

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE MATERIAIS

GABRIELE SCHEIDT

FILMES FINOS DE COBRE/ÓXIDO DE COBRE COMO AGENTES INIBIDORES DA
ADESÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS

Ponta Grossa
2013

GABRIELE SCHEIDT

FILMES FINOS DE COBRE/ÓXIDO DE COBRE COMO AGENTES INIBIDORES DA
ADESÃO DE BIOFILMES BACTERIANOS

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Mestrado em Engenharia e
Ciência de Materiais da Universidade
Estadual de Ponta Grossa, como requisito
para a obtenção do título de MESTRE EM
ENGENHARIA E CIÊNCIA DE MATERIAIS.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Mazurek
Tebcherani

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi

Agência financiadora: CAPES

Ponta Grossa

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S318 Scheidt, Gabriele
Filmes finos de cobre/óxido de cobre
como agentes inibidores da adesão de
biofilmes bacterianos/ Gabriele Scheidt.
Ponta Grossa, 2013.
45f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e
Ciência de Materiais - Área de
Concentração: Desenvolvimento e
Caracterização de Materiais), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Sergio Mazurek
Tebcherani.
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos
Pileggi.

1.Filme fino. 2.Cobre. 3.Biofilmes.
4.Contaminação microbiana. 5.Acinetobacter
sp.. I.Tebcherani, Sergio Mazurek. II.
Pileggi, Marcos. III. Universidade
Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Engenharia e Ciência de Materiais. IV. T.

CDD: 671

GABRIELE SCHEIDT

FILMES FINOS DE COBRE/ÓXIDO DE COBRE COMO AGENTES INIBIDORES DA
ADESÃO DE BIOFILMES BASTERIANOS

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade
Estadual de Ponta Grossa, área de Engenharia e Ciência dos Materiais.

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2013.



Prof. Dr. Sergio Mazurek Tebcherani - Orientador
Doutor em Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Alfredo José Zara
Doutor em Química
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Evaldo Toniolo Kubaski
Doutor em Ciências (Engenharia Metalúrgica e de Materiais)
Itajara Minérios Ltda.

Dedico este trabalho ao meu filho que estava em meu ventre acompanhando todos
os meus pensamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço carinhosamente aos meus professores Dr. Sergio Mazurek Tebcherani meu orientador e co-orientador: Prof. Dr. Marcos Pileggi, pela oportunidade de estudo, atenção e paciência nesta busca por novos conhecimentos. Ao professor Dr. Evaldo Toniolo Kubaski, pelas inúmeras correções e reflexões sobre o trabalho.

A minha família pelo amor, carinho e dedicação e principalmente por escutar minhas teorias que na maioria das vezes não eram claras, mas, que foram essenciais para minha autoestima, colaborando na persistência de meus estudos.

Aos meus amigos: Graciela, Renata, Bruna, Lilian, Ricardo, Leandro pela amizade, colaboração nas discussões de resultados.

Aos meus veteranos no mestrado: Samara, Juliana e Bento, por serem prestativos e receptivos.

A técnica do laboratório de Microbiologia Jana pela amizade e colaboração.

Ao meu querido esposo Luis pela sua dedicação e ajuda que me rendiam mais tempo para pensar, trabalhar e escrever.

A CAPES ao apoio financeiro.

RESUMO

Este trabalho consistiu em modificar a superfície de vidros comerciais por meio da deposição de filmes finos de cobre / óxido de cobre para fins antibacterianos. Ou seja, que apresentasse redução nos índices de contaminação bacteriana, por características bactericidas ou até mesmo pela inibição da adesão de biofilmes. A metodologia utilizada para a síntese dos filmes finos utiliza o efeito da elevada pressão durante determinado tempo em temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g). As condições de síntese dos filmes finos foram: a temperatura de 320 °C, a pressão constante de 3 MPa durante o período de 32 horas. Os filmes finos foram caracterizados pelas técnicas de difração de raios X e de microscopia eletrônica de varredura. Para os testes antibacterianos, utilizou-se como modelo experimental à bactéria *Acinetobacter* sp pela sua capacidade de formar biofilme. Na qual foi cultivada em caldo Luria e em lâminas planas após contato com vidros com e sem filmes. A metodologia de crescimento em caldo não foi eficiente para avaliar a eficiência do filme fino de cobre/óxido de cobre como agente antibacteriano. Estes resultados provavelmente são devidos a diluição das partículas biocidas em relação ao volume do meio de cultura líquido, fazendo com que a bioatividade seja diminuída. No entanto, nos testes em lâminas planas, as fotos por microscopia óptica mostram que os biofilmes não aderiram na superfície com filmes finos de cobre quando comparados com o controle, lâminas de vidro sem filmes, sendo portanto, eficiente no combate da adesão de biofilme, considerados um dos principais meios de contaminação bacteriana.

Palavras-chave: Filme fino. Cobre. Biofilmes. Contaminação microbiana. *Acinetobacter* sp.

ABSTRACT

This work consisted of modifying the surface of commercial glass using copper/copper oxide thin films to obtain bactericidal properties, that is, a thin film that showed a decrease in bacterial contamination either by bactericidal characteristics or inhibition of biofilm adhesion. The methodology used for film synthesis requires a certain time at elevated pressures at a temperature below the glass transition temperature (T_g). The conditions for thin film synthesis were the temperature of 320° C at constant pressure of 3 MPa during 32 h. The thin films were characterized by the techniques of X-ray diffraction and scanning electron microscopy. For biological assays, the bacteria *Acinetobacter* sp. was used by a standard method of immersion in Luria Broth with stages of dilution and cultured in a Petri dish, by a process of dripping broth on the surface of that blades, followed by Gram staining. The methodology of growth in broth did not allowed to evaluate the efficiency of thin film copper/copper oxide as bacteriological agent. This result is probably due to the dilution of biocidal particles in relation to the volume of the liquid culture media; consequently, a reduction in the bioactivity was observed. On the other hand, tests on slides showed that bacterial films did not adhere to the surface with copper thin films, as compared to slides without, showing effectiveness in combating biofilm adhesion that are considered one of the major means of bacterial contamination.

Keywords: Thin film. copper. biofilms. microbial contamination. *Acinetobacter* sp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Parede celular de bactérias Gram positivas (23).	15
Figura 2 Parede celular de bactérias Gram negativas (23)	16
Figura 3 Representação esquemática do mecanismo de formação de filme de óxidos na forma de pó nas condições de alta pressão em função da temperatura e do tempo, sendo (a) o tempo inicial e (b) o tempo final (53).	21
Figura 4 Desenho esquemático da metodologia dos testes usando esferas imersas em caldo	26
Figura 5 Desenho esquemático da metodologia utilizada para fazer os testes com superfícies planas.....	27
Figura 6 Metodologia da coloração de Gram (54).	28
Figura 7 Difratoograma de raios X do pó de CuO utilizado para síntese dos filmes finos.	29
Figura 8 Difratoograma de difração de raios X utilizando ângulo rasante na identificação de filmes finos.	30
Figura 9 Micrografia de microscopia eletrônica de varredura da superfície de filmes finos de cobre e o substrato de vidro com ampliação de 500x	32
Figura 10 Formação de cápsula pela bactéria <i>Acinetobacter</i> sp., visualizada pela técnica de coloração de Gins em microscopia ótica com aumento de 1000X.	33
Figura 11 - Referencial de controle de crescimento da bactéria <i>Acinetobacter</i> sp. em caldo Luria nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , após o contato com esferas de vidro sem filmes finos.....	34
Figura 12 Crescimento da bactéria <i>Acinetobacter</i> sp. em caldo Luria nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , após o contato com esferas de vidro contendo filmes finos de cobre.....	35
Figura 13 Biofilme bacteriano de <i>Acinetobacter</i> sp. nas superfícies de lâminas de vidro. Material obtido a partir da incubação em presença de esferas de vidro sem e (b) com filmes finos de cobre.	37

LISTA DE SÍMBOLOS

CVD	deposição por vapor químico
DRX	difração de raios X
FEG	<i>“field emission gun”</i>
MEV	microscopia eletrônica de varredura
PECVD	deposição por vapor químico enriquecidos com plasma
PVD	deposição por vapor físico
UV	ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS	13
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1	CONTAMINAÇÃO BACTERIANA.....	14
3.2	BACTÉRIAS	14
3.2.1	<i>Acinetobacter</i> sp.....	16
3.3	SUBSTRATO DE VIDRO PARA A FORMAÇÃO DE FILMES.....	17
3.4	MATERIAIS COM PROPRIEDADES BIOCIDAS	17
3.5	FILMES FINOS	19
3.5.1	Filmes finos por influência da pressão	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO.....	23
4.2	PREPARAÇÃO DO FILME NO SUBSTRATO VÍTREO.....	23
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	24
4.4	TESTES BACTERIANOS.....	24
4.4.1	Preparação dos meios de cultivos.....	24
4.4.2	A bactéria	24
4.4.3	Testes de inibição bacteriana em caldo	25
4.4.4	Avaliação de inibição bacteriana em superfícies planas	26
4.4.5	Coloração de Gram.....	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE COBRE.....	29
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES FINOS DEPOSITADOS NO SUBSTRATO DE VIDRO	30
5.3	TESTES BACTERIANOS.....	32
5.3.1	Caracterização de cápsulas bacterianas.....	32
5.3.2	Testes de inibição bacteriana em caldo	33
5.3.3	Avaliação de inibição bacteriana em superfícies planas	36
6	CONCLUSÕES.....	39

7	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	40
8	REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Superfícies de materiais contaminados por biofilmes bacterianos podem ser meios de transmissão de patógenos ao homem. Essa transmissão pode ocasionar infecções graves ou até mesmo leva-lo a morte.

Uma preocupação com a saúde em relação às bactérias está no ambiente hospitalar, pela debilidade do paciente o risco de contaminação aumenta.

Biofilmes contendo linhagens bacterianas possivelmente patogênicas podem estar por todo lugar, incluindo dispositivos médicos, superfícies de implantes, cozinhas industriais e domésticas, banheiros, entre muitos outros ambientes e objetos.

Algumas células bacterianas sobrevivem em superfícies graças a produção de biofilme, que permite uma maior proteção da célula contra dessecação, inibe a identificação de epítomos, aumenta a resistência a alguns antibióticos, e permitem adesão a superfícies relativamente lisas. Existem relatos sobre a maior resistência das bactérias aderidas no biofilme do que em forma livre (1-4). Esta resistência sugere a busca de materiais com superfícies que atuem como bactericida ou que diminuam a adesão destes biofilmes.

É conhecido que alguns óxidos e íons apresentam bioatividade, tais como, a prata como agente bactericida (5), as nanopartículas de óxido de zinco como agente fungicida (6) e o dióxido de titânio por meio de propriedades fotocatalíticas como agente bactericida (7, 8).

Em alguns estudos foi investigada a bioatividade do dióxido de titânio quando a matriz foi dopada com íons de prata (9, 10). Mas todo o efeito bactericida foi atribuído à ação da prata.

Outro material conhecido pela capacidade bactericida é CuO (11, 12).

Devido ao problema com a contaminação bacteriana é de interesse criar filmes finos com características biocidas, utilizando óxidos pela sua estabilidade, na superfície de diferentes materiais.

Existem várias técnicas para produção de filmes finos, como as técnicas físicas *dip-coating*, rádio frequência, feixe de íons de *sputtering* e ablação a laser, as quais são de custos elevados. Há também as técnicas químicas como a deposição

de vapor químico e os processos de sol-gel, mas dependem de diferentes variáveis para a produção de filmes.

