

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

PREPARAÇÃO DE FILMES FINOS DE TiO_2 EM SUBSTRATOS VÍTREOS E
CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE

JULIANA DE OLIVERA PIMENTA

PONTA GROSSA

2011

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

PREPARAÇÃO DE FILMES FINOS DE TiO_2 EM SUBSTRATOS VÍTREOS E
CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE

JULIANA DE OLIVERA PIMENTA

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Mestrado em
Engenharia e Ciência de Materiais da
Universidade Estadual de Ponta
Grossa, como parte dos requisitos
para 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

2011

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

P644p Pimenta, Juliana de Oliveira
Preparação de filmes de TiO_2 em substratos vítreos e caracterização da biotividade/ Juliana de Oliveira Pimenta. Ponta Grossa, 2010.
78f.

Dissertação (Mestrado em Ciências de Materiais . Linha de Pesquisa : Cerâmica), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Sergio Mazurek Tebcherani
Co-orientador : Prof. Dr. Marcos Pileggi

1. Filmes finos. 2. Bacteriostático. 3. Dióxido de titânio.
4. Impregnação forçada. I. Tebcherani, Sergio Mazurek. II. Pileggi, Marcos. III. T.

CDD: 738

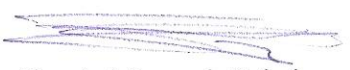
TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA DE OLIVEIRA PIMENTA

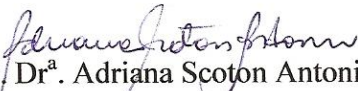
**PREPARAÇÃO DE FILMES FINOS DE TiO₂ EM SUBSTRATOS VÍTREOS E
CARACTERIZAÇÃO DA BIOATIVIDADE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof. Dr. Sergio Mazurek Tebcherani
Departamento de Química, UEPG, PR



Profª/Drª. Adriana Scoton Antonio Chinelatto
Departamento de Engenharia e Ciência de Materiais, UEPG, PR



Dr. Evaldo Toniolo Kubaski
Itajara Minérios Ltda., PR

Ponta Grossa, 18 de janeiro de 2011.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão, pelos estímulos que me impulsionaram a buscar novas oportunidades de me realizar ainda mais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas e lugares interessantes, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado.

Agradeço em especial aos professores Dr. Sergio Mazurek Tebcherani meu orientador e Marcos Pileggi, coorientador, pela oportunidade concedida, pelo incentivo, bom-humor e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o trabalho realizado.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais Adilson de O. Pimenta e Salete A. Pimenta sem os quais não estaria aqui, pelos momentos de compreensão, conversas, conselhos e por terem me fornecido condições para me tornar a profissional que sou.

A meu irmão Adilson Junior, pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos meus colegas de mestrado e do grupo de pesquisa, que me forneceram bons momentos de descontração, estudos e discussões sobre a pesquisa.

Agradeço a Siara, o Ricardo e o Thiago, pela paciência, pelas discussões e análises realizadas, e colaboração para realização desse projeto.

Aos meus grandes amigos, que sempre me apoiaram e me incentivaram ao longo de minha caminhada (Manoela, Cecília, Bruno e Viviane)

Ao meu companheiro André César Bento, pela compreensão, paciência, apoio, discussões sobre a pesquisa e pelos inúmeros puxões de orelha, que sempre soaram como incentivo.

Agradeço ainda a todos os técnicos dos laboratórios de materiais e biologia, e os professores do programa de Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais a todo auxílio e colaboração para que fosse possível o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES ao apoio financeiro.

E a todos que colaboraram direta e indiretamente para que este trabalho fosse concretizado, meu muito obrigada!

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um estudo sobre a preparação de filmes finos de dióxido de titânio (TiO_2) em substrato de lamínulas de vidro utilizando o método de impregnação forçada por controle de pressão e de temperatura. Para a preparação dos filmes, utilizou-se a temperatura de 320°C com pressão constante de 1,80 MPa exposto por período de 24 horas. Os filmes obtidos foram caracterizados por difração de raios X que confirmaram a presença de TiO_2 na superfície dos substratos e, a morfologia, analisada por microscopia eletrônica de varredura convencional e por força de campo de emissão. Os filmes de dióxido de titânio foram utilizados para ensaios bacteriológicos. As variáveis controladas nos ensaios bacteriológicos foram à temperatura para o crescimento das bactérias, o tempo de crescimento, a esterilização do ambiente e materiais e a qualidade das culturas de bactérias e meio estéril. A bioatividade do TiO_2 foi testada com *Escherichia coli* por um método padrão, com crescimento por 24 h a 37°C e analisada por espectrofotometria de absorção com leituras na faixa de 600 nm. Os filmes mostraram eficiente poder bacteriostático inibindo o crescimento da *Escherichia coli* se comparado com substratos sem o filme. ($\sum \log \text{Abs} = 73,7$ com filme contra $\sum \log \text{Abs} = 75,0$ sem filme fino $E \pm 10^{-1}$).

