, 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) - Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2014.

[77] A.S. Kalck, M.F.C. Pedro, K.F. dos Santos, M.S. Sousa, J.R. Silva, N.C. de Souza, Mathematical models and fractal analysis for the investigation of the photodynamic inactivation in phytopathogenic microorganisms, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 171 (2018) 285–290. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.019.

[78] J.B. Brito, Variação Morfológica e Influência de Fatores Experimentais em Filmes Automontados de Proteína e Corante, 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2012.

[79] N.C. De Souza, Adsorção de poli(o-metoxianilina) em filmes automontados, 2012. 141 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materias) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2002.

[80] E. Perfect, B.D. Kay, Applications of fractals in soil and tillage research: a review, Soil Tillage Res. 36 (1995) 1–20. doi:10.1016/0167-1987(96)81397-3.

[81] B. Joshi, S. Beccard, T.A. Vilgis, Fractals in crystallizing food systems, Curr. Opin. Food Sci. 21 (2018) 39–45. doi:10.1016/j.cofs.2018.05.009.

[82] M.J. Hubbard, D. Markie, R.T.M. Poulter, Isolation and morphological characterization of a mycelial mutant of Candida albicans, J. Bacteriol. 165 (1986) 61–65. doi:10.1128/jb.165.1.61-65.1986.

[83] I.Y. Yanina, V.A. Bochko, J.T. Alander, V.V. Tuchin, Optical image analysis of fat cells for indocyanine green mediated near-infrared laser treatment, Laser Phys. Lett. 8 (2011) 684–690. doi:10.1002/lapl.201110048.

[84] N. Happo, M. Iwamatsu, K. Horii, Self-Affine Fractal of Porous Silicon Surfaces before and after Natural Oxidization, Phys. Status Solidi. 182 (2000) 233–237. doi:10.1002/1521-396X(200011)182:1<233::AID-PSSA233>3.0.CO;2-7.

[85] R. Socoteanu, M. Anastasescu, G. Dobrescu, R. Boscencu, G. Vasiliu, C. Constantin, AFM imaging, fractal analysis and in vitro cytotoxicity evaluation of Zn(II) vs. Cu(II) porphyrins, Chaos, Solitons & Fractals. 77 (2015) 304–309. doi:10.1016/j.chaos.2015.06.013.

[86] M. Eden, A two-dimensional growth process, Proc. Fourth Berkeley Symp. Math. Stat. Probab. 4 (1961) 223–239.

[87] R. Jullien, R. Botet, Scaling properties of the surface of the Eden model in d=2, 3, 4, J. Phys. A. Math. Gen. 18 (1985) 2279–2287. doi:10.1088/0305-4470/18/12/026.

[88] F. Family, Dynamic scaling and phase transitions in interface growth, Phys. A Stat. Mech. Its Appl. 168 (1990) 561–580. doi:10.1016/0378-4371(90)90409-L.

[89] N. Kobayashi, O. Moriyama, S. Kitsunezaki, Y. Yamazaki, M. Matsushita, Dynamic Scaling of the Growing Rough Surfaces, J. Phys. Soc. Japan. 73 (2004) 2112–2116. doi:10.1143/JPSJ.73.2112.

[90] E.W. Kuennen, C.Y. Wang, Off-lattice radial Eden cluster growth in two and three dimensions, J. Stat. Mech. Theory Exp. 2008 (2008) P05014. doi:10.1088/1742-5468/2008/05/P05014.

[91] M. Kardar, G. Parisi, Y.-C. Zhang, Dynamic Scaling of Growing Interfaces, Phys. Rev. Lett. 56 (1986) 889–892. doi:10.1103/PhysRevLett.56.889.

[92] S.G. Alves, S.C. Ferreira, Scaling, cumulant ratios, and height distribution of ballistic deposition in 3+1 and 4+1 dimensions, Phys. Rev. E. 93 (2016) 052131. doi:10.1103/PhysRevE.93.052131.

[93] R.C. Salvarezza, L. Vázquez, P. Herrasti, P. Ocón, J.M. Vara, A.J. Arvia, Self-Affine Fractal Vapour-Deposited Gold Surfaces Characterization by Scanning Tunnelling Microscopy, Europhys. Lett. 20 (1992) 727–732. doi:10.1209/0295-5075/20/8/011.

[94] N.C. de Souza, M. Ferreira, K. Wohnrath, J.R. Silva, O.N. Oliveira, J.A. Giacometti, Morphological characterization of Langmuir–Blodgett films from polyaniline and a ruthenium complex (Rupy): influence of the relative concentration of Rupy, Nanotechnology. 18 (2007) 075713. doi:10.1088/0957-4484/18/7/075713.

[95] G. Ódor, B. Liedke, K.-H. Heinig, Directed d-mer diffusion describing the Kardar-Parisi-Zhang-type surface growth, Phys. Rev. E. 81 (2010) 031112. doi:10.1103/PhysRevE.81.031112.

[96] M.N. Gomes, J.B. Brito, J.R. Silva, N.C. de Souza, Layer-by-Layer Films from Wine: An Investigation of an Exponential Growth Process, J. Nanomater. 2013 (2013) 1–7. doi:10.1155/2013/437203.

#### **3 INTRODUÇÃO**

Resistência a antimicrobianos é um dos grandes desafios para a saúde pública [1,2]. Quando fungos não respondem aos medicamentos convencionais é preocupante, principalmente para pacientes com infecções causadas por *Candida*, que podem ocasionar sérios problemas de saúde e levar à morte [3,4]. *Candida albicans* é considerada a espécie predominante e mais patogênica do gênero, sendo responsável pela maioria das infecções nosocomiais que afetam indivíduos imunocomprometidos [5,6]. A complexa interação desses microrganismos com os tecidos [7], associado à sua capacidade de dimorfismo [8], formação de biofilmes [9] e resistência antimicrobiana [10] tornam os tratamentos mais complicados levando a busca por métodos alternativos, entre eles a inativação fototérmica usando nanomaterias tais como nanotubos de carbono (CNTs) [11,12].

Dependendo de diferentes fatores, como rota de síntese, funcionalidade, tamanho e concentração, CNTs podem ocasionar danos ao DNA e membrana celular, induzindo toxicidade através de estresse oxidativo, modificação de atividades mitocondriais, síntese de proteínas e alteração de rotas metabólicas intracelulares [13,14]. A capacidade de CNTs absorverem radiação na região do infravermelho próximo, NIR, enquanto que, os tecidos biológicos são relativamente transparentes [15-17], tornam estes materiais candidatos a agentes fototérmicos. Na terapia fototérmica (PTT) o decaimento não-radiativo de agentes fototérmicos excitados pela radiação eletromagnética, conduz a uma efetiva conversão em energia térmica [18,19]. De modo que, a difusão da energia para o ambiente provoca um aumento da temperatura local [17,20]. Esse aumento da temperatura pode ocasionar danos celulares, como a desnaturação de proteínas, lise celular, mudanças conformacionais no DNA e RNA, aumento do estresse oxidativo, necrose ou apoptose [17,21-23], possibilitando a utilização destes materiais para tratamento de câncer [23-26] ou inativação de microrganismos [11,12,27].