Atualmente, um método idealizado pelo nosso grupo de pesquisa tem-se mostrado eficiente para a geração de filmes finos quando se utiliza temperaturas abaixo da transição vítrea (T_g), elevando-se a pressão do sistema em função do tempo. Neste método, algumas propriedades como a tenacidade, a dureza, a microdureza e a interação química em função do tamanho das partículas dos filmes finos já foram testadas (13-16). Uma das grandes vantagens deste método está na durabilidade do filme fino devido a grande interação que o mesmo exerce com o substrato (17).

Desta forma, este trabalho procura investigar a ação antibacteriana de filmes finos de cobre/óxido de cobre frente a células bacterianas livres em caldo e aderidas em biofilmes.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi:

Desenvolver um filme fino de cobre na superfície de um vidro comercial, que apresente redução nos índices de contaminação bacteriana, seja por características bactericidas ou até mesmo pela inibição da adesão de biofilmes.

Os objetivos específicos foram:

- Caracterizar o óxido na forma de pó por técnica de difração de raios X.
- Gerar os revestimentos de cobre/óxido de cobre em substrato de vidro comercial.
- Caracterizar os filmes finos formados por técnica de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo.
- Caracterizar os filmes finos por técnica de difração de raios X em baixo ângulo.
- Testar a ação biocida dos revestimentos contra a bactéria Gram-negativa *Acinetobacter* sp. pelo método padrão de imersão em caldos.
- Analisar a adesão do biofilme bacteriano na superfície de um substrato de vidro comercial com e sem filme.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CONTAMINAÇÃO BACTERIANA

Os seres humanos possuem mecanismos de defesa para permanecer saudáveis, como por exemplo, a pele, as membranas e as mucosas íntegras, que são barreiras contra a invasão microbiana (18).

Dentro do corpo, certas células e anticorpos (proteínas especializadas) podem atuar em conjunto para destruir os microrganismos. Mesmo assim, ainda somos suscetíveis aos patógenos (18).

As doenças infecciosas estão entre uma das principais causas de mortes no mundo inteiro (18). Muitas destas doenças são provocadas após contaminações por bactérias patogênicas.

Uma preocupação mais específica refere-se aos microrganismos patogênicos resistentes a antibióticos em ambientes hospitalares, porque atingem pacientes que se já se encontram debilitados (19).

Uma das formas de transmissão bacteriana mais comum acontece por contato entre uma pessoa e uma superfície de material colonizada por bactérias produtoras de biofilmes, os quais permitem alojamento de um número maior de microrganismos (20).

3.2 BACTÉRIAS

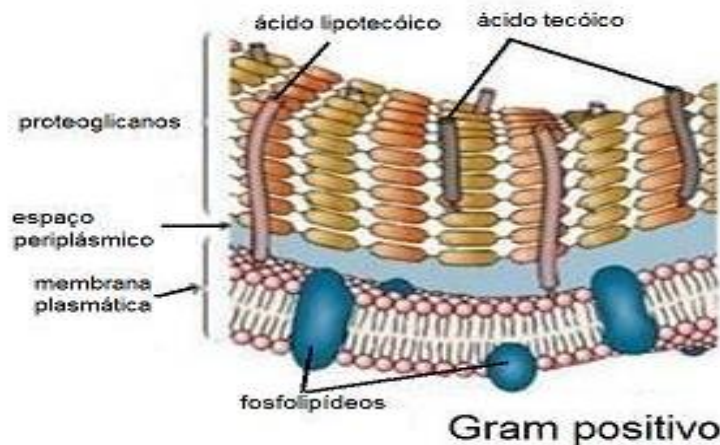
As bactérias são organismos unicelulares, procariontes e geralmente microscópicas ou submicroscópicas com dimensões variando de 0,5 a 5 μm . São também os organismos mais populosos do planeta (21).

As bactérias são células envolvidas por uma parede celular que é composta de carboidratos e proteínas, denominada de peptídeoglicana ou mureína. Caso a parede sofra ruptura o conteúdo é liberado e a célula morre (18). Isso demonstra o quanto a parede celular protege a célula contra agentes externos.

A estrutura da parede celular das bactérias pode ser dividida em dois grupos: As bactérias Gram positivas, conforme ilustrada na Figura 1, possuem uma parede celular espessa que protege a membrana citoplasmática. O principal componente da

parede é o peptideoglicano, o qual permite que a bactéria sobreviva num meio com pressão osmótica menor que a de seu citoplasma, e a sobrevivência em um meio agressivo como o suco biliar (22).

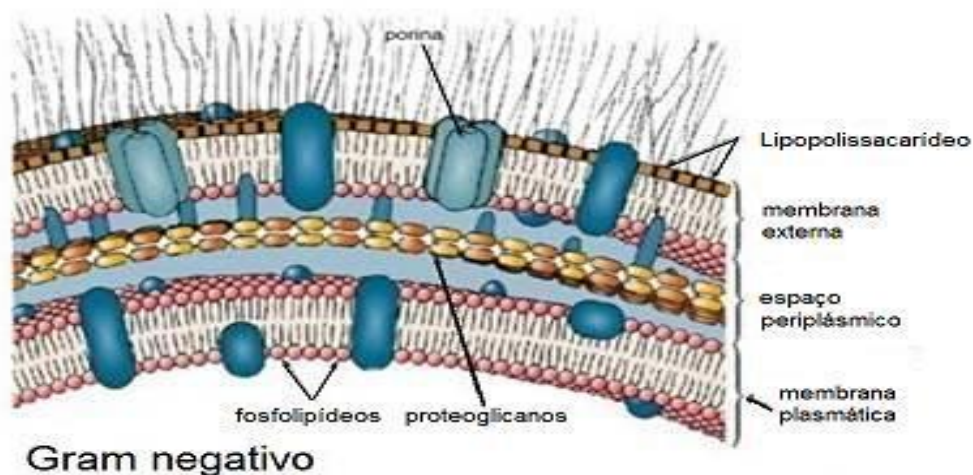
Figura 1 Parede celular de bactérias Gram positivas (23).



Fonte: Adaptado de (23).

O segundo grupo é o das bactérias Gram negativas (Figura 2), que possuem uma solução diferente na proteção da membrana citoplasmática. A estrutura dessas bactérias é composta de uma parede celular mais delgada e uma segunda membrana lipídica distinta quimicamente da membrana citoplasmática, e que se localiza no exterior da parede celular de peptideoglicano. Essa membrana pode resistir ao ataque de diversas substâncias químicas e, de modo geral, permitem que as Gram negativas sejam mais resistentes a antibióticos, especialmente a penicilina, do que as Gram positivas (22).

Figura 2 Parede celular de bactérias Gram negativas (23)



Fonte: Adaptado de (23).

Além da parede celular que é uma proteção para a célula, algumas bactérias são capazes de produzir uma estrutura de glicocalixe chamada cápsula, que envolve a parede celular, deixando a célula mais protegida, como relatado por YEZLI, S e colaboradores, podendo resistir em lugares secos por muitos dias (4).

Contribuem para uma maior virulência, pois, protegem as bactérias patogênicas da fagocitose pelas células do hospedeiro (18), formando o biofilme.

Biocidas como o cloreto de benzalcônio, o gluconato de clorexidina e o triclosan, comumente usados em hospitais, são eficientes contra bactérias de vida livre, porém, são ineficazes quando estas formam biofilmes aderidos em superfície (1).

A resistência de uma linhagem de *Pseudomonas* sp. a concentrações saturadas do biocida clorexidina foi atribuída à presença de cápsula (2, 3).

3.2.1 *Acinetobacter* sp.

O gênero *Acinetobacter* possui elevada versatilidade nutricional e metabólica, podendo adaptar-se facilmente a diferentes ambientes. Pode ser isolado a partir do solo, água, animais, pele e do trato intestinal de seres humanos saudáveis. Além destes nichos, também são encontrados em muitas superfícies de materiais,

principalmente no ambiente hospitalar, podendo sobreviver durante tempos prolongados e em condições ambientais diversas e serem responsáveis por surtos de infecção a nível hospitalar (24).

3.3 SUBSTRATO DE VIDRO PARA A FORMAÇÃO DE FILMES

O vidro é de um sólido iônico com estrutura amorfa, similar a de um líquido. O vidro é uma estrutura típica de óxido de um ametal, normalmente a sílica que, juntamente com outros óxidos, agem como modificadores da rede cristalina (25).

A deposição de filmes finos em superfície cristalinas depende de fatores como o contorno de grãos, as discordâncias, as partículas de impurezas e as irregularidades que atuam como agentes nucleantes, e nas superfícies de vidros somente as irregularidades ajudam no processo de impregnação dos filmes (26).

A elevação da temperatura potencializa a formação filmes finos na superfície do vidro, porém, corre-se o risco de alterar as propriedades da estrutura depositada na superfície. Os vidros à base de sílica dopados com outros óxidos apresentam aumento na fluidez quando submetidos ao aumento de temperatura. Nestas condições mudam-se algumas propriedades, tais como, o índice de refração, o calor específico e o volume. Esse ponto entre os estados do material denomina-se transição vítrea (T_g) (27).

A superfície do vidro é um sítio de forte adesão de biofilme bacteriano (28).

3.4 MATERIAIS COM PROPRIEDADES BIOCIDAS

Nanopartículas de ZnO foram testadas como fungicida, para aplicações de segurança agrícola e alimentar (6) ou ainda com a propriedade bactericida (29, 30). Outra pesquisa utilizou ZnO incorporado com celulose com forte atividade antibacteriana contra o *S. aureus*, *E. coli* e *Citrobacter* sp. (31).

Testes bacteriológicos foram realizados com diferentes concentrações de partículas de prata dispersas em caldo Luria, utilizando *E.coli* como modelo. Por microscopia eletrônica de transmissão confirmou que as células foram danificadas, mostrando a ruptura da parede celular e resultando na morte das células. Os resultados dos biocidas foram mais eficientes à medida que se aumentava as

concentrações de prata (32).

Um compósito cerâmico contendo AgO teve ação biocida para tratamentos de água, sendo relatados os possíveis mecanismos antimicrobianos, um deles o desprendimento de íons prata (II) na solução, gerando reações de oxirredução. As bactérias que sobreviveram não se multiplicam devido à hostilidade do meio contendo os íons de prata (33).

Foram realizados estudos dos mecanismos de ação bactericida de radiações UV-A e UV-C na presença ou não do dióxido de titânio como fotocatalizador (34). Os resultados foram indicativos de que a radiação UV-C foi a mais eficiente pelo fato de desencadear um processo oxidativo que acarreta danos para a membrana celular e não somente provocar mutações gênicas. Este processo oxidativo reduz em longo prazo o número de células bacterianas. Neste mesmo estudo (34), o dióxido de titânio não teve efeito bactericida ou bacteriostático quando não ocorreu o estímulo da radiação ultravioleta.

Outros trabalhos que utilizam TiO_2 demonstram que o efeito biocida somente ocorre com estímulo de radiação ultravioleta (7, 8, 35). Matrizes de TiO_2 são utilizados com outros dopantes, como íons de prata e cobre por exemplo, para melhorar o efeito biocida sem a necessidade da utilização da radiação, **mais** a eficiência biocida é atribuída aos íons cobre e prata (36, 37). Todavia, o uso da radiação ultravioleta acaba encarecendo a funcionalidade do processo.