Palavras chaves: Filmes finos, bacteriostático, dióxido de titânio, impregnação forçada

ABSTRACT

This work presents a study on the preparation of titanium dioxide thin films (TiO₂) on a substrate of glass slides using the forced impregnation method for control of pressure and temperature. A temperature of 320 ° C with a constant pressure of 1,80 MPa was used to prepare the films; the samples were exposed for 24 hours at this condition. The films were characterized by X-ray diffraction which confirmed the presence of TiO₂ on the surface of the substrate and the morphology was analyzed by conventional and field-emission gun scanning electron microscopy. The films of titanium dioxide were used for bacteriological testing. The controlled variables in the bacteriological tests were: the temperature for bacterial growth, growth time, sterilization of the environment and materials and quality of bacterial medium cultures. The bioactivity of TiO₂ was tested with *Escherichia coli* by standard method, with growth in an oven for 24h at 37 °C and analyzed by absorption spectrophotometry with readings in the range of 600nm. The films showed effective bacteriostatic by growth inhibiting the growth of *Escherichia coli* compared to substrates without film. ($\sum \log \text{Abs} = 73,7$ with film against $\sum \log \text{Abs} = 75,0$ without thin film $E \pm 10^{-1}$).

Keywords: Thin films, Bacteriostatic, Titanium dioxide, Forced impregnation

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Características da parede celular de uma bactéria Gram-positiva	34
Figura 3.2 Características da parede celular de uma bactéria Gram- Negativa	35
Figura 3.3 Curva-padrão de crescimento bacteriano	37
Figura 4.1 Mecanismo do processo de impregnação de TiO_2 usando alta pressão em baixa temperatura em função do tempo a) T0 b)T1.....	41
Figura 4.2 Representação esquemática da fase 1 do experimento.....	44
Figura 5.1 Difratoograma de raios X de amostra do pó de TiO_2 em substrato vítreo	47
Figura 5.2: Microscopia eletrônica de varredura do pó de TiO_2	48
Figura 5.3 Difratoograma de raios X de amostra de filme fino de TiO_2 em substrato vítreo	49
Figura 5.4. Microscopia de FEG do filme fino de TiO_2 formado em substrato vítreo, vista lateral do substrato	50
Figura 5.5 Microscopia de FEG do filme fino de TiO_2 formado em substrato vítreo, vista da superfície do filme	51
Figura 5.6 Curva de crescimento padrão bacteriano para a <i>E. coli</i>	53
Figura 5.7 Microscopia eletrônica de varredura da <i>E. coli</i>	54
Figura 5.8 Média das somatórias dos experimentos	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Tratamentos utilizados para avaliar efeito bactericida/ bacteriostático do filme fino (fase 1)	43
Tabela 4.2 Tratamentos utilizados para avaliar efeito bactericida/ bacteriostático do filme fino (fase 2)	45
Tabela 4.3 Tabela comparativa entre tratamentos para análise da bioatividade	46
Tabela 5.1 Valores de absorbância encontrados para os tratamentos na fase 1	55
Tabela 5.2 Número de células em cada tratamento na fase 1 (Absorbância X 10^9)	57
Tabela 5.3 Log dos resultados e somatória do log para a fase 1 do experimento	58
Tabela 5.4 Valores de absorbância encontrados para os tratamentos na fase 2	59
Tabela 5.5 Número de células em cada tratamento na fase 2 (Absorbância X 10^9)	61
Tabela 5.6 Log dos resultados e somatória do log para a fase 2 do experimento	62
Tabela 5.7 Média das somatórias dos experimentos analisados	63