Através de análises microscópicas é possível avaliar a inativação fototérmica e obter informações importantes a respeito do processo de inativação [28,29] à luz da teoria de análise fractal, que descreve a geometria e ocupação espacial de sistemas complexos e irregulares [30], tais como as colônias de microrganismos. Os fractais podem ser caracterizados por um parâmetro chamado dimensão fractal, DF [31], que corresponde a uma

maneira de medir o grau de ocupação no espaço por esses objetos [32,33]. A DF assume valores não inteiros e aumenta com a complexidade do objeto analisado [31,34].

A análise por conceitos de geometria fractal é extremamente útil para obter informações sobre sistemas dinâmicos que modelam fenômenos físicos, uma vez que fornecem informações fundamentais para previsão de seu comportamento [35]. A morfologia de uma superfície arbitrária e como esta evolui no tempo é influenciada por um grande número de fatores. No entanto, frequentemente podem ser definidas simples relações de escala que descrevem os mecanismos essenciais que contribuem para sua formação e dinâmica de crescimento [30].

Uma superfície pode ser definida como um conjunto de partículas agregadas com diferentes alturas. Assim, para caracterizar sua formação é necessário a introdução de duas funções: a altura média da superfície e a rugosidade da interface [30]. A altura média da superfície,  $\overline{h}$ , pode ser definida como:

$$\overline{h}(t) \equiv \frac{1}{L} \sum_{i=1}^{L} h(i,t) \tag{8}$$

Sendo que h(i, t) corresponde à altura da coluna *i* no tempo *t* e *L* é o tamanho da janela analisada. Se a taxa de crescimento for constante, a altura média aumenta linearmente com o tempo:  $\overline{h}(t) \sim t$ , enquanto que, a rugosidade da interface, W(L, t), é descrita por flutuações em torno da altura média:

$$W(L,t) = \sqrt{\frac{1}{L} \sum_{i=1}^{L} \left[ h(i,t) - \bar{h}(t) \right]^2}$$
(9)

Em geral, o crescimento de uma superfície pode ser descrito por duas etapas: uma inicial com grande variação da rugosidade em função do tempo, seguida de uma estabilização ou saturação da rugosidade da interface, onde  $W(L, t) \sim W_{sat}$ . Dessa forma, o tempo para atingir a saturação é chamado de tempo de *crossover* ou tempo de saturação ( $t_{sat}$ ). Quando a observação é feita em tempos superiores ao tempo de saturação, existe uma relação entre o tamanho da janela analisada (L) e o valor de W(L, t). Esta relação é expressa pela lei de potência:

$$W_{sat}(L) \sim L^{\alpha}$$
 para  $t > t_{sat}$  (10)

sendo  $\alpha$  o expoente de rugosidade que caracteriza a interface saturada. Este expoente pode ser relacionado com a DF, através da relação:

$$DF = D - \alpha \tag{11}$$

onde D é a dimensão espacial de imersão do objeto fractal (1, 2 ou 3).

Leis de escala podem ser descritas em detalhes microscópicos por modelos teóricos discretos ou expandidas em equações estocásticas que levam em conta princípios de simetria e conservação [30]. O comportamento de escala e os expoentes críticos observados são frequentemente comparados a modelos teóricos, para buscar compreender os mecanismos responsáveis por sua formação, assim como, prever sua evolução.

Neste estudo, investigamos a inativação fototérmica de *C. albicans*, usando CNTs de múltiplas paredes (MWCNTs), associado à radiação laser no infravermelho próximo (NIR). Esse processo é quantificado pela viabilidade celular de *C. albicans* e pela variação morfológica relacionada ao modo como os microrganismos reagem após irradiação. Para isso, utilizamos análise de imagens associada a modelos matemáticos para obtenção de informações quantitativas referentes ao processo de inativação.

#### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

MWCNTs funcionalizados com grupos carboxila (-COOH), com diâmetros variando de 50 a 80 nm e comprimentos de 10 a 20 µm foram adquiridos da *US Research Nanomaterials, Inc.* (Houston, EUA) e usados como recebidos. A dispersão de MWCNTs foi obtida em água purificada em concentrações de 0.25 mg/mL com sonicação por 2 h. A dispersão de *C. albicans* (ATCC 14053) foi obtida de uma colônia isolada da cultura original em placa de meio de cultura *Agar Sabouraud*, incubado por 24 h a 37 °C. Nove miligrama da cultura foi dispersa em 10 mL de solução fisiológica (0.9 % NaCl) para obtenção da suspensão estoque [36,37].

As dispersões foram irradiadas usando um laser pulsado de estado sólido (*Nd:YAG*) *Q*-*Smart 850 (Quantel Laser, Les Ulis, França*), com comprimento de onda de 1064 nm, potência de 8.5 W e fluências de 5, 15, 30 e 50 J/cm<sup>2</sup> (correspondente ao tempo de irradiação de 0.4, 1.2, 2.3 e 3.8 s respectivamente). O tamanho da região irradiada foi 9 mm em diâmetro e a saída do feixe laser foi posicionada paralelamente a 30 cm do microtubo com as dispersões. Grupos controles de C. albicans, C. albicans irradiada (50 J/cm<sup>2</sup>) e *C. albicans* + MWCNTs, foram preparados para avaliar a efetividade da associação de MWCNT e a NIR na inativação da *C. albicans*. Para os testes de inativação, 10  $\mu$ L da suspensão estoque de *C. albicans* e 70  $\mu$ L da suspensão de MWCNTs foram colocados em um microtubo. Após 5 minutos de contato o material foi irradiado e preparado para análise morfológica, e testes de viabilidade. Pelo menos 3 medidas foram tomadas e os erros foram determinados como desvios padrões. Os grupos foram comparados por análise de variância de medidas repetidas.

Neste trabalho foi utilizado o ensaio de viabilidade baseado na exclusão do corante azul de metileno [38], que atua como um indicador de viabilidade celular. A contagem em câmara de Neubauer foi feita com auxílio do microscópio óptico, considerando as células coradas de azul como mortas e, as transparentes como viáveis [36].

Para análise morfológica, foram preparados filmes com a dispersão de fungos e MWCNTs pela técnica *casting* [39], que envolve o espalhamento do material sobre um substrato. O filme é obtido após evaporação do solvente. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. A morfologia dos filmes foi analisada por microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse Ci/L, Tokyo, Japan) utilizando o corante laranja de acridina como marcador, que fluoresce verde quando as células estão viáveis e vermelho-alaranjado quando lesadas [40]. Imagens de microscopia de força atômica (EasyScan II, Nanosurf, Liestal, Switzerland) em modo intermitente (512 × 512 pixels) foram adquiridas em uma janela de varredura de  $10 \times 10 \mu m$ .