Outra tentativa para melhorar o efeito da fotocatalise do TiO_2 , foi utilizar nitrogênio para promover absorções dentro do visível (38).

Outro método é o de pulverização catódica (*sputtering*), que foi utilizado para produção de filmes finos de ligas metálicas (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-4V com Cu-Mn-O e Ti-6Al-4V com Ag-Cu-Mn-O) para a avaliação da adsorção de biofilmes de duas estirpes bacterianas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) (39).

Dos diferentes filmes testados, aqueles que continham prata, foram os mais eficientes na adsorção dos biofilmes. A ação dos íons está na interação com ânions de oxigênio, nitrogênio, enxofre ou grupos tiois que resultam na inativação bacteriana (39). Outras trabalhos também relataram os mecanismos de ação da prata com resultados semelhantes ao já apresentado (32, 40).

Estudos dos efeitos bactericidas sobre vários elementos metálicos foram avaliados (41). A prata e o cobre metálico são mais efetivos que o cobalto, o níquel e o alumínio, apesar de também apresentam ação bactericida. Ainda neste estudo

(41), percebeu-se que a platina e o chumbo são seletivos e executam ação bactericida somente sobre a *Escherichia coli*. O vanádio e o zircônio, também são seletivos, porém com efeito em *Staphylococcus aureus* (41). Já o ouro na forma metálica não apresentou efeito bactericida, em contrapartida, o íon de Au^{+3} teve alta toxicidade contra *E. coli* e *S. aureus* e por fim o molibdênio teve efeito biocida com a diminuição do pH das soluções bacterianas (41).

O óxido de molibdênio (VI) também tem ação bactericida contra a *Pseudomonas aeruginosa* quando na forma de filmes finos (42). O estudo do efeito bactericida está relacionado ao número de oxidação do íon do molibdênio.

O CuO possui propriedades biocidas (11, 12, 43), no entanto, o seu modo de ação ainda não foi completamente esclarecido, mas, pela proximidade na distribuição periódica com a prata, é possível prever um mecanismo semelhante.

Sabe-se que alguns materiais têm propriedades biocidas, mais seus modos de ação ainda não estão bem elucidados, devido a muitos fatores que devem ser considerados, entre eles: a presença de cápsula nas bactérias, a estrutura da parede celular, a presença de células livres no meio ou aderidas em biofilmes e a estabilidade do material.

3.5 FILMES FINOS

Filme fino é um termo genérico que se refere à matéria condensada restrita a uma única dimensão com espessura que pode chegar a dezenas de nanômetros (44).

Existem muitas técnicas para produção de filmes finos, podendo ser as técnicas físicas como o *dip-coating*, a rádio frequência, o feixe de íons de sputtering e a ablação a laser, ou também as técnicas químicas como a deposição de vapor químico e os processos de sol-gel.

A técnica de *dip-coating* para formação de filmes finos refere-se à imersão do substrato, por exemplo, vidro, em uma solução com precursores do filme, em uma molaridade bem estabelecida. A velocidade com que o substrato é retirado tem que ser constante para não ocorrer deformações (45). Talebian e colaboradores (46) utilizaram a técnica *dip-coating* para sintetizar filmes de ZnO / SnO₂ com

propriedades antimicrobianas.

Os fenômenos de eletrodos e de fase gasosa em vários tipos de descargas de rádio frequência representam uma rica fonte para os processos de depósito de filmes finos. A exploração desses fenômenos resultou no desenvolvimento de vários processos por *sputtering* (45).

Sputtering é um processo pelo qual os átomos são ejetados em direção a um alvo. Esta técnica consiste em um processo simples, porém, se for aplicada em um tempo prolongado pode levar ao processo de erosão (47).

Filmes finos sintetizados por uma técnica derivada do *sputtering*, chamada de *magnetron sputtering*, em baixas temperaturas se mostram bastantes aderentes e com facilidade de modificação na composição, na estrutura e na bioatividade dos filmes, todavia consiste numa técnica mais cara (48).

Filmes finos de SiO_xC_y com adição de nanopartículas de prata foram preparados por um processo duplo, a PVD e a PECVD. O plasma, durante o crescimento, facilita a difusão da prata na matriz e a redução no tamanho médio das nanopartículas, e, conseqüentemente, o aumento da velocidade de deposição formando filmes com propriedades antibacterianas (49).

Ablação por laser é o processo de remoção de material a partir de uma superfície sólida por irradiação com um feixe de laser. O laser era visto como a nova ferramenta para promover a deposição de filmes, porém, seu custo é muito elevado (50).

Outro método utilizado é a deposição por vapor químico (CVD) que tem um grande potencial para fabricação de filmes com alta pureza. Existem variações deste processo que basicamente envolve a deposição de um material sólido a partir de uma fase gasosa. Os reagentes voláteis são transportados através de uma câmara de reação, onde o material desejado cresce homogeneamente sobre um substrato aquecido. Esta técnica utiliza temperaturas de processamento relativamente altas (51).

Uma técnica bastante simples utilizada é o método sol-gel para processamento de filmes finos. As baixas temperaturas de processamento permitem a utilização de muitos materiais como substrato. O seu processo envolve a preparação de soluções de compostos organometálicos em um solvente orgânico, onde é hidrolisada para formar uma solução estruturada e ocorre também a adição de agentes para ajustar a viscosidade (51).

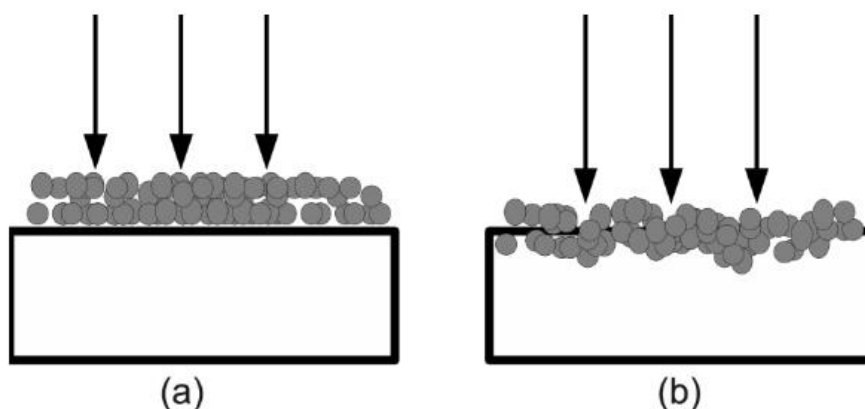
O processo sol-gel tem a desvantagem de utilizar grandes quantidades de soluções que devem ser filtradas. O estudo de Bu S.J. e outros pesquisadores (52) que utiliza a técnica de sol-gel para a formação de filmes finos porosos mostrou que a morfologia dos filmes depende da quantidade de água, dos tipos de solventes, agentes complexantes, da concentração e do peso molecular do composto utilizado.

3.5.1 Filmes finos por influência da pressão

Atualmente, existe uma metodologia que está sendo utilizada para produção de filmes finos, que consiste em exercer uma pressão sobre um óxido ou uma composição dele que esteja em contato com a superfície de um substrato onde será depositado o filme (15, 53). No caso de substrato à base de vidro, essa pressão é exercida por um determinado tempo e em temperatura abaixo da transição vítrea (T_g) do substrato. Esse método confere homogeneidade na espessura e na distribuição do filme fino, e também, tem a facilidade de se depositar o óxido que se espera obter no final do processo.

A Figura 3 é um desenho esquemático do processo de formação de filmes em superfície plana de vidro.

Figura 3 Representação esquemática do mecanismo de formação de filme de óxidos na forma de pó nas condições de alta pressão em função da temperatura e do tempo, sendo (a) o tempo inicial e (b) o tempo final (53).



Fonte: Adaptado da referência (53).

O desenho esquemático da Figura 3 representa em (a) um substrato, cujo óxido na forma de pó ou até mesmo em solução, ou suspensão sofre a influencia da pressão aproximando o óxido na superfície do substrato. Já na Figura 3(b), após determinado tempo e, em determinada temperatura (abaixo da temperatura de transição vítrea – T_g), ocorre interação do óxido na superfície do substrato. O processo descrito pode ser admitido também para superfícies irregulares ou esféricas.

Análise de fluorescência de raios X da composição química dos substratos de vidro, antes e após o tratamento por pressão para óxido de SnO_2 foi investigada para um efeito de troca iônica entre os íons de sódio por íons de estanho na superfície do vidro (13).

Diferentes filmes de óxidos de SnO_2 , Co_3O_4 , TiO_2 e Al_2O_3 foram sintetizados por influência da pressão elevada. A morfologia dos óxidos de origem foi comparada com a morfologia dos seus respectivos filmes. Verificou-se que quanto menor o tamanho de partícula dos pós, maior a taxa de nucleação (14).

Filmes finos a partir de nanopartículas de SnO_2 , produzidos por influência da elevação da pressão, foram caracterizados mecanicamente quanto a resistência à fratura, a dureza e o módulo de elasticidade. As propriedades mecânicas das superfícies modificadas com os filmes de SnO_2 sofreram alteração quando comparado com as mesmas propriedades do vidro sem filme fino (15).

Estudos de reflectância também foram utilizados para a caracterização de filmes finos produzidos com pressão. Pode-se demonstrar a presença do filme fino por meio do estiramento das ligações de $\nu \text{ Si-O-Si}^-$ ou de $\nu \text{ Si-O}^-$ induzidas por íons Sn^{+4} na posição máxima do pico principal (16).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO

Os pós de CuO (VETEC) foram caracterizado de pela técnica de difração de raios X (DRX), utilizando um difractômetro XRD6000 Shimadzu com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) na faixa de 10° a 90° com varredura de $0,02^\circ/\text{min}$.

4.2 PREPARAÇÃO DO FILME NO SUBSTRATO VÍTREO

Esferas de vidro e lâminas de vidro planos comerciais foram lavadas em banho ultrassônico com três repetições de 5 minutos em cada etapa, conforme a sequência descrita na tabela 1.

Tabela 1 Sequência das etapas de lavagem das esferas e vidros planos comerciais para preparação do substrato.

Sequência cronológica	Soluções utilizadas
1ª Etapa	Detergente básico Extran (Merck) em solução 10 %
2ª Etapa	Detergente neutro Extran (Merck) em solução 10 %
3ª Etapa	Água destilada
4ª Etapa	Álcool isopropílico
5ª Etapa	Água destilada
6ª Etapa	Secagem em condições naturais

Fonte: A autora

Após o processo de limpeza das esferas e lâminas, o pó de CuO foi misturado com álcool etílico anidro (Synth) com as esferas de vidro e as lâminas de vidro planas em um recipiente. O sistema foi levado para um forno destinado ao tratamento de superfícies para formação e cristalização de filmes finos por meio do efeito da pressão elevada (15). Os parâmetros para a síntese de filmes foram:

temperatura de 320 °C e pressão de 3 MPa durante 32 horas.

Após deposição, as esferas e lâminas de vidro com revestimentos de cobre foram lavadas em banho ultrassônico e seguindo as etapas de lavagens (Tabela 1) (Página 19).

Em seguida os substratos vítreos foram esterilizados em autoclave (Quimis modelo 102) e armazenados em ambiente estéril.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

Os filmes das lâminas planas resultantes do tratamento térmico foram caracterizados pela técnica de (DRX) com baixo ângulo (DMax2500PC - Rigaku) na tensão de 50 kV e 150 mA usando uma radiação $\text{CuK}\alpha$ 2θ de 10 até 90 °, com 0,02 °/min.