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

ATCC	<i>“American Type Culture Collection”</i>
β	Largura a meia altura do pico de difração de raios X
Σ	somatória
COVs	compostos orgânicos voláteis
CVD	deposição por vapor químico
DRX	difração de raios X
E	erro estatístico
FEG	<i>“Field emission gun”</i>
FL	luz fluorescente
HAP	hidroxiapatita
K	formato médio de cristalitos
MEV	microscopia eletrônica de varredura
NOx	óxidos de nitrogênio
PA	fotoacústica
RMS	rugosidade média quadrática
ROS	especies reativas de oxigênio
UV	ultravioleta
θ	ângulo de incidência na difração de raios X
λ	comprimento de onda

SUMÁRIO

1 Introdução	12
2 Objetivos:	14
3 Revisão Bibliográfica	16
3.1 Vitro-cerâmicos	16
3.2 Filmes Finos	16
3.3 Dióxido de titânio	20
3.4 Outros óxidos e seus efeitos bactericidas.	30
3.5 Bactérias	33
3.5.1 Classificação Gram	34
3.5.2 Crescimento e suas fases	36
4 Materiais e Métodos	40
4.1 Etapa 1: Caracterização do TiO_2 :	40
4.2 Etapa 2: Preparação do filme no substrato vítreo:	41
4.3 Etapa 3: Caracterização do filme:	42
4.4 Etapa 4: Bioatividade do TiO_2	42
5 Resultados e Discussões	45
6 Conclusão	67
7 Sugestões para trabalhos futuros	68
8 Referências	69

1 Introdução

As cerâmicas são substâncias que compreendem todos os materiais inorgânicos, não metálicos, obtidos geralmente após tratamento térmico em temperaturas elevadas. O setor cerâmico é amplo e heterogêneo o que induz a dividi-lo em sub-setores ou segmentos em função de diversos fatores como matérias-primas, propriedades e áreas de utilização.

Todavia, a evolução do conhecimento científico vem permitindo modificações e incorporações de novas propriedades aos compostos, dentre elas, o efeito gerado pela deposição de filmes finos sobre os materiais vem sendo amplamente utilizado em diversas aplicações [1]. Assim, podem ser produzidos dispositivos eletrocromicos, fotovoltaicos, fotoluminescentes, sensores, baterias de estado sólido, células solares, células a combustível, gravadores e leitores magneto-ópticos [2].

A espessura do filme interfere diretamente na qualidade das propriedades. O controle da espessura dos filmes está associado, essencialmente, ao método de deposição empregado [2]. As técnicas de deposição de substâncias em superfícies vítreas podem ser divididas em duas grandes áreas, as técnicas físicas que compreendem a evaporação térmica e feixe de elétrons, “*dip-coating*”, rádio frequência e feixe de íons de “*sputtering*” e ablação a laser e as técnicas químicas, que incluem “*spray*” pirólise, deposição de vapor químico e os processos de sol-gel [3].

Atualmente, um método diferente de deposição de filmes finos vem sendo testado, trata-se da deposição de filmes finos por impregnação forçada de óxidos com pressão elevada [4]. Um das versatilidades desse método refere-se a grande

variedade de óxidos que pode ser depositado em substratos vítreos, por exemplo, TiO_2 , SnO_2 , Co_3O_4 , AgO e muitos outros.

O dióxido de titânio tal como o óxido de prata possuem a propriedade de serem agentes bactericidas [5]. O TiO_2 leva vantagem sobre o AgO por ser um composto de menor custo.

Sendo essa uma pesquisa de grande e especial interesse da sociedade devido ao grave problema de desinfecção dos biofilmes patogênicos que se formam nos dispositivos médicos e nas superfícies de implantes, como também no próprio problema de infecção hospitalar, freqüente em muitos hospitais. A *E. coli* foi escolhida porque bactérias Gram-negativas são responsáveis por mais de 80 % de todas as infecções [6].

Este trabalho consistiu na preparação de filmes finos de dióxido de titânio em substratos vítreos, através de uma técnica denominada de impregnação forçada de óxidos com pressão elevada, onde a nucleação necessariamente ocorre na superfície do substrato em um estágio inicial de deposição após a adsorção do pó cristalino e a caracterização da bioatividade.

2 Objetivos

Este trabalho tem por objetivo geral:

Sintetizar filmes finos e ultrafinos de TiO_2 em substratos vítreos, pelo método de deposição e impregnação forçada com alta pressão e alta temperatura avaliando a bioatividade.