#### **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 5.1 Susceptibilidade da C. albicans

A Figura 7 mostra a porcentagem de viabilidade de *C. albicans* em função da fluência. Nos grupos controle vemos que a *C. albicans* é pouco susceptível a irradiação com o laser (50 J/cm<sup>2</sup>) sem a presença do MWCNT e apresenta uma pequena diminuição na viabilidade do fungo com o MWCNT, mas sem irradiação laser. Embora o simples contato do MWCNT com microrganismos possa gerar danos na parede celular [41,42], nosso resultado indica que a concentração utilizada, associada ao baixo tempo de contato, não foi suficiente para uma diminuição significativa da viabilidade da *C. albicans*. Este resultado sugere que nessa configuração o MWCNT, apresenta baixa toxicidade ao fungo, com resultados semelhantes relatados para outros microrganismos [11,12]. Embora a inativação não tenha sido totalmente alcançada, a viabilidade celular do fungo foi significantemente reduzida (~ 96 %) com o

aumento da fluência aplicada. Vale ressalvar que a *C. albicans*, assim como outros fungos, pode ser mais resistente do que bactérias devido à presença de uma membrana nuclear que pode atuar como uma barreira adicional de proteção [43,44].



**Figura 7** – Viabilidade celular da dispersão de *C. albicans*. O grupo controle é composto da análise da dispersão de *C. albicans*; *C. albicans* irradiada (50 J/cm<sup>2</sup>); *C. albicans* + MWCNTs (sem irradiar). Os outros resultados são referentes a mistura das dispersões de *C. albicans* + MWCNTs irradiadas com diferentes fluências. Os grupos com resultados significativamente diferente entre si, estão indicados no gráfico.

#### 5.2 Análise microscópica

A microscopia de fluorescência associada a marcadores adequados dá indicação da viabilidade celular. A Figura 8 exibe imagens da dispersão do fungo para os grupos controles e irradiados.



**Figura 8** – Microscopia de fluorescência das dispersões de *C. albicans*. A dimensão das barras de escala é 50  $\mu$ m.

A predominante fluorescência esverdeada dos grupos controles, indicam que as células fúngicas estão viáveis mesmo com a presença de MWCNT ou da irradiação isoladamente. As imagens corroboram os resultados de susceptibilidade apresentados na Figura 7 mostrando que, a viabilidade do fungo é reduzida com o aumento da fluência aplicada a dispersão de MWCNT + fungo, representada pela fluorescência mais vermelho-alaranjado das imagens.

A técnica de microscopia de fluorescência é uma ferramenta complementar no estudo da viabilidade celular, porém não revela detalhes sobre os danos que podem ocorrer, ocasionados pelo processo de irradiação, durante a morte celular. Por outro lado, a microscopia de força atômica (AFM) permite analisar irregularidades na estrutura da célula, que podem ser produzidas durante o processo de irradiação [36,39,45].



Figura 9 – Imagens de AFM para C. albicans (grupos controles e irradiados).

A Figura 9 mostra as imagens de AFM em 2D para os grupos controle, das dispersões de *C. albicans*, *C. albicans* + laser e *C. albicans* + MWCNTs. Além disso, são apresentadas as imagens para os sistemas de *C. albicans* + MWCNTs irradiados, com diferentes fluências. Como esperado, as células fúngicas são aproximadamente esféricas, e após a irradiação, as

estruturas apresentam formas irregulares com reentrâncias consistentes com as encontradas em investigação de morte celular de *C. albicans* [37,46,47].



**Figura 10** – Perfis de altura obtidos de uma seção transversal das imagens de microscopia de força atômica.

Os perfis de altura na Figura 10 revelam que após o processo de irradiação a parede celular do fungo parece ter sido rompida, levando a uma diminuição da altura e aumento da

rugosidade. Os resultados indicam que a inativação da *C. albicans* pode ocorrer por danos na parede celular gerados pelo efeito fototérmico promovido pelo MWCNT + NIR [20,24]. Em resumo, o MWCNT é candidato a agente fototérmico na inativação da *C. albicans* que deve ocorrer devido a danos causados nas paredes celulares.

#### 5.3 Leis de escala dinâmica e conceitos fractais

As imagens de AFM (Figura 9) da superfície da *C. albicans* foram analisadas utilizando conceitos fractais e leis de escala [30]. As Figuras 11 e 12 apresentam gráficos do log *W* versus log *L*, sendo *W* a rugosidade média quadrática da superfície e *L* a largura da janela de varredura. Na região onde a lei de escala  $W_{sat} \propto L^{\alpha}$  é satisfeita, o valor de  $\alpha$  pode ser obtido pela inclinação da curva e a dimensão fractal, DF, da superfície pode ser calculada por:  $DF = 3 - \alpha$  [30]. A fractalidade das superfícies relaciona o efeito da variação da rugosidade com a janela de observação.



**Figura 11** – Gráfico log-log da rugosidade, W, em função do tamanho da janela de varredura, L, para a superfície de *C. albicans* + MWCNTs. O detalhe na figura corresponde ao perfil de altura, indicando que o comprimento de crossover,  $L_x$ , corresponde ao diâmetro médio dos fungos.

Com comportamento similar para todos os grupos controle, a Figura 11 mostra as regiões onde as leis de escala são satisfeitas para a superfície de *C. albicans* + MWCNT, sem irradiação. Há dois regimes de crescimento distintos, delimitados pelo comprimento de crossover, L<sub>x</sub> [48,49]. O diâmetro médio da *C. albicans*, observado neste trabalho é de ~ 1  $\mu$ m e foi estimado das imagens de AFM por meio do software do programa NanoReport (NanoSurf) e corresponde ao valor de L<sub>x</sub>. Para comprimentos de escala menores que L<sub>x</sub>, a análise é feita na superfície de uma única célula fúngica e o expoente de rugosidade é ~ 0.8 com DF ~ 2 (Tabela 1) que é consistente com uma superfície quase-Euclidiana, associada a uma superfície relativamente plana. Este valor é similar ao encontrado por Vicsek para colônias de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* [50].