A morfologia dos filmes foi observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) operando por campo de emissão *field emission gun* (7500F - JEOL).

4.4 TESTES BACTERIANOS

4.4.1 Preparação dos meios de cultivos

Foram utilizados os meios de cultura caldo Luria (LB) [(composição em g/L: 10 de cloreto de sódio (Fluka), 10 de extrato de levedura (Merck) e 10 de triptona (Himedia)]. O ágar Luria (LA) foi preparado adicionando-se 20 g de ágar (Fluka) ao LB. Estes meios foram esterilizados em autoclave e guardados em ambientes refrigerados.

4.4.2 A bactéria

Como modelo experimental utilizou-se a bactéria Gram-negativa *Acinetobacter* sp. que foi isolada de solo de campos de cultura de milho na fazenda

escola Capão da Onça (longitude 50°03'W, latitude 25°05'S - Ponta Grossa, PR, Brasil),.

4.4.3 Testes de inibição bacteriana em caldo

Retirados de estoques armazenados em -80 °C, as bactérias foram inoculadas em LB estéril, por um período de 24 horas e sob agitação de aproximadamente 40 rpm, em uma mesa agitadora orbital à temperatura de 30 °C.

Com o auxílio de uma alça estéril, mergulhou-se a alça no caldo crescido e utilizando o método de semeadura por estrias em placas de Petri com ágar Luria para crescimento e avaliação da pureza.

Para constituir o pré-inóculo, selecionou-se apenas uma colônia da placa e foi inoculada em caldo Luria estéril.

Alíquotas de 100 µL foram retiradas do pré-inóculo e colocadas em um recipiente estéril com 100 mL de LB até atingir uma concentração de 0,05 de densidade ótica. Em um espectrofotômetro (UV- 1600 Pró-análise) ajustado para fazer leituras em 600 nm de comprimento de onda.

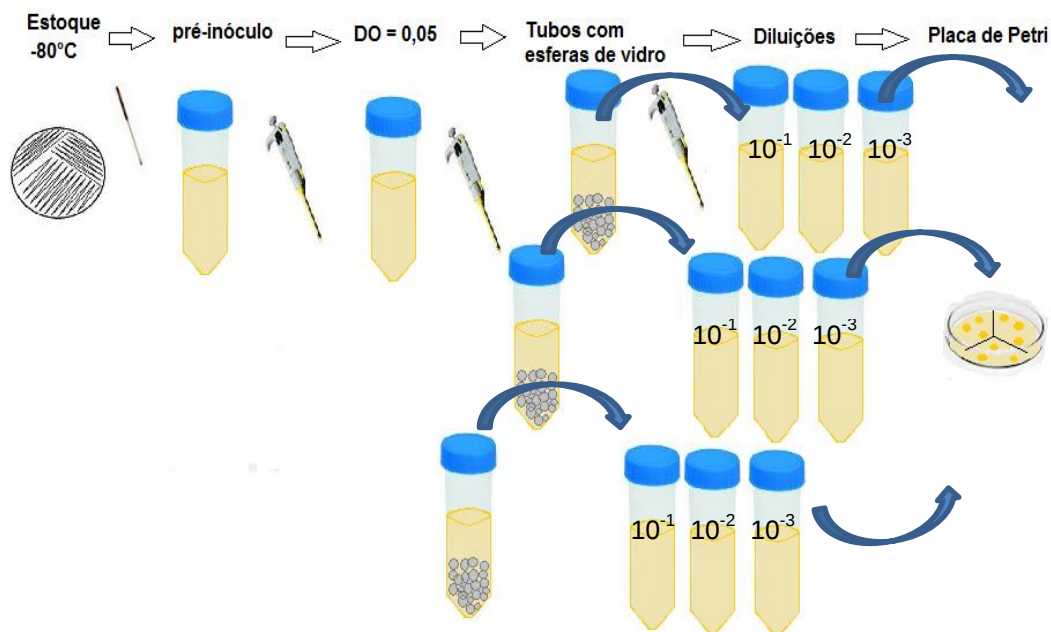
O caldo de concentração de células bacterianas com densidade ótica em 0,05 foi distribuído em 6 tubos de centrifugação três deles com esferas de vidro sem filmes e outros três com esferas com filmes de cobre/óxido de cobre. Estes tubos foram incubados em 30 °C sob agitação por 24 horas.

Para análise e comparação do crescimento das células, as amostras foram diluídas 10X. Alíquotas de 100 µL foram plaqueadas, em meio tal à temperatura tal., uma delas originária dos testes sem filmes finos e a outra dos testes com filmes finos de cobre.

Para preparo da diluição de 10^{-2} , coletou-se um mililitro de cada tubo da diluição 10^{-1} e colocou em outros tubos que já continham 9 ml de caldo Luria estéril. Novamente alíquotas de 100 µl foram depositadas nas mesmas placas, ao lado da diluição de 10^{-1} . Mais uma diluição foi realizada para todos os testes da mesma forma, resultando na diluição 10^{-3} . As duas placas referentes ao teste de esferas de vidro sem filmes finos e esferas de vidro com filmes finos de cobre contendo as três diluições foram incubadas em 30 °C, durante 24 horas.

Na Figura 4 está demonstrado esquematicamente a metodologia de inibição bacteriana em LB.

Figura 4 Desenho esquemático da metodologia dos testes usando esferas imersas em caldo



Fonte: A autora

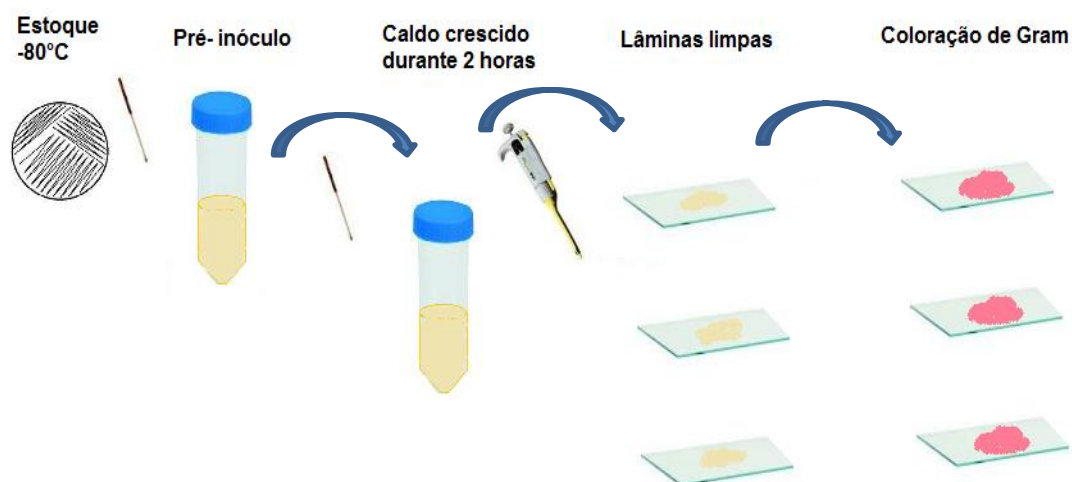
4.4.4 Avaliação de inibição bacteriana em superfícies planas

A partir de um pré-inóculo da solução de estoque, as células foram colocadas em LB durante um período de 2 horas. Foram retiradas alíquotas de 100 μ L e depositadas sobre lamínulas de vidros planos com e sem filmes finos. Em seguida, as lâminas preparadas foram deixadas em repouso em placas de Petri esterilizadas por 24 horas em temperatura de 30 °C.

Após secas as lâminas foram coradas pelo método de Gram.

Na Figura 5 é está demonstrada a metodologia de avaliação de inibição bacteriana em superfícies planas.

Figura 5 Desenho esquemático da metodologia utilizada para fazer os testes com superfícies planas



Fonte: A autora

4.4.5 Coloração de Gram

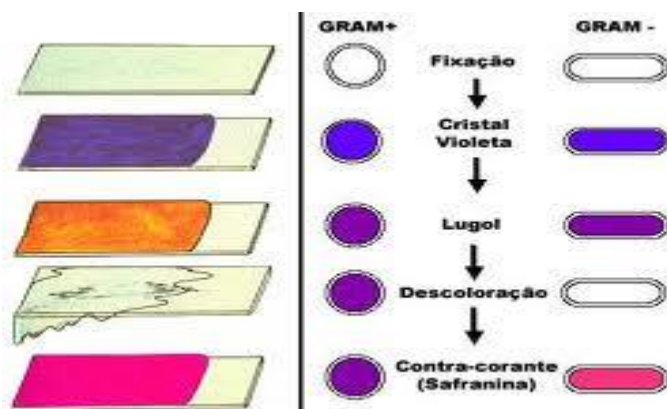
As bactérias avaliadas no experimento descrito no ítem 4.4.4 foram coradas pelo método de coloração de Gram no qual consiste de uma metodologia muito utilizada nos laboratórios para diferenciação de dois grandes grupos de bactérias que apresentam diferenciações na parede celular.

Para avaliar a adesão das células na superfície da lamínula, o processo de coloração foi realizado sem a etapa de fixação pela chama.

Em uma lâmina de vidro depositou-se uma gota de caldo crescido, fez-se o esfregaço e esperou secar. Após adicionou-se gotas de violeta de metila (Synth) deixando agir por 1 min. Lavou-se com água da torneira e em seguida pingou lugol (J. Crows) deixando agir mais 1 min. Lavou-se novamente com água da torneira e colocou acetona voltando a lavar com água. Por fim, pingou funcsina (Fluka) deixando agir por mais 1 min, lavou-se novamente e secou naturalmente.

Na figura 6 estão representadas as etapas de coloração de Gram.

Figura 6 Metodologia da coloração de Gram (54).



Fonte: Adaptado de (54)

Fotografias do material foram feitas em microscopia óptica (Olympus BX51) com aumento de 100x.

4.4.5.1 Coloração de cápsula

Para a avaliação da formação de biofilme pela linhagem bacteriana, utilizou-se o método de coloração de cápsula ou coloração de Gins.

Após o crescimento da cultura em caldo Luria retirou-se alíquotas para o teste de coloração de cápsula.

Sobre uma superfície de uma lâmina de vidro espalhou-se o caldo bacteriano, secando na chama do fogo. Após, para iniciar a coloração utilizou-se uma gota de nanquim e, após secar em condição ambiente, adicionou-se uma gota de funcina deixando agir durante 1 minuto.

Após secagem da coloração de lâmina o ensaio foi lavado com água da torneira.

