

**Ensaio de biofilme com violeta de cristal em ligas CuAlNi modificadas com grafeno:
avaliação quantitativa da formação de biofilme**

**Biofilm assay with crystal violet in graphene-modified CuAlNi alloys: quantitative
evaluation of biofilm formation**

**Ensayo de biopelículas con cristal violeta en aleaciones de CuAlNi modificadas con
grafeno: evaluación cuantitativa de la formación de biopelículas**

DOI: 10.54901/educa.v9-254

Ma. Elisabeth Aline de Melo Gomes Soares Dias¹
Mestr. Laura Cristina da Silva Faour-Velocci²
Esp. Luiz Henrique do Nascimento Velocci³
Dout. Juliana Martins Ferreira⁴
Ma. Carla Maria Melleiro Gimenez⁵
Esp. Cristiane Cunha Lima⁶

RESUMO: A formação de biofilme em biomateriais metálicos representa um desafio significativo para aplicações biomédicas, especialmente em ambientes orais. Este estudo avaliou quantitativamente a formação de biofilme em ligas CuAlNi com e sem adição de óxido de grafeno (GO), utilizando o ensaio de cristal violeta (Crystal Violet Biofilm Assay). Discos metálicos foram produzidos e submetidos à inoculação com *Candida albicans* (ATCC 90028), com incubação por 24 e 48 horas. A biomassa do biofilme foi quantificada por absorbância em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados demonstraram redução significativa na formação de biofilme nas amostras contendo grafeno ($p < 0,05$), sugerindo efeito antibiofilme associado às propriedades físico-químicas do GO. Conclui-se que a modificação da liga CuAlNi com grafeno pode representar uma estratégia promissora para controle microbológico em biomateriais.

Palavras-chave: biofilme; *Candida albicans*; cristal violeta, CuAlNi; grafeno.

¹ Mestra em Ciências e Engenharia dos Materiais, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil.
E-mail: alineufpe@hotmail.com

² Mestranda em Endodontia, Faculdade São Leopoldo Mandic, Campinas, São Paulo, Brasil.
E-mail: lauracsfaour@hotmail.com

³ Especialista em Implantodontia, Associação Brasileira de Odontologia Regional Santos, Santos, São Paulo, Brasil. E-mail: velace@gmail.com

⁴ Doutoranda em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
E-mail: julianamartinsferreira27@gmail.com

⁵ Mestra em Ortodontia e Laserterapia, Associação Odontológica de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. E-mail: carlamg@yahoo.com

⁶ Especialista em Saúde Pública, Universidade Nove de Julho, São Paulo, São Paulo, Brasil.
E-mail: crislipeleo@yahoo.com.br

1 INTRODUÇÃO

A adesão microbiana em superfícies metálicas representa um dos principais desafios para a longevidade e segurança dos biomateriais utilizados na odontologia. A formação de biofilmes por fungos oportunistas, especialmente *Candida albicans*, está diretamente relacionada ao desenvolvimento de infecções persistentes, aumento da resistência a agentes antifúngicos e comprometimento clínico de dispositivos odontológicos.

As ligas CuAlNi destacam-se por suas propriedades mecânicas, resistência à deformação e potencial aplicação biomédica. Entretanto, a interação dessas superfícies com microrganismos pode favorecer a colonização celular e a maturação do biofilme.

Nesse contexto, a modificação superficial com nanomateriais à base de grafeno tem despertado grande interesse científico devido às suas características físico-químicas e ao potencial efeito antimicrobiano. Estudos demonstram que o óxido de grafeno pode atuar por diferentes mecanismos, incluindo ruptura estrutural da membrana celular, indução de estresse oxidativo e alteração das propriedades de superfície do material.

Entre os métodos empregados para análise microbiológica, o ensaio de cristal violeta (Crystal Violet Biofilm Assay) é amplamente reconhecido pela capacidade de mensurar quantitativamente a biomassa aderida, apresentando elevada reprodutibilidade e sensibilidade experimental.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar quantitativamente a formação de biofilme em ligas CuAlNi modificadas com óxido de grafeno, comparando seu comportamento microbiológico com superfícies metálicas convencionais.

2 METODOLOGIA

O presente estudo caracterizou-se como uma pesquisa experimental quantitativa, conduzida *in vitro*, com o objetivo de avaliar a formação de biofilme por *Candida albicans* em ligas CuAlNi modificadas com óxido de grafeno (GO), por meio do ensaio de cristal violeta (Crystal Violet Biofilm Assay).