	C. albicans		C. albicans + laser		C. albicans + MWCNT		5 J/cm <sup>2</sup>	15 J/cm <sup>2</sup>	30 J/cm <sup>2</sup>	50 J/cm <sup>2</sup>
α	$L > L_x$	$L < L_x$	$L > L_x$	$L < L_x$	$L > L_x$	$L < L_x$	0.25	0.05	0.07	0.00
	0.2	0.77	0.2	0.76	0.2	0.8	0.35	0.35	0.37	0.32
DF	2.8	2.23	2.8	2.24	2.8	2.2	2.65	2.65	2.63	2.69

**Tabela 1.** Expoentes de rugosidade e dimensões fractais.

\* Lx é o comprimento de crossover

Para comprimentos de escala maiores que  $L_x$ , a superfície dos fungos é caracterizada como um fractal que pode ser descrito pelo modelo de Eden, com  $\alpha = 0.2$ . Os resultados encontrados para *C. albicans* no grupo controle, estão em acordo com os encontrados por Moreau [51] para descrição de crescimento de colônias de bactérias *Xylella fastidiosa*. O modelo de Eden para investigação da formação de colônias de bactérias e culturas de tecidos [30,52] propõe que o crescimento ocorre a partir de uma região de nucleação e novas partículas/células ocupam sítios vazios a partir de uma escolha aleatória, com a mesma probabilidade de ocupação para todos os sítios da interface. O resultado é uma estrutura compacta com superfície bastante sinuosa. Os resultados numéricos para os expoentes de rugosidade, quando D = 3, obtidos por simulação computacional é 0.2 [30,53]. Esse modelo corresponde a proposta mais simples para crescimento celular, baseada na deposição aleatória de partículas/células e no fenômeno de agregação. Os dois regimes de crescimento deixam de existir quando o sistema *C. albicans* + MWCNT é irradiado. O comportamento de todas as superfícies irradiadas são semelhantes ao apresentado na Figura 12 que é referente a análise feita para o grupo irradiado com 30 J/cm<sup>2</sup>.



**Figura 12** – Gráfico log-log da rugosidade, W, em função do tamanho da janela de varredura, L, para a superfície de *C. albicans* + MWCNTs irradiada com fluência de 30 J/cm<sup>2</sup>.

As superfícies são fractais *self-affine* descritos pelo modelo proposto por Kardar-Parisi-Zhang (KPZ) que prevê o expoente de rugosidade variando entre 0.3 e 0.4 [30,49,54,55]. O modelo propõe que o crescimento ocorre como resultado da deposição de partículas/células e relaxamento da superfície produzida por crescimento lateral e dessorção. A equação diferencial estocástica que descreve a dinâmica do modelo de KPZ é dada por:

$$\frac{\partial h(x,t)}{\partial t} = \lambda \nabla^2 h + \frac{\lambda^*}{2} (\nabla h)^2 + \phi + F(x,t)$$
(12)

O primeiro termo no segundo membro  $(\lambda \nabla^2 h)$  indica a suavização da superfície.  $\lambda$  é um coeficiente relacionado a tensão de superfície. O termo não linear  $\frac{\lambda^*}{2}(\nabla h)^2$  se refere ao

crescimento lateral da interface.  $\phi$  é o número médio de partículas/células depositadas no sítio *x*, e *F*(*x*,*t*) consiste na flutuação aleatória no processo de deposição [30].

Com a irradiação dos sistemas *C. albicans* + MWCNT, provavelmente ocorre o rompimento das paredes celulares e as superfícies dos fungos ficam mais rugosas, alterando o comportamento do regime de crescimento, que passa a ser descrito por um único  $\alpha$ . O padrão fractal reflete a auto-organização do microrganismo e o método de análise de imagens pode ser aplicado para estudar a relação entre os efeitos de parâmetros exteriores, tais como a irradiação e a alteração morfológica. Os modelos matemáticos correspondem a uma ferramenta poderosa para diferenciar essas alterações e contribuir com a descrição física da formação de biofilmes [56], crescimento de colônias ou inativação de microrganismos [28].

#### 6 CONCLUSÃO

O MWCNT associado a NIR é eficaz no combate de *Candida albicans* podendo ser utilizado como um agente fototérmico. A microscopia de fluorescência confirma os resultados de viabilidade celular da *C. albicans*, que com a presença do MWCNT + NIR teve redução de 96%. As imagens e os perfis de altura obtidos por AFM indicam que a morte dos fungos pode ter sido ocasionada pela ruptura de suas paredes celulares. Os danos causados nas estruturas dos fungos alteram a rugosidade das células e essas alterações foram descritas por parâmetros definidos por modelos matemáticos. A análise de imagens por conceitos fractais, leis de escala e modelos de crescimento, contribuem para o entendimento de como as células fúngicas reagem ao efeito fototérmico gerado pela combinação de MWCNTs + NIR, o que pode auxiliar na identificação de novas estratégias e futuras aplicações de CNTs para inativação de microrganismos.

## REFERÊNCIAS

[1] G. Cheng, M. Dai, S. Ahmed, H. Hao, X. Wang, Z. Yuan, Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance, Front. Microbiol. 7 (2016) 1–11. doi:10.3389/fmicb.2016.00470.

[2] W. Xiong, Y. Sun, Z. Zeng, Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals, Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (2018) 18377–18384. doi:10.1007/s11356-018-1852-2.

[3] D. Williams, M. Lewis, Pathogenesis and treatment of oral candidosis, J. Oral Microbiol. 3 (2011) 5771. doi:10.3402/jom.v3i0.5771.

[4] J. Mensa, C. Pitart, F. Marco, Treatment of critically ill patients with candidemia, Int. J. Antimicrob. Agents. 32 (2008) S93–S97. doi:10.1016/S0924-8579(08)70007-4.

[5] Pa. Krishnan, Fungal infections of the oral mucosa, Indian J. Dent. Res. 23 (2012) 650. doi:10.4103/0970-9290.107384.

[6] L.P. Samaranayake, W. Keung Leung, L. Jin, Oral mucosal fungal infections, Periodontol. 2000. 49 (2009) 39–59. doi:10.1111/j.1600-0757.2008.00291.x.

[7] P.-W. Tsai, Y.-T. Chen, P.-C. Hsu, C.-Y. Lan, Study of Candida albicans and its interactions with the host: A mini review, BioMedicine. 3 (2013) 51–64. doi:10.1016/j.biomed.2012.12.004.

[8] C.A. Kumamoto, M.D. Vinces, Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to Candida albicans virulence, Cell. Microbiol. 7 (2005) 1546–1554. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00616.x.

[9] J. Chandra, D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, M.A. Ghannoum, Biofilm Formation by the Fungal Pathogen Candida albicans: Development, Architecture, and Drug Resistance, J. Bacteriol. 183 (2001) 5385–5394. doi:10.1128/JB.183.18.5385-5394.2001.

[10] D.M. Arana, C. Nombela, J. Pla, Fluconazole at subinhibitory concentrations induces the oxidative- and nitrosative-responsive genes TRR1, GRE2 and YHB1, and enhances the resistance of Candida albicans to phagocytes, J. Antimicrob. Chemother. 65 (2010) 54–62. doi:10.1093/jac/dkp407.