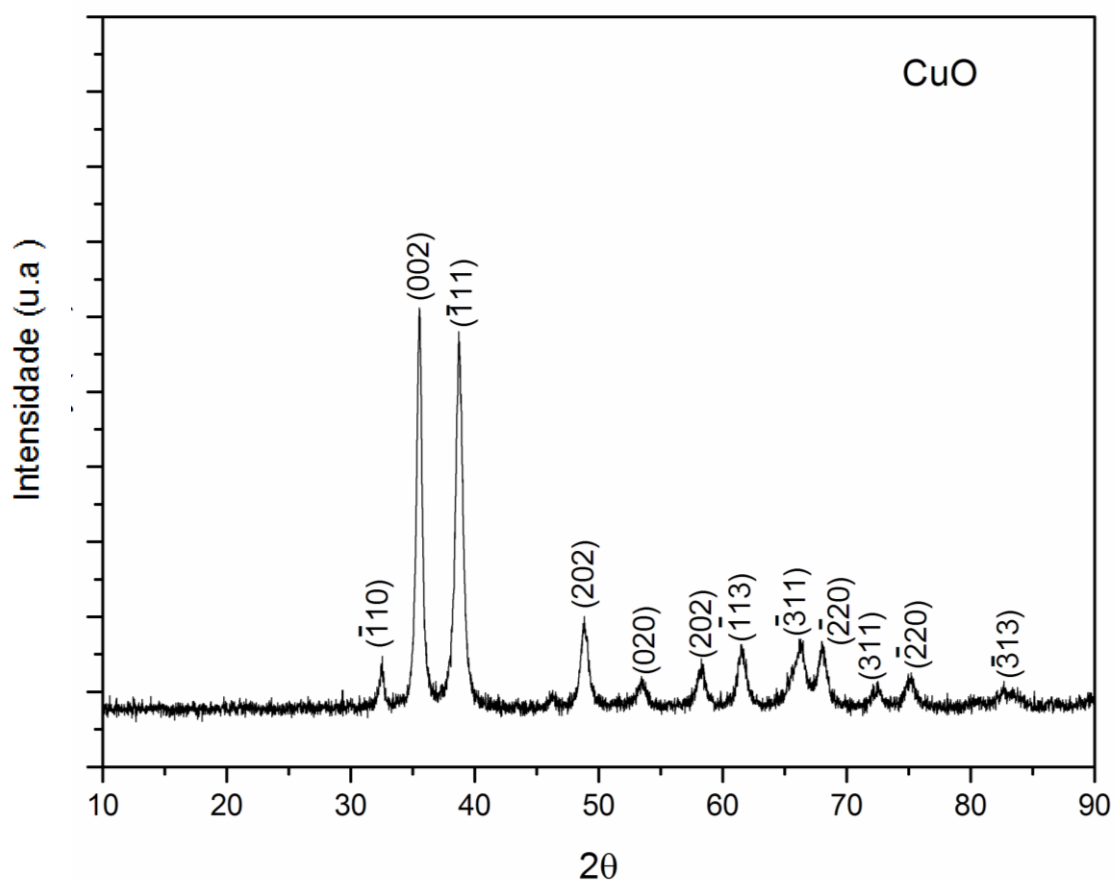
As imagens dos ensaios foram feitas por microscopia óptica (Olympus BX51) com aumentos de 100x.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE COBRE

Na figura 7 está representado o difratograma do óxido de cobre utilizado para a síntese de filmes finos.

Figura 7 Difratograma de raios X do pó de CuO utilizado para síntese dos filmes finos.



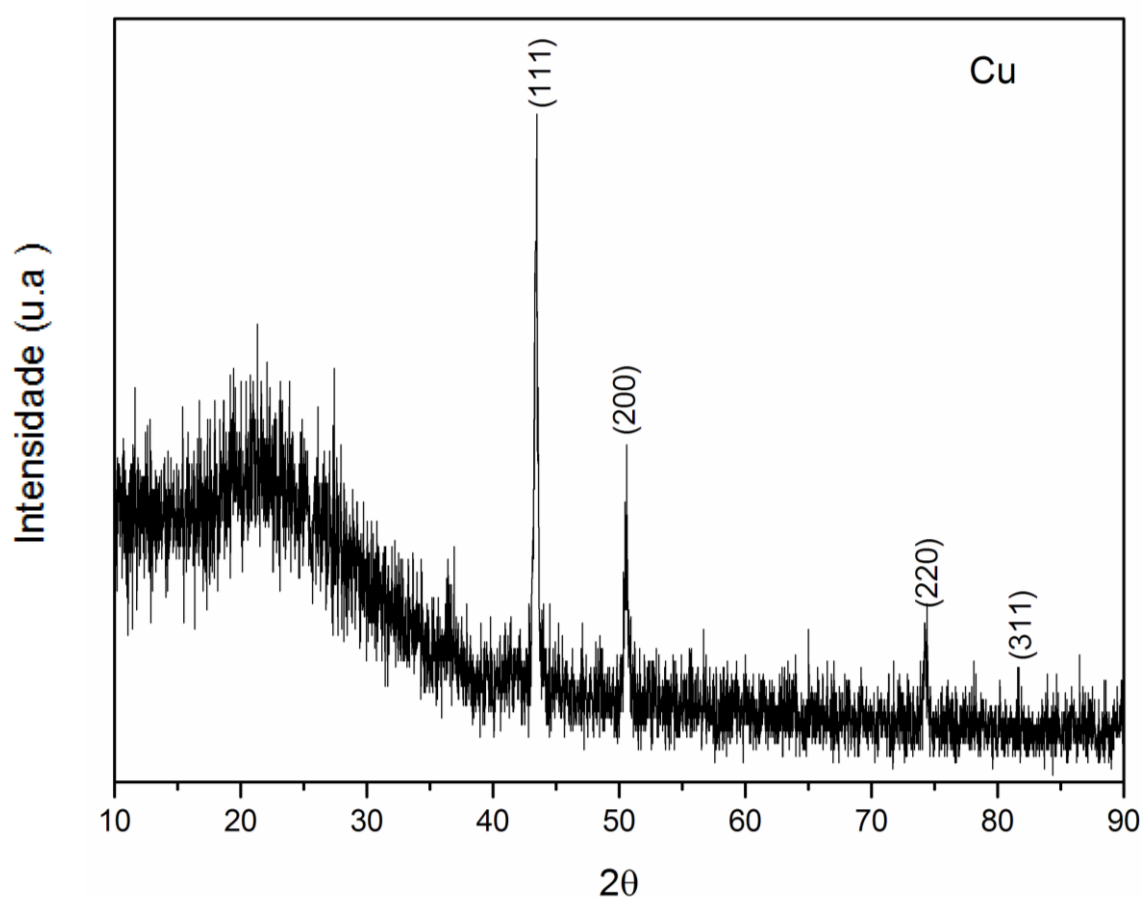
Fonte: A autora

Foi possível identificar no difratograma da Figura 7 picos correspondentes ao CuO na estrutura cristalina monoclinica de acordo com a ficha PDF 45-937.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES FINOS DEPOSITADOS NO SUBSTRATO DE VIDRO

Análise pela técnica de difração de raios X utilizando-se ângulo rasante serviu para identificar a presença do filme fino depositado conforme a representação da Figura 8.

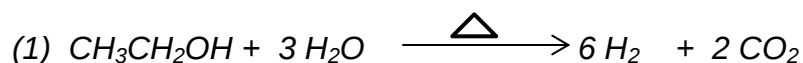
Figura 8 Difratoograma de difração de raios X utilizando ângulo rasante na identificação de filmes finos.



Fonte: A autora

Os picos do difratograma apresentado na Figura 8 são referentes à presença de cobre metálico com estrutura cristalina cúbica (PDF 85-1326) na superfície do substrato.

Alguns autores descrevem a possibilidade de redução do óxido de cobre convertendo-o para cobre metálico (55), (56) e pode ser representada nas equações 1 e 2:



De acordo com equação 1, a reação química da decomposição do álcool etílico a partir da elevação da temperatura e, em presença de água, obtém-se como produtos os gases hidrogênio e dióxido de carbono (55).

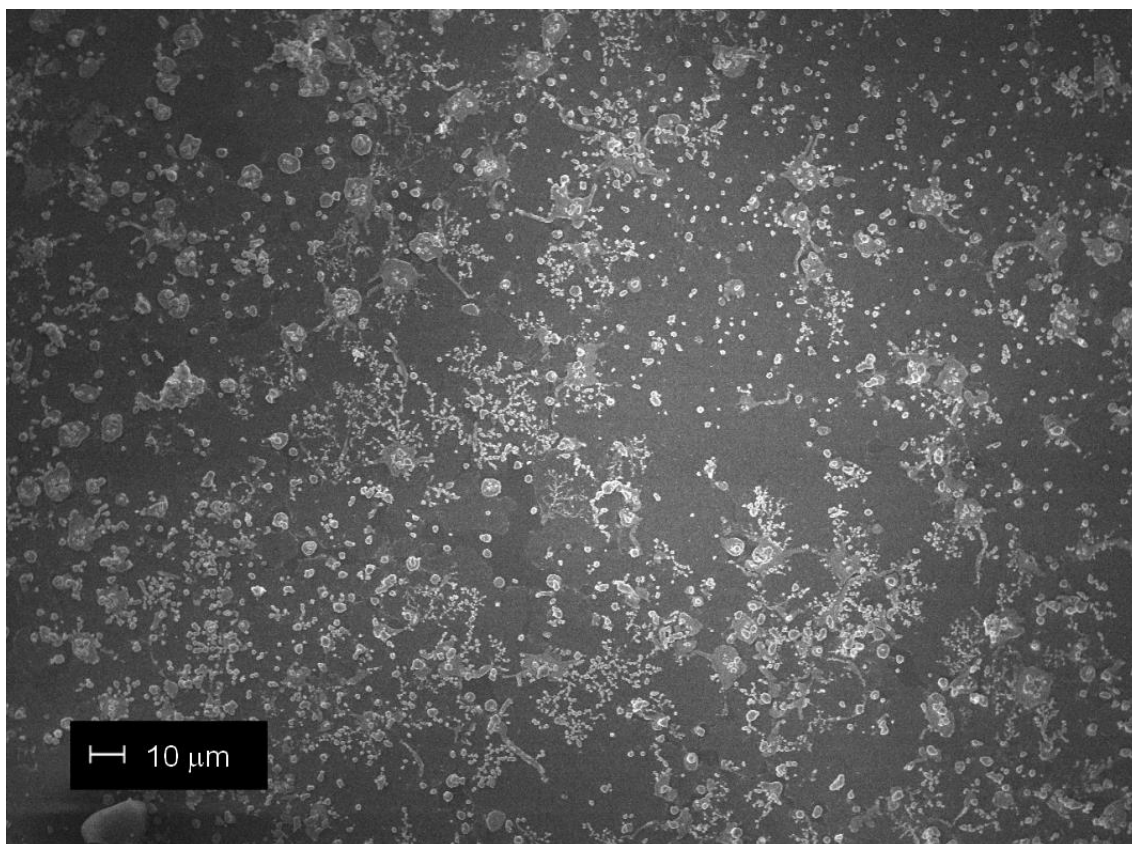
Por sua vez, na equação 2, pode-se perceber que o óxido de cobre, quando em presença de gás hidrogênio e sob influência da temperatura, favorece a redução dos íons Cu^{2+} para formação do Cu^0 (56).

O ambiente do forno utilizado para produzir filmes finos deste trabalho associa a decomposição do álcool etílico em presença de água sob o efeito da temperatura, o que resulta na presença de cobre metálico depositado na superfície dos substratos de vidro.

Imagens da superfície dos filmes finos foram obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Na Figura 9 está ilustrada a micrografia eletrônica de varredura com uma ampliação de 500x.

Figura 9 Micrografia de microscopia eletrônica de varredura da superfície de filmes finos de cobre e o substrato de vidro com ampliação de 500x .