2.1 Preparação das Amostras

Foram confeccionados discos metálicos com dimensões padronizadas de 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, distribuídos em dois grupos experimentais:

- a) Grupo controle: liga CuAlNi sem modificação superficial;
- b) Grupo experimental: liga CuAlNi incorporada com 1,96% de óxido de grafeno (GO).

Após a confecção, os espécimes foram submetidos ao polimento mecânico para padronização superficial, seguidos de limpeza em ultrassom para remoção de resíduos e partículas contaminantes. Posteriormente, realizou-se a esterilização em autoclave sob condições adequadas de temperatura e pressão.

2.2 Microrganismo e Preparo do Inóculo

Foi utilizada a cepa *Candida albicans* ATCC 90028, cultivada em meio Ágar Sabouraud Dextrose. Após crescimento microbiológico, a suspensão celular foi preparada e ajustada para turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland, equivalente aproximadamente a 1×10^6 células/mL.

2.3 Formação do Biofilme

Os discos metálicos foram individualmente posicionados em placas de cultura de 24 poços contendo meio Sabouraud Dextrose previamente inoculado com a suspensão fúngica padronizada. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C durante períodos experimentais de 24 e 48 horas, permitindo a adesão celular e o desenvolvimento do biofilme sobre as superfícies metálicas.

2.4 Ensaio de Cristal Violeta (Crystal Violet Biofilm Assay)

Após os períodos de incubação, os espécimes foram cuidadosamente lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remoção das células não aderidas. Em seguida, realizou-se a fixação do biofilme com metanol e posterior coloração utilizando solução de cristal violeta a 0,1%.

Posteriormente, os discos foram novamente lavados para remoção do excesso de corante não aderido. A biomassa do biofilme foi então solubilizada com etanol a 95%, permitindo a quantificação indireta da formação do biofilme por meio da leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm.

2.5 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas em software estatístico apropriado para estudos experimentais quantitativos.

3 DISCUSSÃO E RESULTADOS

A formação de biofilme por *Candida albicans* foi observada em todas as superfícies analisadas, demonstrando aumento progressivo da biomassa ao longo do período experimental (24 e 48 horas). Entretanto, diferenças significativas foram identificadas entre os grupos experimentais.

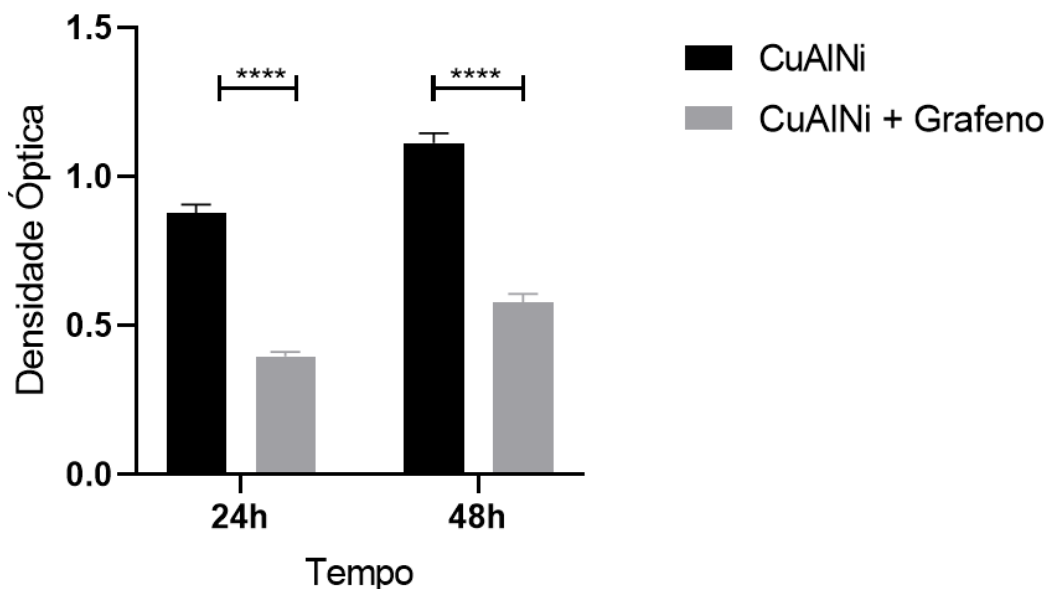
A análise quantitativa realizada pelo ensaio de cristal violeta evidenciou que as ligas CuAlNi modificadas com óxido de grafeno (CuAlNiGO) apresentaram redução significativa da biomassa total do biofilme quando comparadas ao grupo controle (CuAlNi sem modificação), em ambos os tempos avaliados ($p < 0,05$).