[11] J.-W. Kim, E. V. Shashkov, E.I. Galanzha, N. Kotagiri, V.P. Zharov, Photothermal antimicrobial nanotherapy and nanodiagnostics with self-assembling carbon nanotube clusters, Lasers Surg. Med. 39 (2007) 622–634. doi:10.1002/lsm.20534.

[12] N. Levi-Polyachenko, C. Young, C. MacNeill, A. Braden, L. Argenta, S. Reid, Eradicating group A streptococcus bacteria and biofilms using functionalised multi-wall carbon nanotubes, Int. J. Hyperth. 30 (2014) 490–501. doi:10.3109/02656736.2014.966790.

[13] R. Alshehri, A.M. Ilyas, A. Hasan, A. Arnaout, F. Ahmed, A. Memic, Carbon Nanotubes in Biomedical Applications: Factors, Mechanisms, and Remedies of Toxicity, J. Med. Chem. 59 (2016) 8149–8167. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01770.

[14] S. Vardharajula, S.Z. Ali, P.M. Tiwari, E. Eroğlu, K. Vig, V.A. Dennis, S.R. Singh, Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications, Int. J. Nanomedicine. 7 (2012) 5361–5374. doi:10.2147/IJN.S35832.

[15] J.-G. Yu, F.-P. Jiao, X.-Q. Chen, X.-Y. Jiang, Z.-G. Peng, D.-M. Zeng, D.-S. Huang, Irradiation-mediated carbon nanotubes' use in cancer therapy, J. Cancer Res. Ther. 8 (2012) 348–354. doi:10.4103/0973-1482.103511.

[16] A. Joshi, S. Punyani, S.S. Bale, H. Yang, T. Borca-Tasciuc, R.S. Kane, Nanotubeassisted protein deactivation, Nat. Nanotechnol. 3 (2008) 41–45. doi:10.1038/nnano.2007.386.

[17] D. Boldor, N.M. Gerbo, W.T. Monroe, J.H. Palmer, Z. Li, A.S. Biris, Temperature Measurement of Carbon Nanotubes Using Infrared Thermography, Chem. Mater. 20 (2008) 4011–4016. doi:10.1021/cm800428e.

[18] A. Blázquez-Castro, L.L. Colombo, S.I. Vanzulli, J.C. Stockert, NIR laser pointer for in vivo photothermal therapy of murine LM3 tumor using intratumoral China ink as a photothermal agent, Lasers Med. Sci. 33 (2018) 1307–1315. doi:10.1007/s10103-018-2483-z.

[19] D. Jaque, L. Martínez Maestro, B. del Rosal, P. Haro-Gonzalez, A. Benayas, J.L. Plaza, E. Martín Rodríguez, J. García Solé, Nanoparticles for photothermal therapies, Nanoscale. 6 (2014) 9494–9530. doi:10.1039/c4nr00708e.

[20] M. Camerin, S. Rello, A. Villanueva, X. Ping, M.E. Kenney, M.A.J. Rodgers, G. Jori, Photothermal sensitisation as a novel therapeutic approach for tumours: Studies at the cellular and animal level, Eur. J. Cancer. 41 (2005) 1203–1212. doi:10.1016/j.ejca.2005.02.021.

[21] T.A. Okhai, C.J. Smith, Principles and Application of RF System for Hyperthermia Therapy, in: Hyperthermia, InTech, 2013: pp. 171–184. doi:10.5772/55108.

[22] J.R. Lepock, Cellular effects of hyperthermia: relevance to the minimum dose for thermal damage, Int. J. Hyperth. 19 (2003) 252–266. doi:10.1080/0265673031000065042.

[23] Z. Sobhani, M.A. Behnam, F. Emami, A. Dehghanian, I. Jamhiri, Photothermal therapy of melanoma tumor using multiwalled carbon nanotubes, Int. J. Nanomedicine. Volume 12 (2017) 4509–4517. doi:10.2147/IJN.S134661.

[24] I. Marangon, C. Ménard-Moyon, A.K.A. Silva, A. Bianco, N. Luciani, F. Gazeau, Synergic mechanisms of photothermal and photodynamic therapies mediated by photosensitizer/carbon nanotube complexes, Carbon N. Y. 97 (2016) 110–123. doi:10.1016/j.carbon.2015.08.023.

[25] A. Burke, X. Ding, R. Singh, R.A. Kraft, N. Levi-Polyachenko, M.N. Rylander, C. Szot, C. Buchanan, J. Whitney, J. Fisher, H.C. Hatcher, R. D'Agostino, N.D. Kock, P.M. Ajayan,

D.L. Carroll, S. Akman, F.M. Torti, S. V. Torti, Long-term survival following a single treatment of kidney tumors with multiwalled carbon nanotubes and near-infrared radiation, Proc. Natl. Acad. Sci. 106 (2009) 12897–12902. doi:10.1073/pnas.0905195106.

[26] J.W. Fisher, S. Sarkar, C.F. Buchanan, C.S. Szot, J. Whitney, H.C. Hatcher, S. V. Torti, C.G. Rylander, M.N. Rylander, Photothermal Response of Human and Murine Cancer Cells to Multiwalled Carbon Nanotubes after Laser Irradiation, Cancer Res. 70 (2010) 9855–9864. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0250.

[27] T. Akasaka, M. Matsuoka, T. Hashimoto, S. Abe, M. Uo, F. Watari, The bactericidal effect of carbon nanotube/agar composites irradiated with near-infrared light on Streptococcus mutans, Mater. Sci. Eng. B. 173 (2010) 187–190. doi:10.1016/j.mseb.2010.01.001.

[28] A.S. Kalck, M.F.C. Pedro, K.F. dos Santos, M.S. Sousa, J.R. Silva, N.C. de Souza, Mathematical models and fractal analysis for the investigation of the photodynamic inactivation in phytopathogenic microorganisms, Colloids Surfaces B Biointerfaces. 171 (2018) 285–290. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.019.

[29] I.Y. Yanina, V.A. Bochko, J.T. Alander, V.V. Tuchin, Optical image analysis of fat cells for indocyanine green mediated near-infrared laser treatment, Laser Phys. Lett. 8 (2011) 684–690. doi:10.1002/lapl.201110048.

[30] A.-L. Barabási, H.E. Stanley, Fractal Concepts in Surface Growth, 1 ed., Cambridge University Press, New York, 1995.

[31] F.E. Lennon, G.C. Cianci, N.A. Cipriani, T.A. Hensing, H.J. Zhang, C. Chen, S.D. Murgu, E.E. Vokes, M.W. Vannier, R. Salgia, Lung cancer—a fractal viewpoint, Nat. Rev. Clin. Oncol. 12 (2015) 664–675. doi:10.1038/nrclinonc.2015.108.