Fonte: A autora

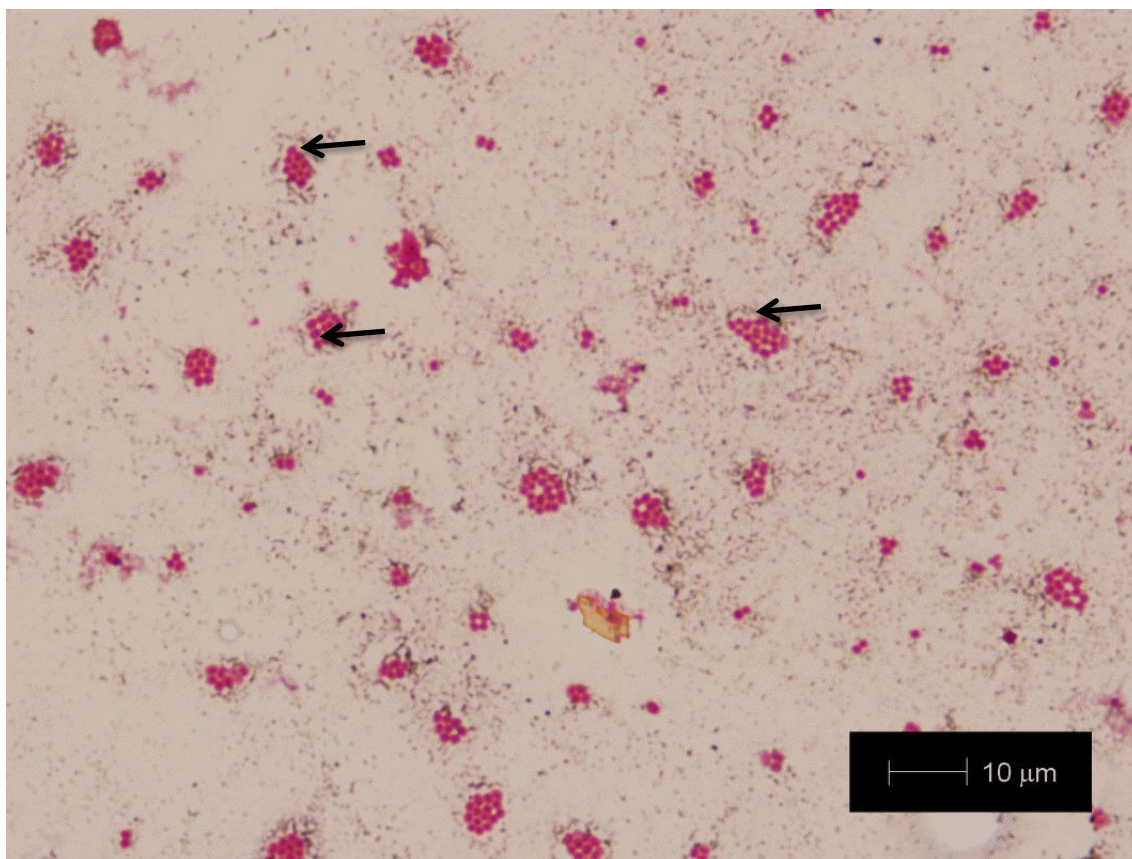
Na Figura 9 o filme fino de cobre metálico aparece de forma descontínua, representados pelas regiões mais claras nas imagens sobre o substrato de vidro, que é a região mais escura. A redução dos íons de cobre favoreceu o processo de nucleação na forma de ilhas sobre o substrato.

5.3 TESTES BACTERIANOS

5.3.1 Caracterização de cápsulas bacterianas

A Fig. 10 mostra a imagem obtida em microscópio ótico do teste de coloração de Gins. A coloração de Gins é um teste complementar que não envolve os filmes finos de cobre. As cápsulas produzidas pela linhagem de *Acinetobacter* sp. serão utilizadas na estruturação de biofilmes bacterianos.

Figura 10 Formação de cápsula pela bactéria *Acinetobacter* sp., visualizada pela técnica de coloração de Gins em microscopia ótica com aumento de 1000X.



Fonte: A autora.

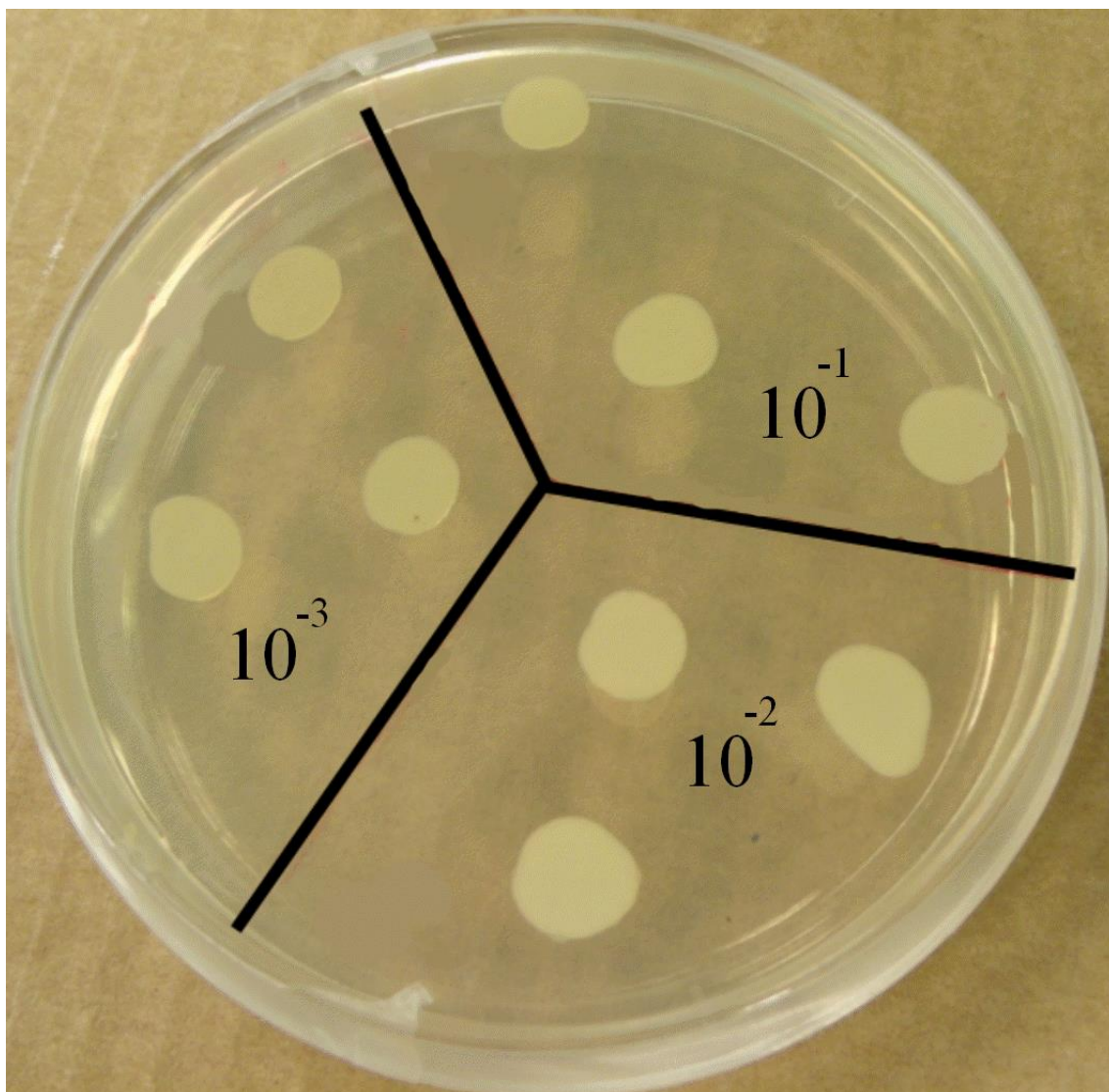
De acordo com a indicação das setas na Figura 10, pode-se observar que as células da bactéria *Acinetobacter* sp. Apresentam cápsula e estas ajudam as células a fixarem umas nas outras.

Algumas bactérias possuem cápsula e por isso, possuem uma proteção a mais. Se do ponto de vista para a bactéria a estrutura da cápsula gera uma proteção contra os agentes externos, sob o ponto de vista da saúde humana, as cápsulas das bactérias representam uma resistência a mais para eliminação desse foco.

5.3.2 Testes de inibição bacteriana em caldo

A Fig. 11 mostra o crescimento em placa da *Acinetobacter* sp. em ágar Luria, em três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) de alíquotas obtidas em caldo Lúria com as esferas de vidro sem filme, o controle.

Figura 11 - Referencial de controle de crescimento da bactéria *Acinetobacter* sp. em caldo Luria nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , após o contato com esferas de vidro sem filmes finos.

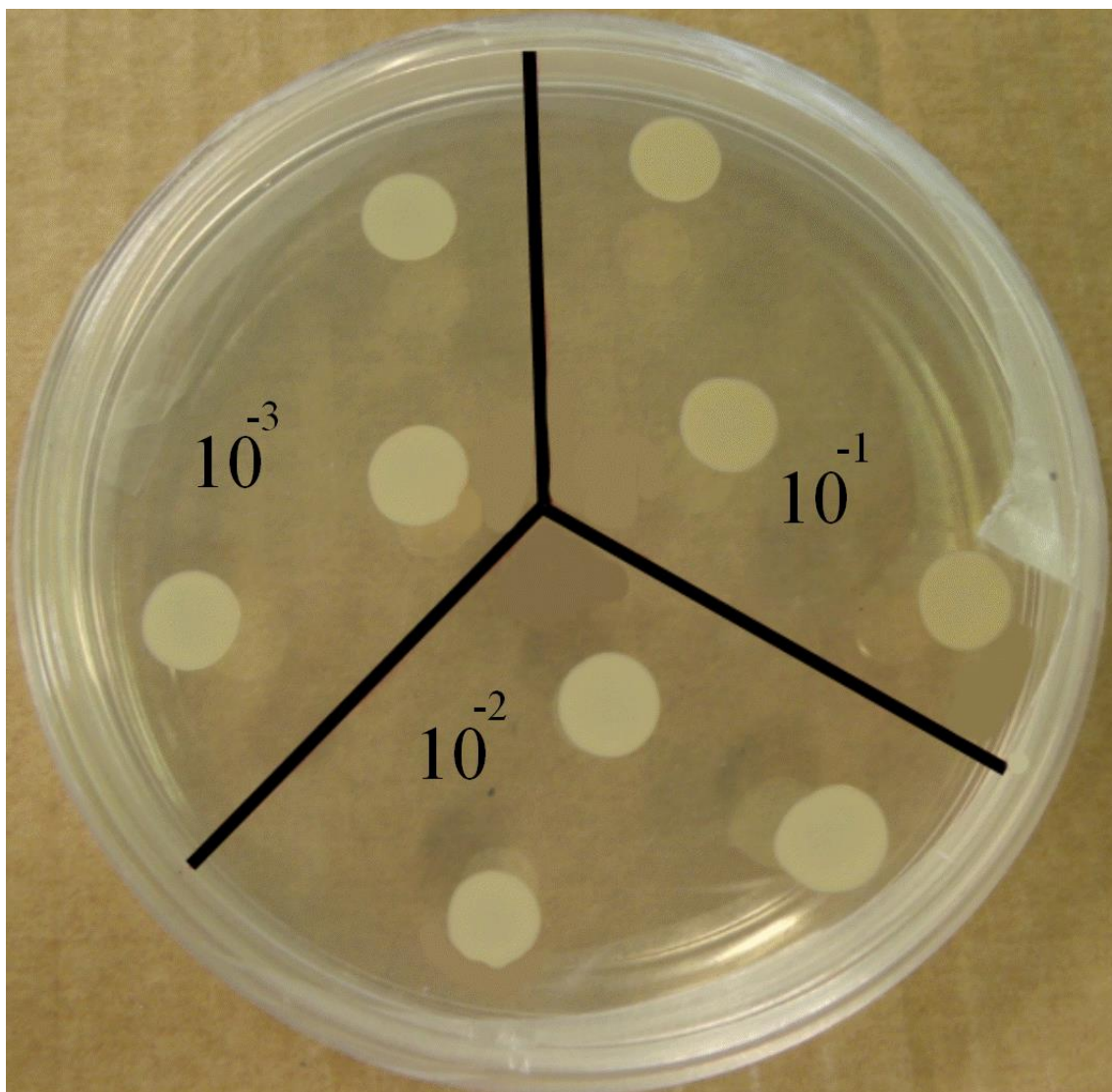


Fonte: A autora

O crescimento foi observado até na maior diluição do caldo em 10^{-3} o que inviabilizou o processo de contagem de células para este experimento.