E como objetivos específicos:

- Caracterizar o pó de TiO_2 utilizado por difração de raios X.
- Analisar a morfologia do pó pela técnica de microscopia eletrônica de varredura.
- Caracterizar o filme fino obtido por técnica de microscopia eletrônica de varredura por campo de emissão (FEG) para análise da morfologia do filme
- Caracterizar o filme fino por difração de raios X para determinação de sua composição.
- Preparar filmes finos de dióxido de titânio em substrato vítreo.
- Testar a bioatividade de TiO_2 contra bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922).
- Analisar a bioatividade quantitativamente por espectrofotometria de absorção.

- Colaborar no desenvolvimento científico de um material com potencial bactericida ou bacteriostático para redução dos índices de contaminação em hospitais, residências, cozinhas industriais, etc.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Vitro-cerâmicos

Os vitro-cerâmicos são materiais microcristalinos obtidos de uma devitrificação quase completa e a investigação desses materiais são devidas às propriedades que podem ser alteradas com técnicas de impregnação ou pela dopagem durante os métodos de preparação [4].

As propriedades dos vitro-cerâmicos são conhecidas pela sua dependência nas propriedades físico-químicas do crescimento de grãos durante sua formação e da quantidade de cristais formados na composição média do vidro [7].

Normalmente, a melhoria das propriedades desses materiais vítreos, pode ser mecânica pela alteração do módulo elástico, dureza ou tenacidade [8], propriedade elétrica [9] ou, propriedade óptica [10, 11], dentre outras ou uma associação delas. E uma das maneiras de modificar as propriedades do vidro consiste em fazer um revestimento desses materiais para a formação de filmes finos.

3.2 Filmes Finos

Os filmes finos podem ser obtidos através de algumas técnicas de deposição de substâncias, dentre elas estão: deposição eletrolítica [12], deposição por “*spin coating*” [13], deposição por “*spray coating*” [14], deposição de vapor químico [15],

deposição de evaporação por feixe de elétrons [16], deposição por “*sputtering*” [17], deposição por plasma [18] ou ainda pelo método de deposição forçada [4].

A técnica de obtenção de filmes finos em substrato vítreo por deposições de soluções salinas (deposição eletrolítica) necessita do efeito da temperatura. Um exemplo desta obtenção de filmes em substrato de vidro é descrito no trabalho de Zhang e seus colaboradores [19] que realizaram estudos da deposição de íons Ag^+ na superfície de vidros a partir de solução de Ag_2SO_4 , CuSO_4 , Na_2SO_4 , em presença de compostos orgânicos dispersos em óleo.

Também foi comprovado que as técnicas de “*spray*” eletrostático e “*sputtering*” (pulverização) podem ser utilizadas para alterar as propriedades físicas do vidro, quando os filmes são constituídos de Al/Zn [20-22]. Onde a técnica de “*sputtering*” descreve a transferência física dos átomos de um alvo a um substrato, como resultado de uma transferência momentânea. Normalmente, isso ocorre devido ao bombardeio no alvo por íons de alta energia [3].

A deposição do ZnO, por técnica de campo elétrico e de plasma, ou ainda, a adição direta de dopantes na síntese vítrea, podem alterar as propriedades elétricas e ópticas do vidro [23].

Outros métodos que podem ser descritos são os métodos químicos de fabricação de filme fino, sendo a forma mais simples a de “*spray*” pirólise em que os fluxos de vapor químico reagem com um substrato aquecido. Um exemplo comum é a obtenção de filme de dióxido de estanho, onde o vapor cloreto de estanho (SnCl_4) reage com a superfície de uma placa de vidro, processo realizado em 600°C , para a formação de SnO_2 com a liberação de HCl. Para os compostos mais complexos, o não-equilíbrio deste tipo de reação e as dificuldades de controlá-lo fazem o processo útil apenas em um número limitado de casos [3].

Outro método químico também utilizado é a deposição por vapor químico (CVD) e que tem um grande potencial para fabricação de todos os tipos de filmes de óxidos e nitretos. Reagentes voláteis, como compostos de chumbo, metal-orgânicos, tetracloreto de titânio entre outros, são transportados através de uma câmara de reação, onde o material desejado cresce em equilíbrio sobre um substrato aquecido. As principais vantagens da CVD são: o crescimento de cristais ocorre durante os processos de deposição, as taxas de deposição são rápidas, existe um bom controle de composição e a deposição em superfícies pode ser conseguida em compostos complexos, embora muitas vezes com a desvantagem de temperaturas de processamento relativamente altas [3].