[32] S.S. Cross, The application of fractal geometric analysis to microscopic images, Micron. 25 (1994) 101–113. doi:10.1016/0968-4328(94)90057-4.

[33] J R. Jullien, Aggregation phenomena and fractal aggregates, Contemp. Phys. 28 (1987) 477–493. doi:10.1080/00107518708213736.

[34] G. Landini, Fractals in microscopy, J. Microsc. 241 (2011) 1-8. doi:10.1111/j.1365-2818.2010.03454.x.

[35] J. Aguirre, R.L. Viana, M.A.F. Sanjuán, Fractal structures in nonlinear dynamics, Rev. Mod. Phys. 81 (2009) 333–386. doi:10.1103/RevModPhys.81.333.

[36] F.D.S. Gorza, R.J. da Silva, T.F. Trescher, G.C. Pedro, M.A.O. de Sousa, P.C.S. Souto, J.R. Silva, N.C. de Souza, Immobilization of chlorophyll by using layer-by-layer technique for controlled release systems and photodynamic inactivation, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 15 (2016) 147–155. doi:10.1016/j.pdpdt.2016.06.010.

[37] K.F. dos Santos, R.J. da Silva, K.B. Romio, P.C.S. Souto, J.R. Silva, N.C. de Souza, Spray layer-by-layer films for photodynamic inactivation, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 15 (2016) 197–201. doi:10.1016/j.pdpdt.2016.06.006.

[38] S. Tolnai, A method for viable cell count, Tissue Cult. Assoc. Man. 1 (1975) 37–38. doi:10.1007/BF00914435.

[39] K.B. Romio, K.F. dos Santos, R.J. da Silva, M.F.C. Pedro, A.S. Kalck, M. da Silva Sousa, L.M. Possamai, P.C.S. Souto, J.R. Silva, N.C. de Souza, Incorporation of triclosan and acridine orange into liposomes for evaluating the susceptibility of Candida albicans, J. Photochem. Photobiol. B Biol. 173 (2017) 514–521. doi:10.1016/j.jphotobiol.2017.06.034.

[40] S. Strugger, Fluorescence microscope examination of bacteria in soil, Can. J. Res. 26c (1948) 188–193. doi:10.1139/cjr48c-019.

[41] H. Chen, B. Wang, D. Gao, M. Guan, L. Zheng, H. Ouyang, Z. Chai, Y. Zhao, W. Feng, Broad-Spectrum Antibacterial Activity of Carbon Nanotubes to Human Gut Bacteria, Small. 9 (2013) 2735–2746. doi:10.1002/smll.201202792.

[42] M.R. Hartono, A. Kushmaro, X. Chen, R.S. Marks, Probing the toxicity mechanism of multiwalled carbon nanotubes on bacteria, Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (2018) 5003–5012. doi:10.1007/s11356-017-0782-8.

[43] T.N. Demidova, M.R. Hamblin, Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation, Antimicrob. Agents Chemother. 49 (2005) 2329–2335. doi:10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005.

[44] A. M. Carmona-Ribeiro, Self-Assembled Antimicrobial Nanomaterials, *Int. J. Environ. Res. Public Health 15* (2018) 1-29. doi:10.3390/ijerph15071408.

[45] M.F. Costa Pedro, A.S. Kalck, K.F. dos Santos, M.S. Sousa, K.B. Romio, P.C.S. Souto, J.R. Silva, N.C. de Souza, Immobilization of triclosan and erythrosine in layer-by-layer films applied to inactivation of microorganisms, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 22 (2018) 158–165. doi:10.1016/j.pdpdt.2018.04.012.

[46] J. Kim, P. Sudbery, Candida albicans, a major human fungal pathogen, J. Microbiol. 49 (2011) 171–177. doi:10.1007/s12275-011-1064-7.

[47] S. Gonçalves, P.M. Silva, M.R. Felício, L.N. de Medeiros, E. Kurtenbach, N.C. Santos, Psd1 Effects on Candida albicans Planktonic Cells and Biofilms, Front. Cell. Infect. Microbiol. 7 (2017) 1–13. doi:10.3389/fcimb.2017.00249.

[48] N.C. De Souza, V. Zucolotto, J.R. Silva, F.R. Santos, D.S. Dos Santos, D.T. Balogh, O.N. Oliveira, J.A. Giacometti, Morphology characterization of layer-by-layer films from PAH/MA-co-DR13: The role of film thickness, J. Colloid Interface Sci. 285 (2005) 544–550. doi:10.1016/j.jcis.2004.11.058.

[49] N.C. de Souza, M. Ferreira, K. Wohnrath, J.R. Silva, O.N. Oliveira, J.A. Giacometti, Morphological characterization of Langmuir–Blodgett films from polyaniline and a ruthenium complex (Rupy): influence of the relative concentration of Rupy, Nanotechnology. 18 (2007) 075713. doi:10.1088/0957-4484/18/7/075713.

[50] T. Vicsek, M. Cserző, V.K. Horváth, Self-affine growth of bacterial colonies, Phys. A Stat. Mech. Its Appl. 167 (1990) 315–321. doi:10.1016/0378-4371(90)90116-A.

[51] A.L.D. Moreau, G.S. Lorite, C.M. Rodrigues, A.A. Souza, M.A. Cotta, Fractal analysis of Xylella fastidiosa biofilm formation, J. Appl. Phys. 106 (2009) 024702. doi:10.1063/1.3173172.

[52] J. Wakita, K. Komatsu, A. Nakahara, T. Matsuyama, M. Matsushita, Experimental Investigation on the Validity of Population Dynamics Approach to Bacterial Colony Formation, J. Phys. Soc. Japan. 63 (1994) 1205–1211. doi:10.1143/JPSJ.63.1205.

[53] R. Jullien, R. Botet, Scaling properties of the surface of the Eden model in d=2, 3, 4, J. Phys. A. Math. Gen. 18 (1985) 2279–2287. doi:10.1088/0305-4470/18/12/026.

[54] M.N. Gomes, J.B. Brito, J.R. Silva, N.C. de Souza, Layer-by-Layer Films from Wine: An Investigation of an Exponential Growth Process, J. Nanomater. 2013 (2013) 1–7. doi:10.1155/2013/437203.

[55] R.C. Salvarezza, L. Vázquez, P. Herrasti, P. Ocón, J.M. Vara, A.J. Arvia, Self-Affine Fractal Vapour-Deposited Gold Surfaces Characterization by Scanning Tunnelling Microscopy, Europhys. Lett. 20 (1992) 727–732. doi:10.1209/0295-5075/20/8/011.

[56] P.W. Cox, G.C. Paul, C.R. Thomas, Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms, Microbiology. 144 (1998) 817–827. doi:10.1099/00221287-144-4-817.