Após 24 horas de incubação, observou-se redução moderada da biomassa aderida nas superfícies contendo GO, com diminuição estimada entre 30–40% em relação ao controle. Esse efeito tornou-se ainda mais pronunciado após 48 horas, quando a redução da formação de biofilme atingiu aproximadamente 50–60%, sugerindo efeito antifúngico dependente do tempo de exposição.

Os resultados da análise estatística por ANOVA de duas vias demonstraram interação significativa entre os fatores “tempo” e “tipo de superfície” ($p < 0,0001$), indicando que a incorporação do grafeno influenciou diretamente a cinética de desenvolvimento do biofilme.

Além disso, o grupo controle apresentou aumento expressivo da biomassa entre 24 e 48 horas, refletindo intensa maturação do biofilme. Em contrapartida, as amostras contendo grafeno exibiram crescimento significativamente menor da biomassa, sugerindo interferência do GO nos mecanismos de adesão celular, proliferação fúngica e organização da matriz extracelular.

Figura 1 – Formação de biofilme de *Candida albicans* em ligas CuAlNi com e sem modificação por óxido de grafeno, determinada por absorbância a 570 nm após 24 e 48 horas de incubação. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos experimentais (**** $p < 0,0001$).



Fonte: (Próprio Autor, 2026)

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A incorporação de grafeno à liga CuAlNi reduziu significativamente a formação de biofilme por *Candida albicans*, evidenciada pelo ensaio de cristal violeta. Esses resultados indicam que o uso de GO pode melhorar o desempenho biológico de ligas metálicas em aplicações biomédicas.

REFERÊNCIAS

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antifungal susceptibility testing: CLSI M44**. Wayne: CLSI, 2023.

DIDEIKIN, A. T.; VUL, A. Y. Graphene oxide and derivatives: the place in graphene family. **Frontiers in Physics**, v. 6, p. 149, 2019.

GE, X. *et al.* Graphene oxide modified surfaces for enhanced antibacterial activity. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 106, n. 12, p. 3060-3069, 2018.

HU, W. *et al.* Graphene-based antibacterial paper. **ACS Nano**, v. 4, n. 7, p. 4317-4323, 2010.

KHAN, S. A. *et al.* Antibiofilm efficacy of graphene oxide-silver nanocomposite. **Sustainable Materials and Technologies**, v. 39, e00812, 2024.

KIM, J. *et al.* Biocompatibility of graphene-based nanomaterials. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 11, n. 2, p. 785-798, 2025.

KRISHNAMOORTHY, K. *et al.* Graphene-based nanomaterials for biomedical applications and antimicrobial activity. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 4, p. 4560-4575, 2022.

LIU, Y. *et al.* Graphene-based materials for biomedical applications. **Biomaterials Advances**, v. 162, p. 214102, 2024.

PALMIERI, V. *et al.* Graphene oxide coatings prevent *Candida albicans* biofilm formation with low cytotoxicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1333, 2018.

PERREAULT, F.; DE FARIA, A. F.; ELIMELECH, M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 16, p. 5861-5896, 2015.

ROSA, V. *et al.* Graphene-based materials in dentistry: current applications and future perspectives. **Dental Materials**, v. 38, n. 5, p. 761-779, 2022.

SILVA, A. *et al.* *Candida albicans* biofilm formation and clinical implications. **Journal of Fungal Biology**, v. 14, n. 3, p. 145-158, 2022.

SONG, J. *et al.* Antibiofilm properties of graphene oxide in oral biomedical applications: a systematic review. **Biomaterials Advances**, v. 146, p. 213292, 2023.

WANG, L. *et al.* Antimicrobial mechanisms of graphene derivatives. **Nano Today**, v. 44, p. 101487, 2022.

ZHANG, X. *et al.* Antifungal activity of graphene oxide nanomaterials. **Materials Science & Engineering C**, v. 148, p. 114219, 2023.