Um das técnicas mais utilizadas recentemente é o método sol-gel como rota de processamento para fabricação de filmes finos nanométricos devido a sua simplicidade, suas muitas aplicações tecnológicas e sua baixa temperatura de processamento, o que permite o uso de certos materiais como substrato. O seu processo envolve a preparação de soluções mistas de compostos organometálicos em um solvente orgânico adequado, onde esta solução é hidrolisada para formar uma solução estruturada e ocorre também a adição de agentes para ajustar a viscosidade, a tensão superficial, spin entre outros [3]. Infelizmente o processo sol-gel a partir de alcóxidos metálicos ou alguns outros precursores metalorgânicos ainda requer temperaturas de processamento em torno de 400 °C para a cristalização e remoção de compostos orgânicos e na produção de pós cerâmicos. Uma desvantagem do processo sol-gel é, que grandes quantidades de soluções devem ser manuseadas e filtradas. Um exemplo da utilização desse método é o estudo de Bu S.J. e colaboradores [24] que utiliza a técnica de sol-gel para a formação de filmes finos porosos onde a morfologia dos filmes porosos depende

fortemente da quantidade de água, dos tipos de solventes e agente complexantes, da concentração e do peso molecular do modelo.

A busca e a necessidade de desenvolver um novo processo de fabricação de filmes finos que fosse mais viável econômico e industrialmente, e que proporcionasse a produção de vidros e pós cerâmicos de alta qualidade fez com que surgisse um novo método descrito por Cava S. e colaboradores [4], onde os filmes finos foram preparados por impregnação de pressão do gás e alta temperatura.

Neste método, a nucleação ocorre na superfície do substrato em um estágio inicial de deposição após a adsorção do pó cristalino. Nos processos convencionais, filmes de substrato de vidro são processados por uma tecnologia que mistura o pó do material de substrato com reforços antes de cristalização ocorrer, onde, a força motriz para a nucleação é a redução da energia livre devido à transformação de amorfa metaestável para o estado cristalino em equilíbrio.

Os autores descrevem ainda que, os filmes fabricados por esta rota são abastecidos com materiais na forma de precursores de pó cristalino sobre o substrato antes da recristalização e a nucleação ocorre preferencialmente na superfície do substrato, onde a energia de ativação deve ser reduzido a pó / interface substrato [4].

Esta metodologia mostra-se perfeitamente capaz de formar filmes vitrocerâmicos pela impregnação sob pressão de pós cerâmicos na superfície do vidro a uma temperatura abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g). Quando distribuídos por uma superfície de vidro, pó de óxido de partículas ou nanopartículas são capazes de disseminar no substrato. Ao longo do tempo e sob o efeito da temperatura aplicada, as partículas interagem com a superfície vítrea e ocorre a formação de filme fino [4].

A partir dessa nova metodologia é possível a fabricação de filmes finos com menor custo de processamento, sendo assim mais viável estudar as propriedades adquiridas pelos vitrocerâmicos após a impregnação de diferentes óxidos. Em se tratando das propriedades dos materiais que podem ser modificadas através das técnicas de deposição de filmes em substrato, está a da bioatividade.

Estudos recentes [25, 26] relatam sobre a bioatividade encontrada em alguns óxidos, sendo que quando combinados com a estrutura vítrea, geram vidros com novas propriedades, como por exemplo, propriedade bactericida (Levam a morte da bactéria, quando retirada do contato com o substrato, não volta a se desenvolver) e/ou bacteriostática (Inibe o crescimento da bactéria, quando retirada do contato com o substrato bacteriostático, a bactéria volta a se desenvolver). Dentre esses óxidos, estudos têm apontado para os óxidos de titânio, óxido de prata e óxido de zinco, como eficientes na propriedade bactericida, sejam eles sozinhos ou uma combinação ambos.

3.3 Dióxido de titânio

Como relatado no trabalho de Bu S. e colaboradores [27], o dióxido de titânio (TiO_2) tem sido um dos materiais fotoeletroquímicos e fotovoltaicos mais atraentes nas últimas décadas devido à sua importância científica e tecnológica. Os filmes finos de TiO_2 são utilizados para diversas aplicações, tais como, fotocatalisadores [28], condutores transparentes [29], dielétricos [30], filmes eletrocromáticos [31], auto-limpeza em janelas e revestimentos [32], células fotoeletroquímicas [33], células solares [34] e cerâmicas com características piezelétricas [35].