Na Fig. 12 é apresentado o crescimento em placa da bactéria *Acinetobacter* sp, após a imersão do caldo em esferas de vidro contendo filme finos de cobre.

Figura 12 Crescimento da bactéria *Acinetobacter* sp. em caldo Luria nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , após o contato com esferas de vidro contendo filmes finos de cobre.



Fonte: A autora

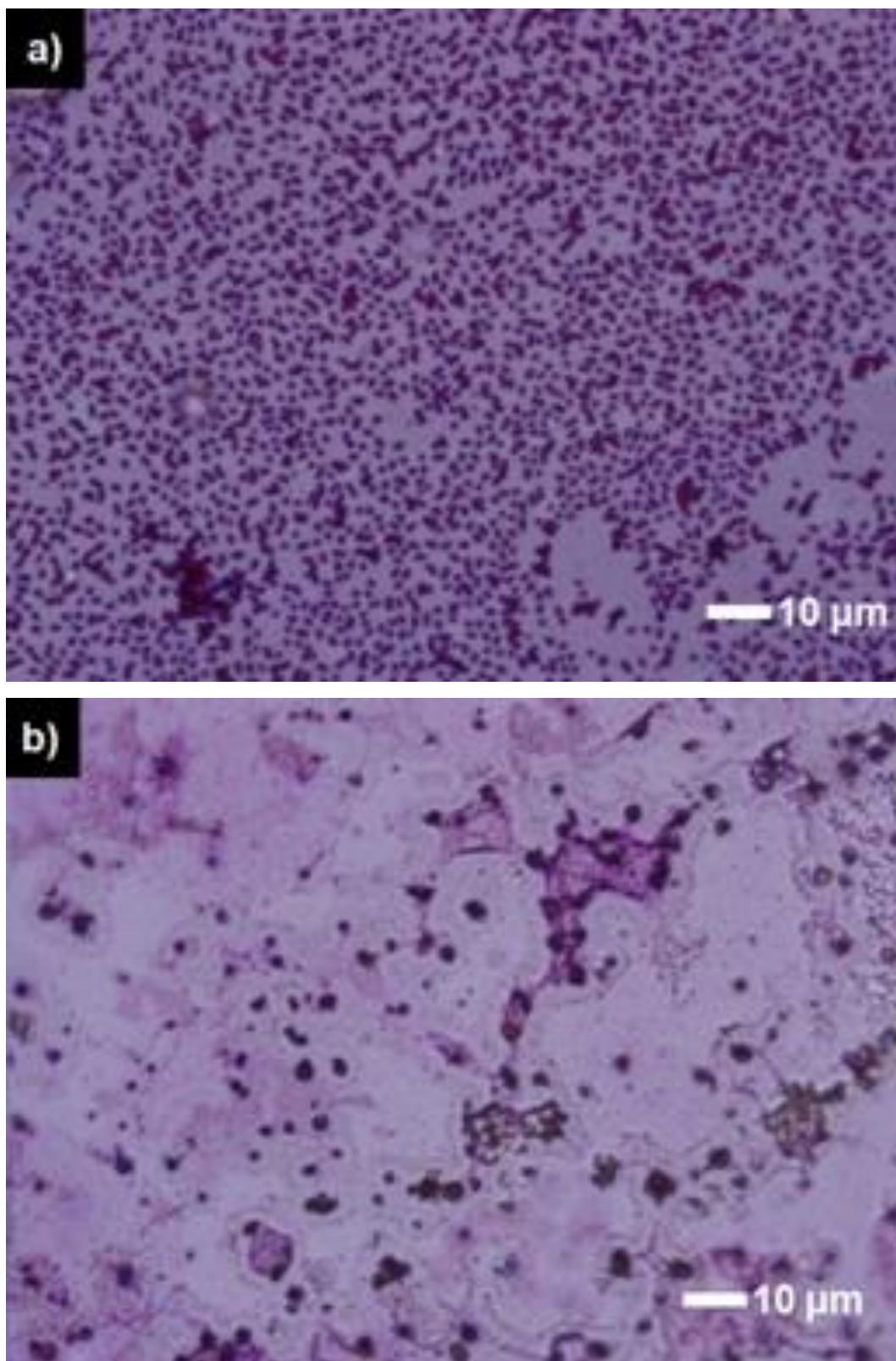
Foi possível verificar que nos testes em placa não houve diferença em relação ao crescimento bacteriano no caldo que esteve em contato com as esferas de vidro sem a presença de filmes finos de cobre (Figura 11) em relação às bactérias que tiveram em contato com os filmes finos de cobre (Figura 12).

Estes resultados provavelmente são devidos à diluição das partículas biocidas em relação ao volume do meio de cultura líquido, fazendo com que a bioatividade seja diminuída (12, 43).

5.3.3 Avaliação de inibição bacteriana em superfícies planas

Na Fig. 13 podem ser visualizadas duas micrografias, a partir das quais é possível se diferenciar dois tipos de estruturas de biofilmes bacterianos sobre a superfície de uma lâmina de vidro. Na Fig. 13a a cultura foi previamente incubada em presença de esferas de vidro sem filmes finos de cobre, enquanto que na Fig. 13b a cultura foi incubada juntamente com esferas de vidro contendo os filmes finos de cobre.

Figura 13 Biofilme bacteriano de *Acinetobacter* sp. nas superfícies de lâminas de vidro. Material obtido a partir da incubação em presença de esferas de vidro sem e (b) com filmes finos de cobre.



Fonte: A autora

As diferenças entre as imagens da Figura 13a, quando comparada com a Figura 13b, é a presença de biofilme contendo células bem formadas e com uma boa organização, enquanto em na Fig. 13b teve inibição das células.

Provavelmente o filme fino de cobre (Figura 13b) tenha exercido um efeito inibitório sobre a linhagem bacteriana, e conseqüentemente diminuindo a adesão do biofilme. O formato celular irregular é um indício do efeito tóxico do cobre sobre células bacterianas.

A atividade antibactericida do metal cobre na forma de filmes finos deve-se à interação do metal com O_2 adsorvido na superfície dos filmes finos gerando a formação de um eletrólito (57). A interação entre o O_2 e o cobre metálico da superfície de filmes finos também são passíveis de produzir radicais livres, formando superóxidos de $O_2^- \cdot$ que causam a destruição celular (12).

Os resultados obtidos mostraram que o filme fino de cobre foi eficiente na inibição da adesão do biofilme em superfície de lâmina de vidro. Este é um fator importante uma vez que os biofilmes bacterianos são relatados como barreiras que protege essas células da ação de biocidas para controle de contaminação.

6 CONCLUSÕES

Filmes finos descontínuos foram produzidos na superfície de esferas de vidro elevando-se a pressão e controlando a temperatura e o tempo.

O óxido de cobre II quando na presença de gás hidrogênio sofre redução para cobre metálico.

As esferas de vidro contendo filmes finos de cobre não apresentaram efeito biocida em relação às bactérias *Acinetobacter* sp quando em solução.

Em contrapartida, ocorreu a diminuição da adesão do biofilme e da organização de arranjos celulares da bactéria *Acinetobacter* sp. em superfície de lâminas de vidro.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

O trabalho teve êxito na proposta de criar filmes finos, em substrato de vidro, com características antibacterianas inibindo a adesão de biofilmes. Utilizando uma metodologia simples e com alta durabilidade, é relevante a continuidade da pesquisa.

- Testar novos óxidos com características antibacterianas de menor custo;
- Mudança do material utilizado como substrato;
- Testar o filme fino de cobre com outros microorganismos patogênicos;

8 REFERÊNCIAS

- 1 SMITH, K.; HUNTER, I. S. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, n.8, p.966-973, 2008.
- 2 DAVIES, A.; ROBERTS, W. The mode of resistance of a strain of *Pseudomonas* to chlorhexidine. **Biochemical Society Transactions**, v.1, n.5, p.1209-1212, 1973.
- 3 LEUNG, C. Y.; CHAN, Y. C.; SAMARANAYAKE, L. P.; SENEVIRATNE, C. J. Biocide resistance of *Candida* and *Escherichia coli* biofilms is associated with higher antioxidative capacities. **Journal of Hospital Infection**, v.81, n.2, p.79-86, 2012.
- 4 YEZLI, S.; OTTER, J. A. Does the discovery of biofilms on dry hospital environmental surfaces change the way we think about hospital disinfection? **Journal of Hospital Infection**, v.81, n.4, p.293-294, 2012.
- 5 LALUEZA, P.; MONZON, M.; ARRUEBO, M.; SANTAMARIA, J. Bactericidal effects of different silver-containing materials. **Materials Research Bulletin**, v.46, n.11, p.2070-2076, Nov 2011.
- 6 HE, L.; LIU, Y.; MUSTAPHA, A.; LIN, M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. **Microbiological Research**, v.166, n.3, p.207-215, 2011.
- 7 AHN, S.-J.; HAN, J.-S.; LIM, B.-S.; LIM, Y.-J. Comparison of Ultraviolet Light-Induced Photocatalytic Bactericidal Effect on Modified Titanium Implant Surfaces. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v.26, n.1, p.39-44, Jan-Feb 2011.
- 8 CHORIANOPOULOS, N. G.; TSOUKLERIS, D. S.; PANAGOU, E. Z.; FALARAS, P.; NYCHAS, G. J. E. Use of titanium dioxide TiO_2 photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. **Food Microbiology**, v.28, n.1, p.164-170, Feb 2011.
- 9 MUNGKALASIRI, J.; BEDEL, L.; EMIEUX, F.; DORE, J.; RENAUD, F. N. R.; SARANTOPOULOS, C.; MAURY, F. CVD Elaboration of Nanostructured TiO_2 -Ag Thin Films with Efficient Antibacterial Properties. **Chemical Vapor Deposition**, v.16, n.1-3, p.35-41, Mar 2010.
- 10 HAENLE, M.; FRITSCH, A.; ZIETZ, C.; BADER, R.; HEIDENAU, F.; MITTELMEIER, W.; GOLLWITZER, H. An extended spectrum bactericidal titanium dioxide TiO_2 coating for metallic implants: in vitro effectiveness against MRSA and mechanical properties. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v.22, n.2, p.381-387, Feb 2011.
- 11 CRICK, C. R.; PARKIN, I. P. CVD of copper and copper oxide thin films via the in

situ reduction of copper(II) nitrate - A route to conformal superhydrophobic coatings. **Journal of Materials Chemistry**, v.21, n.38, p.14712-14716, 2011.

12 HASSAN, M. S.; AMNA, T.; YANG, O. B.; EL-NEWEHY, M. H.; AL-DEYAB, S. S.; KHIL, M.-S. Smart copper oxide nanocrystals: Synthesis, characterization, electrochemical and potent antibacterial activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.97, n.0, p.201-206, 2012.