#### **APÊNDICE A - METODOLOGIA**

#### A.1 Cultivo e dispersão de Candida albicans

Neste trabalho foi utilizado como modelo de microrganismo o fungo *Candida albicans* da cepa ATCC<sup>®</sup> 14053. O seu cultivo foi realizado em meio de cultura *Agar Sabouraud Dextrose* (KASVI<sup>®</sup>). Os procedimentos microbiológicos executados seguiram a metodologia padrão [1] e foram realizados em capela de fluxo laminar ESCO<sup>®</sup> modelo ACB-4A3. A vidraria empregada foi limpa, seca e esterilizada em autoclave CRISTÓFOLI<sup>®</sup> Vitale Plus. O crescimento da *C. albicans* ocorreu em uma estufa de cultura bacteriológica STERILIFER<sup>®</sup> SX 1.0 DTMC à temperatura de 36 ± 1°C.

A cultura estoque de *C. albicans* foi armazenada em água destilada, a temperatura ambiente e no escuro. A partir desta, foram preparados repiques (subcultivos) em meio de cultura *Agar Sabouraud Dextrose* à concentração de 65 mg/mL, conforme a indicação do fabricante. Os meios de cultura foram esterilizados e armazenados em placas de Petri a temperaturas entre 2-5 °C. A partir das placas de repique e com auxílio de uma alça de níquelcromo, foram preparadas suspensões com 9 mg de massa fúngica dispersa em 10 mL de solução fisiológica, de acordo com o trabalho de Trescher [2].

#### A.2 Nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono de múltiplas paredes funcionalizados com grupos carboxila (-COOH), foram adquiridos da *US Research Nanomaterials, Inc.* (Houston, EUA) e empregados como recebidos. Estes materiais apresentam diâmetros entre 50-80 nm, comprimentos de 10-20 µm e uma pureza maior que 95%. Os MWCNTs foram fabricados via deposição química em fase vapor, (CVD), e possuem 0,49% de COOH.

A dispersão de MWCNTs foi realizada em água purificada pelo o sistema QUIMIS<sup>®</sup> Q842-210, mediante a sonicação pelo aparelho Unique USC-800A. As suspensões foram previamente preparadas em concentrações de 0,25 mg/mL com sonicação por 2 horas e armazenadas no escuro a temperaturas entre 2-5 °C. Instantes antes de sua utilização, as suspensões de MWCNTs foram novamente sonicadas por 10 minutos, para garantir uma boa dispersão.

#### A.3 Investigação da susceptibilidade da C. albicans

Para investigar o efeito da combinação de MWCNTs e a irradiação infravermelho sobre o fungo *C. albicans*, foi empregado um laser pulsado de estado sólido (Nd:YAG) modelo *Q-smart 850 (Quantel Laser, Les Ulis, França)*, com comprimento de onda de 1064 nm e potência de 8,5 W (equivalente a 850 mJ de energia por pulso e taxa de repetição de 10 Hz).

O procedimento consistiu em colocar 10  $\mu$ L da suspensão de *C. albicans* e 70 $\mu$ L da suspensão de MWCNTs em um microtubo, fixado paralelamente na direção do feixe do laser à 30 cm de distância, como mostrado na Figura A1. Após 5 minutos de contato, o microtubo com a suspensão de *C. albicans* + MWCNTs foi irradiado. Grupos controles de *C. albicans*, *C. albicans* + laser e *C. albicans* + MWCNTs sem irradiação, foram preparados para avaliar a efetividade da associação de MWCNTs e a irradiação infravermelho no combate de *C. albicans*. Além disso, variou-se a fluência aplicada em 5, 15, 30 e 50 J/cm<sup>2</sup> (correspondente a uma região irradiada de 9 mm em diâmetro e tempo de irradiação de 0,4, 1,2, 2,3 e 3,8 s respectivamente) para analisar a influência da dose de energia no processo.



Figura A1 – Ilustração do sistema empregado para investigação do efeito fototérmico.

A viabilidade da *C. albicans* foi avaliada através do método de contagens de colônias em câmara de Neubauer [3]. A metodologia consistiu em acrescentar aos microtubos com as

suspensões de *C. albicans* + MWCNTs irradiados, nas diferentes fluências estudadas ou grupos controles, 20µL do corante azul de metileno (0,25 mg/mL). O azul de metileno é frequentemente utilizado na diferenciação de células vivas e mortas em suspensão. Este processo é conhecido como teste de exclusão do corante, pois apenas as células mortas são coradas [4]. Assim, após 5 minutos de contato, 10 µL dessas misturas com diluições idênticas foram transferidas para uma câmara de Neubauer (Marienfeld, Germany) associada a um microscópio óptico, para quantificação da população de microrganismos, considerando as células coradas de azul como mortas, e as transparentes como viáveis [5]. A determinação da viabilidade foi realizada mediante ao cálculo da equação A1, como no trabalho de Gorza [5].

# % células viáveis = $\frac{número \ de \ células \ vivas \ no \ quadrante}{número \ total \ de \ células \ contadas \ no \ quadrante} \times 100$ (A1)

Microscopias de fluorescência combinadas com o corante laranja de acridina foram realizadas para complementar as análises de viabilidade celular. O laranja de acridina é capaz de penetrar as células, fluorecendo verde quando as células do fungo estão viáveis e vermelho-alaranjado quando lesadas [6]. 20 µL das suspensões de *C. albicans* e MWCNTs irradiados, nas diferentes fluências investigadas ou grupos controles, foram depositadas sobre lâminas de vidro (36 mm x 14 mm x 1 mm) e acrescentado 10 µL do corante laranja de acridina (0,25 mg/mL). Após a secagem em temperatura ambiente, foi realizado a microscopia de fluorescência dessas lâminas com um microscópio NIKON<sup>®</sup> modelo Eclipse Ci/L.

A microscopia de força atômica, AFM, pode revelar informações estruturais, [7,8]. Neste trabalho as imagens AFM foram obtidas das lâminas preparadas como descrito anteriormente, através do microscópio de força atômica NANOSURF<sup>®</sup> EasyScan II em modo intermitente com resolução de 512 x 512 pixels e em janelas de varredura de 10 μm x 10 μm.

#### A.4 Processamento de imagens

As imagens de microscopia de força atômica obtidas neste trabalho foram processadas pelo software *NANOSURF*<sup>®</sup> *Report v5.1*. Este permite que as imagens sejam adequadamente tratadas, removendo distorções indesejadas. Dessa forma, após o tratamento, foram obtidos perfis de altura de uma seção transversal das imagens AFM, assim como, os parâmetros de

rugosidade média quadrática da superfície (conforme a janela de varredura investigada), para os diferentes grupos estudados. Os dados obtidos foram analisados por meio de conceitos de geometria fractal, leis de escala, e associados a modelos de crescimento.