O dióxido de titânio existe em três modificações cristalinas, rutilo, brookita e anatase. Em cada tipo, o íon de titânio está coordenado com seis átomos de oxigênio, que por sua vez estão ligados a três átomos de titânio, e assim por diante. Anatase e rutilo possuem geometria tetragonal, enquanto a brookita, ortorrômbica. Como as formas brookita e a anatase são mais instáveis [36], geralmente o metal titânio é encontrado na forma de dióxido como rutilo. E este tem uma das principais aplicações na área de nanopigmentos onde apresenta em particular, um alto índice de refração, que permite a dispersão eficiente da luz [37]. A sua absorção da luz ultravioleta confere durabilidade aos produtos e a sua natureza não-tóxica [36] faz com que ele possa ser amplamente utilizado em praticamente qualquer aplicação sem risco para a saúde e segurança.

Embora o dióxido de titânio seja geralmente encontrado na forma rutilo, a fase anatase é mais conhecida por apresentar um comportamento fotocatalítico melhor [36]. O dióxido de titânio é um material de “*bandgap*” largo exibindo decomposição fotocatalítica e super-hidrofobicidade. O *bandgap* de energia (3,23 eV) da fase anatase é mais amplo do que a do rutilo (3,02 eV), a recombinação de elétrons e buracos ocorre muito mais rapidamente na superfície da fase rutilo [38].

A razão para a baixa eficiência fotocatalítica em fase rutilo de TiO_2 é porque a recombinação do par elétron-buraco produzido pela radiação UV ocorre mais rapidamente na superfície da fase rutilo e as quantidades de reagentes e hidróxidos unidos à superfície da fase rutilo são menores que os da fase anatase do TiO_2 . No entanto, a diminuição do efeito fotocatalítico durante a transformação da fase anatase em TiO_2 rutilo não é devido à mudança na estrutura cristalina, mas principalmente devido a mudanças na área de superfície específica e porosidade [36].

Uma vez que a atividade fotocatalítica é confinada a superfície do material fotocatalítico, a sua superfície deve ser aumentada para maximizar esta atividade. Uma maneira de fazer isso é a síntese de partículas de TiO_2 em escala nanométrica para aumentar os sítios na superfície da reação fotocatalítica [38].

Recentemente, a fotocatalise com base no dióxido de titânio tem atraído muita atenção em termos de aplicações ambientais, por exemplo, para o desenvolvimento da auto-limpeza de superfícies de edifícios, seja pela própria ação auto-limpante, que impede o acúmulo de sujeira na superfície, ou pela ação antifúngica, que impede o crescimento de organismos vivos na superfície do edifício, ou até pela redução de emissões de gases poluentes, como os NO_x (óxidos de nitrogênio, por exemplo, NO_2/NO), que são danosos aos pulmões, pois diminuem a resistência a doenças como gripe e pneumonia, e os COVs (compostos orgânicos voláteis) que além de produzir poluição atmosférica, contribuem para a chuva ácida, causando danos a edifícios.

Essa despoluição e auto limpeza das superfícies e fachadas de edifícios são baseadas em dióxido titânio nanoparticulado ativado em revestimentos e materiais cimentícios e as aplicações incluem anti-sujeira, despoluição de contaminantes COVs e NO_x , antifúngicos e antimicrobiana, sendo os principais destaques os blocos de construção, revestimentos internos, tintas, vestuários e têxteis [36, 39].

Outra utilização de dióxido de titânio nanoparticulado que vem sendo estudada é baseada na propriedade de espalhamento de luz descrito anteriormente. Devido a esse fenômeno as nanopartículas de dióxido de titânio podem ser utilizadas para conferir excelente proteção UV. Comparado com os absorvedores UV disponíveis, possui propriedades efetivas como filtro UV sobre o espectro ultravioleta inteiro (UVC + UVB + AVA), ganhando então uma grande aceitação para

uso em protetores solares pois apresenta uma ação efetiva. E devido as nanopartículas de TiO_2 , serem extremamente inertes, são seguras para serem utilizadas junto a pele [36]. A partir dessa característica também é possível utilizar as nanopartículas de TiO_2 em filmes plásticos para fornecer proteção UV, antifúngica e antimicrobiana para os gêneros alimentícios.