13 CAVA, S.; SEQUINEL, T.; TEBCHERANI, S. M.; LAZARO, S. R.; PIANARO, S. A.; VARELA, J. A. Effect of temperature on glass-ceramic films prepared by impregnation of commercial float glass surfaces with oxide powders under pressure. **Thin Solid Films**, v.518, n.21, p.5889-5891, 2010.

14 CAVA, S.; SEQUINEL, T.; TEBCHERANI, S. M.; MICHEL, M. D.; LAZARO, S. R.; PIANARO, S. A. Microstructure of ceramic particles infiltrated into float glass surfaces by high gas pressure impregnation. **Journal of Alloys and Compounds**, v.484, n.1-2, p.877-881, 2009.

15 CAVA, S.; SEQUINEL, T.; TEBCHERANI, S. M.; MICHEL, M. D.; LEPIENSKI, C. M.; VARELA, J. A. Nanomechanical properties of glass-ceramic films obtained by pressure impregnation of oxide powders on commercial float glass surfaces. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v.356, n.4-5, p.215-219, 2010.

16 SEQUINEL, T.; CAVA, S.; PIMENTA, J. O.; PIANARO, S. A.; TEBCHERANI, S. M.; VARELA, J. A. IR reflectance characterization of glass-ceramic films obtained by high pressure impregnation of SnO₂ nanopowders on float glass. **Ceramics International**, v.37, n.5, p.1533-1536, 2011.

17 PIMENTA, J. O. **Preparação de filmes Finos de TiO₂ em substratos vítreos e caracterização da bioatividade**. 2010, 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

18 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8^a ed. Porto Alegre, 2005. 385 p.

19 GARCIA-CRUZ, C. P.; NAJERA AGUILAR, M. J.; ARROYO-HELGUERA, O. E. Fungal and Bacterial Contamination on Indoor Surfaces of a Hospital in Mexico. **Jundishapur J Microbiol**, v.5, n.3, p.460-464, 2012.

20 FARKAS, A.; DRĂGAN-BULARDA, M.; CIATARĂȘ, D.; BOCOȘ, B.; ȚIGAN, Ș. Opportunistic pathogens and faecal indicators in drinking water associated biofilms in Cluj, Romania. **Journal of Water and Health**, v.10, n.3, p.471-483, 2012.

21 PELCZAR, J. R.; JOSEPH, M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia - conceitos e aplicações** São Paulo: Makron Books 1996 524 p.

22 MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica** Elsevier ed, 2004p.

23 ARAUJO, M. **Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**. Disponível em:

<<http://www.infoescola.com/microbiologia/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas/>
>. Acesso em: 01/02/12.

24 SILVEIRA, M. J. C. P. **Acinetobacter baumannii em meio hospitalar**. 2011, 65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade de Aveiro, Aveiro - Portugal, 2011.

25 AKTINS, P. **Princípios de química** 3ª ed: Bookman, 2003. 964 p.

26 BRAUN, S. E. **Efeito do grau de cristalização nas cerâmicas de dissilicato de lítio**. 2008. Dissertação de mestrado em Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR.

27 NAVARO, J. M. F. **El vidrio**. 2ª ed. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 1991. 533 p.

28 WEINHART, M.; BECHERER, T.; SCHNURBUSCH, N.; SCHWIBBERT, K.; KUNTE, H. J.; HAAG, R. Linear and hyperbranched polyglycerol derivatives as excellent bioinert glass coating materials. **Advanced Engineering Materials**, v.13, n.12, p.B501-B510, 2011.

29 BHADRA, P.; MITRA, M. K.; DAS, G. C.; DEY, R.; MUKHERJEE, S. Interaction of chitosan capped ZnO nanorods with Escherichia coli. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v.31, n.5, p.929-937, Jul 20 2011.

30 JALAL, R.; GOHARSHADI, E. K.; ABARESHI, M.; MOOSAVI, M.; YOUSEFI, A.; NANCARROW, P. ZnO nanofluids: Green synthesis, characterization, and antibacterial activity. **Materials Chemistry and Physics**, v.121, n.1-2, p.198-201, May 15 2010.

31 ANITHA, S.; BRABU, B.; THIRUVADIGAL, D. J.; GOPALAKRISHNAN, C.; NATARAJAN, T. S. Optical, bactericidal and water repellent properties of electrospun nano-composite membranes of cellulose acetate and ZnO. **Carbohydrate Polymers**, v.87, n.2, p.1065-1072, 2012.

32 SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.275, n.1, p.177-182, 2004.

33 SHEN, W.; FENG, L.; FENG, H.; KONG, Z.; GUO, M. Ultrafine silver(II) oxide particles decorated porous ceramic composites for water treatment. **Chemical Engineering Journal**, v.175, n.0, p.592-599, 2011.

34 PIGEOT-RÉMY, S.; SIMONET, F.; ATLAN, D.; LAZZARONI, J. C.; GUILLARD, C. Bactericidal efficiency and mode of action: A comparative study of photochemistry and photocatalysis. **Water Research** 2012.

35 KUSSOVSKI, V.; STEFCHEV, P.; KIRILOV, R. Titanium photocatalyst against human pathogenic microorganisms. **Comptes Rendus De L Academie Bulgare Des Sciences**, v.64, n.5, p.693-698, 2011 2011.

- 36 KEDZIORA, A.; STREK, W.; KEPINSKI, L.; BUGLA-PLOSKONSKA, G.; DOROSZKIEWICZ, W. Synthesis and antibacterial activity of novel titanium dioxide doped with silver. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v.62, n.1, p.79-86, 2012.
- 37 MUNGKALASIRI, J.; BEDEL, L.; EMIEUX, F.; DORÉ, J.; RENAUD, F. N. R.; MAURY, F. DLI-CVD of TiO₂-Cu antibacterial thin films: Growth and characterization. **Surface and Coatings Technology**, v.204, n.6-7, p.887-892, 2009.
- 38 NASSOKO, D.; LI, Y.-F.; WANG, H.; LI, J.-L.; LI, Y.-Z.; YU, Y. Nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles by using EDTA as nitrogen source and soft template: Simple preparation, mesoporous structure, and photocatalytic activity under visible light. **Journal of Alloys and Compounds**, v.540, n.0, p.228-235, 2012.
- 39 PÉREZ-TANOIRA, R.; PÉREZ-JORGE, C.; ENDRINO, J. L.; GÓMEZ-BARRENA, E.; HORWAT, D.; PIERSON, J. F.; ESTEBAN, J. Bacterial adhesion on biomedical surfaces covered by micrometric silver Islands. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v.100 A, n.6, p.1521-1528, 2012.
- 40 RADZIG, M. A.; NADTOCHENKO, V. A.; KOKSHAROVA, O. A.; KIWI, J.; LIPASOVA, V. A.; KHMEL, I. A. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.102, n.0, p.300-306, 2013.
- 41 KAWAKAMI, H.; YOSHIDA, K.; NISHIDA, Y.; KIKUCHI, Y.; SATO, Y. Antibacterial properties of metallic elements for alloying evaluated with application of JIS Z 2801:2000. **ISIJ International**, v.48, n.9, p.1299-1304, 2008.
- 42 ZOLLFRANK, C.; GUTBROD, K.; WECHSLER, P.; GUGGENBICHLER, J. P. Antimicrobial activity of transition metal acid MoO₃ prevents microbial growth on material surfaces. **Materials Science and Engineering: C**, v.32, n.1, p.47-54, 2012.
- 43 YATES, H. M.; BROOK, L. A.; SHEEL, D. W.; DITTA, I. B.; STEELE, A.; FOSTER, H. A. The growth of copper oxides on glass by flame assisted chemical vapour deposition. **Thin Solid Films**, v.517, n.2, p.517-521, 2008.
- 44 TER MINASSIAN-SARAG, L.; VINCENT, B.; ADLER, M.; BARRAUD, A.; CHURAEV, N. V.; EATON, D. F.; KUHN, H.; MISONO, M.; PLATIKANOV, D.; RALSTON, J.; SILBERBERG, A.; ZEMEL, J. N. Thin films including layers: Terminology in relation to their preparation and characterization IUPAC Recommendations 1994. **Thin Solid Films**, v.277, n.1-2, p.7-78, 1996.
- 45 PUBLISHING, W. A. **Handbook of Thin-Film Deposition Processes and Techniques**. Norwich, New York, U.S.A.: Intel Corporation, 2002. 607 p.
- 46 TALEBIAN, N.; NILFOROUSHAN, M. R.; ZARGAR, E. B. Enhanced antibacterial performance of hybrid semiconductor nanomaterials: ZnO/SnO₂ nanocomposite thin films. **Applied Surface Science**, v.258, n.1, p.547-555, 2011.
- 47 MATTOX, D. M. Physical vapor deposition (PVD) processes. **Metal Finishing**, v.98, n.1, p.410-423, 2000.

- 48 STAN, G.; PASUK, I.; HUSANU, M.; ENCULESCU, L.; PINA, S.; LEMOS, A.; TULYAGANOV, D.; EL MABROUK, K.; FERREIRA, J. Highly adherent bioactive glass thin films synthesized by magnetron sputtering at low temperature. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine** v.22, n.12, p.2693-2710 2011.
- 49 BEDEL, L.; CAYRON, C.; JOUVE, M.; MAURY, F. Embedded layer of Ag nanoparticles prepared by a combined PECVD/PVD process producing SiO_xC_y-Ag nanocomposite thin films. **Nanotechnology**, v.23, n.1 2012.
- 50 DAMIÃO, A. J. **Processo de deposição e propriedades de filmes de dióxido de titânio obtidos por "Laser ablation"**. 2002, 118 f. Doutorado (Doutorado em física), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- 51 SAYER, M.; SREENIVAS, K. Ceramic Thin Films: Fabrication and Applications. **Science**, v.247, n.4946, p.1056-1060, March 2, 1990 1990.
- 52 BU, S. J.; JIN, Z. G.; LIU, X. X.; YANG, L. R.; CHENG, Z. J. Synthesis of TiO₂ porous thin films by polyethylene glycol templating and chemistry of the process. **Journal of the European Ceramic Society**, v.25, n.5, p.673-679, 2005.
- 53 SEQUINEL, T. **Determinação das propriedades mecânicas e caracterização de filme fino produzido por impregnação forçada**. 2008, 85 f. Dissertação de mestrado (Mestre), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
- 54 PACHECO, F. **Microbiologia online com foco em: coloração de Gram**. Disponível em: <microbiologiaonlineblog.blogspot.com.br>. Acesso em: 16/03/2013.
- 55 ARAUJO, L. R. **Estudo da reação de decomposição do etanol para a formação de hidrogênio e nanotubos de carbono sobre catalizadores de Ni/Al₂O₃ e Co/Al₂O₃**. 2010, 48 f (Estágio Supervisionado II), Universidade Federal de Santa Catarina
Florianópolis - SC, 2010.
- 56 TAJIMA, S.; TSUCHIYA, S.; MATSUMORI, M.; NAKATSUKA, S.; ICHIKI, T. High-rate reduction of copper oxide using atmospheric-pressure inductively coupled plasma microjets. **Thin Solid Films**, v.519, n.20, p.6773-6777, 2011.
- 57 ALTAF, F.; QURESHI, R.; AHMED, S.; KHAN, A. Y.; NASEER, A. Electrochemical adsorption studies of urea on copper surface in alkaline medium. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.642, n.1, p.98-101, 2010.