Figura A2 – Ambiente de processamento e análise de imagens Nanosurf Report v5.1.

## REFERÊNCIAS

[1] T. Hartung, M. Balls, C. Bardouille, O. Blanck, S. Coecke, G. Gstraunthaler, D. Lewis, Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1, Altern. Lab. Anim. 30 (2002) 407–14.

[2] T. TRESCHER, Influência da Inativação Fotodinâmica sobre a Viabilidade e Dinâmica de Crescimento de Candida albicans, 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Materiais)
- Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2014.

[3] O. Bastidas, Cell Counting with Neubauer Chamber Basic Hemocytometer Usage, Tech. Note. (2013) 1–6.

[4] S. Tolnai, A method for viable cell count, Tissue Cult. Assoc. Man. 1 (1975) 37–38. doi:10.1007/BF00914435.

[5] F. GORZA, Imobilização em Filmes LbL de Clorofila Encapsulada em Lipossomos - Liberação de Fármacos e Inativação Fotodinâmica, 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em

Ciência de Materiais) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Mato Grosso, Barra do Garças/MT, 2014.

[6] S. Strugger, Fluorescence Microscope Examination of Bacteria in Soil, Can. J. Res. 26c (1948) 188–193. doi:10.1139/cjr48c-019.

[7] J.R. Silva, G. Cardoso, R.R.G. Maciel, N.C. de Souza, Morphological alterations on Citrobacter freundii bacteria induced by erythrosine dye and laser light, Lasers Med. Sci. 30 (2015) 469–473. doi:10.1007/s10103-013-1421-3.

[8] K.F. dos Santos, R.J. da Silva, K.B. Romio, P.C.S. Souto, J.R. Silva, N.C. de Souza, Spray layer-by-layer films for photodynamic inactivation, Photodiagnosis Photodyn. Ther. 15 (2016) 197–201. doi:10.1016/j.pdpdt.2016.06.006.

## APÊNDICE B - DIVULGAÇÃO DO TRABALHO

#### **B.1 Artigos publicados**

- ROMIO, K. B.; DOS SANTOS, K. F.; DA SILVA, R. J.; PEDRO, M. F. C.; KALCK, A. S.; SOUSA, M. S; POSSAMAI, L. M.; SOUTO, P. C. S.; SILVA, J. R.; DE SOUZA, N. C. Incorporation of triclosan and acridine orange into liposomes for evaluating the susceptibility of Candida albicans. Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology, v. 173, p. 514-521, 2017.
- ROCHA, H. D.; SOUSA, M. S.; DOS SANTOS, K. F.; DE SOUZA, N. C.; SILVA, J. R. Superhydrophobic films obtained from a spraying technique: Electrowetting dependence on the drying condition and ultraviolet irradiation. Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects, v. 517, p. 12-16, 2017.
- KALCK, A. S.; PEDRO, M. F. C.; DOS SANTOS, K. F.; SOUSA, M. S.; SILVA, J. R.; DE SOUZA, N. C. Mathematical models and fractal analysis for the investigation of the photodynamic inactivation in phytopathogenic microorganisms. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, v. 171, p. 285-290, 2018.
- **4.** PEDRO, M. F. C.; KALCK, A. S.; **DOS SANTOS, K. F.**; SOUSA, M. S.; ROMIO, K. B.; SOUTO, P. C. S.; SILVA, J. R.; DE SOUZA, N. C. Immobilization of triclosan and erythrosine in layer-by-layer films applied to inactivation of microorganisms. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, v. 22, p. 158-165, 2018.

#### B.2 Artigo aceito para publicação

1. FARIA, M. A. C.; SOUSA, M. S.; **DOS SANTOS, K. F.**; DE SOUZA, N. C.; SILVA, J. R. Growth and morphological properties of epicuticular wax films. Heliyon, 2019.

#### **B.3** Artigos submetidos

1. Kevin F. dos Santos, Marcos S. Sousa, João V. P. Valverde, Clarissa A. Olivati, Paula C. S. Souto, Josmary R. Silva, Nara C. de Souza. Fractal analysis and mathematical models for the investigation of photothermal inactivation of Candida albicans using carbon nanotubes, 2019.  Maria A. Oliveira de Sousa, Kevin F. dos Santos, Marcos S. Sousa, Marco A. de Faria, Herica D. Rocha, João V. P. Valverde, Rita P. Ribeiro, Paula C. S. Souto, Josmary R. Silva, Nara C. de Souza. Latex membranes with methylene blue dye for antimicrobial photodynamic therapy, 2019.

#### **B.4 Resumos publicados em anais de congressos**

- 1. DOS SANTOS, K. F.; DA SILVA, R. J.; ROMIO, K. B.; SOUTO, P. C. S.; SILVA, J. R.; SOUZA, N. C. Spray layer-by-layer films for photonic therapy. XVI Brazilian Materials Research Society Meeting, 2017, Gramado/RS.
- 2. SOUSA, M. S.; ROCHA, H. D.; **DOS SANTOS, K. F.**; SOUZA, N. C.; SILVA, J. R. Superhydrophobic films obtained from a spraying technique: Electrowetting dependence on the drying condition and ultraviolet irradiation. XVI Brazilian Materials Research Society Meeting, 2017, Gramado/RS.
- **3. DOS SANTOS, K. F.**; SOUSA, M. S.; VALVERDE, J. V. P.; SOUTO, P. C. S.; SILVA, J. R.; SOUZA, N. C. Influência de nanotubos de carbono na cinética de crescimento de microrganismos. VIII Workshop do PPGMat, 2018, Barra do Garças/MT.
- **4.** SOUSA, M. S.; **DOS SANTOS, K. F.**; VALVERDE, J. V. P.; SOUZA, N. C.; SILVA, J. R. Orientação de nanotubos de carbono em filmes usando a técnica Langmuir-Blodgett. VIII Workshop do PPGMat, 2018, Barra do Garças/MT.
- **5. DOS SANTOS, K. F.**; SOUSA, M. S.; VALVERDE, J. V. P.; SOUTO, P. C. S.; SILVA, J. R.; SOUZA, N. C. Influência de nanotubos de carbono na cinética de crescimento de microrganismos. VIII Semana Científica, 2018, Barra do Garças/MT.
- SOUSA, M. S.; DOS SANTOS, K. F.; VALVERDE, J. V. P.; SOUZA, N. C.; SILVA, J. R. Orientação de nanotubos de carbono em filmes usando a técnica Langmuir-Blodgett. VIII Semana Científica, 2018, Barra do Garças/MT.

## **B.5** Participação em eventos

- 1. XVI Brazilian Materials Research Society Meeting. Gramado/RS, 2017.
- 2. VIII Workshop do PPGMat. Barra do Garças/MT, 2018.
- 3. VIII Semana Científica. Barra do Garças/MT, 2018.