Ainda no gênero alimentício, sabe-se que a radiação UV de luz artificial em uma mercearia, induz a auto-oxidação, por exemplo, de carne e queijo, resultando numa descoloração do alimento. Outra vez a utilização do TiO_2 mostrou-se eficaz, agindo como um estabilizador da luz, protegendo o próprio material de amarelar e retardando a deterioração dos alimentos expostos [37]. Um outro exemplo do potencial das nanopartículas de TiO_2 como um filtro UV é encontrado em acabamentos em madeira clara. A cor original de painéis de madeira podem ser retidos por um verniz claro feito com nanopartículas TiO_2 0,5 – 4 %. Além de prevenir o escurecimento da madeira, TiO_2 ultrafino também melhora o seu tempo de vida do material.

Uma outra avançada tecnologia que utiliza fotocatalise, oxidação UV e TiO_2 , surgiu nos últimos anos como um método inovador de tratamento de água. As possíveis aplicações da tecnologia incluem a degradação da matéria orgânica, redução de íons metálicos tóxicos e desinfecção da água [36].

Além disso, UV/ TiO_2 tem sido proposta como uma das melhores tecnologias de desinfecção, porque nenhum composto perigoso (carcinogênico ou mutagênico) ou halogenado malcheiroso é formado, diferentemente de outras técnicas de desinfecção mais usuais, que utilizam reagentes halogenados [40]. Lembrando que a natureza não-tóxica do TiO_2 faz com que ele possa ser amplamente utilizado.

Segundo Marciano F.R. e colaboradores [25] o dióxido de titânio na forma cristalina anatase é um forte agente bactericida quando exposto próximo à luz ultravioleta e aplicado na forma de filme.

Os ensaios antibacterianos realizados contra *Escherichia coli* (*E. coli*) comparados com a força de adesão bacteriana às superfícies estudadas mostrou que a presença de TiO_2 , diminui o conteúdo de hidrogênio, aumenta a rugosidade da superfície e com isso os filmes se tornam mais hidrofílicos, com maior energia livre na superfície, diminuindo a energia interfacial de adesão de bactérias.

Como atividade bactericida o TiO_2 inicia a sua ação por danos oxidativos à parede das bactérias, uma diminuição da energia interfacial de adesão de bactérias provoca um aumento na interação química entre a *E. coli* e os filmes, que é um fator adicional para aumentar a atividade bactericida, mostrando assim que nano partículas de TiO_2 podem ser úteis para a produção de propriedades antibacterianas [25]. Outro estudo recente [41] relata a influência da luz ultravioleta e da luz fluorescente sob o efeito bactericida do dióxido de titânio. Ao analisar as amostras, pode-se observar que os grupos que contém TiO_2 , a taxa de sobrevivência bacteriana diminui progressivamente, atingindo 9,4 %, após 60 minutos de exposição à luz UV e 10,9% após 60 minutos de irradiação fluorescente, mostrando assim que a mistura de partículas de TiO_2 deverá revelar-se eficaz na prevenção da infecção pós-operatória.

Sabe-se também da utilização do dióxido de titânio, que vem sendo disseminada para a sociedade, em tecidos autolimpantes, preparados com sucesso pelo depósito e enxerto de nanopartículas de TiO_2 via um processo de solução aquosa a baixa temperatura. Estes tecidos de algodão revestidos com TiO_2 possuem distintas propriedades de limpeza, tais como a atividade bactericida e decomposição

fotocatalítica de corantes, mostrando que o TiO_2 obviamente inibiu o crescimento de bactérias [26].

Notou-se atividade bactericida do dióxido de titânio, enfocando o desempenho fotocatalítico e atividade antibacteriana de nitrogênio dopado com TiO_2 em nanossistemas com três e cinco camadas obtidas por sol-gel, seguido por tratamento térmico em atmosfera de oxigênio ou amônia em temperaturas entre 400 e 1000 °C. Os resultados obtidos mostram uma dependência significativa do desempenho funcional sobre a composição do sistema. Em particular, a atividade antimicrobiana de filmes nitrogênio dopado com TiO_2 está correlacionada com a temperatura de tratamento térmico e tempo de iluminação artificial com a luz visível [42].

Uma técnica bastante utilizada, estudada por Delgado e colaboradores [43] é a fabricação de filmes finos de dióxido de titânio por técnicas sol-gel, a fim de obter filmes a serem utilizados em reações de fotodegradação. Os autores apresentaram em seus estudos, resultados sobre a caracterização estrutural e óptica medidas para uma série de filmes em que o número de camadas e a temperatura de sinterização foram alterados. Os resultados sobre a atividade fotocatalítica foram obtidos por imersão desses filmes em uma solução de azul de metileno com a presença de luz ultravioleta, que é um padrão utilizado para caracterizar a eficiência da reação. A alta atividade bactericida desses filmes em amostras de águas residuais foi observada subtraindo-se a ação da luz ultravioleta usada, através de medições de gás com a técnica de fotoacústica (PA) [43].

Sabe-se também que a atividade bactericida de TiO_2 e TiO_2 nanoestruturados são fotoativados, com base nisso Skorb e colaboradores [5] resolveram estudar a interação de filmes de titânio com In_2O_3 e o efeito da deposição de prata combinada

com outro íon metálico, Ag/Ni nano particulados nas propriedades de filmes fisiopatológicos de titânio. A atividade de agente antimicrobiano dos filmes foi avaliada contra *Pseudomonas fluorescens* B-22 (bactéria Gram-negativa) e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 411 (bactéria Gram-positiva).

A prata no filme de TiO_2 modificado demonstra uma maior eficiência fotobiocida, aumentando a atividade bactericida da luz UV, que resulta numa melhoria radical da adsorção de microorganismos e a supressão de recombinação de portadores de carga fotoproduzidos, sendo observado maior a taxa de inativação para *P. fluorescens* em comparação com *L. lactis* que pode ser explicada em termos de morfologia comparativa da célula que envolve bactérias gram-negativas e gram-positivas e da resistência das membranas externas contra espécies reativas de oxigênio geradas por reações fotocatalíticas [5].

Um dos estudos pioneiros sobre a esterilização fotoquímica de *E. coli* usando Pt- TiO_2 relatada por Mutsunaga e colaboradores [44], trouxe uma nova observação da desinfecção fotocatalítica realizada com TiO_2 , não só para determinar os parâmetros como: concentração de TiO_2 , intensidade de luz e pH, etc, mas também para melhorar a compreensão do mecanismo de desinfecção responsável pela inativação dos microorganismos.

Apesar de uma riqueza de informações que tem sido acumulada, há uma falta de evidências definitivas sobre as principais espécies que são responsáveis pela inativação fotoquímica do microorganismo, para demonstrar a eficácia das ações bactericidas do catalisador TiO_2 . Essa ação bactericida do TiO_2 tem sido freqüentemente atribuída a dois principais oxidantes fotoquímicos: espécies de radicais OH e espécies reativas de oxigênio (ROS) [45].

A ação biocida do fotocatalisador TiO_2 tem sido reconhecida a partir de evidências experimentais, o que demonstra que o processo de desinfecção fotocatalítica poderia ser tecnicamente viável. No entanto, o entendimento sobre o mecanismo fotoquímico da ação biocida em grande parte permanece obscura. É aceito que as espécies reativas de oxigênio e os radicais OH desempenham papel importante no processo de inativação das bactérias, sendo o seu papel no mecanismo de matar microorganismos investigado constatemente para determinar se o radical OH atua de forma independente ou em colaboração com ROS, e se esses estão mesmo relacionados com a inativação do microorganismo [45].

Maness e colaboradores [46] também relatam em seus estudos que a inativação da *E. coli* é causada pelas ROS como resultado de danos na parede celular e subsequente peroxidação dos componentes de fosfolipídios poliinsaturados da membrana lipídica. No entanto, não é citado nenhum agente específico responsável pela inativação da *E. coli* entre os diferentes ROS.

Outro estudo que busca explicações para os efeitos bactericidas do filme fino de TiO_2 é o trabalho realizado por Chung e colaboradores [47]. Embora o filme fino de TiO_2 tenha sido considerado fotocatalítico para muitas das aplicações antimicrobianas vistas até agora e sensível a fontes de luz, o seu mecanismo de inativação sob diferentes fontes de luz também é relativamente desconhecido. O trabalho elucida o mecanismo pelo qual o filme fino TiO_2 fotocatalítico inativa para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* sob diferentes fontes de luz, utilizando uma cultura de células bacterianas e observação microscópica de células bacterianas.

Os resultados experimentais indicam que o comportamento antimicrobiano só pode ser ativado quando a fonte de luz exibe as emissões com uma energia que ultrapassa o limiar de energia da banda de TiO_2 anatase.

Descobriu ainda que o mecanismo de inativação de bactérias *Staphylococcus aureus* é diferente da *Escherichia coli*. O primeiro sofre o descolamento da parede celular da membrana celular e o outro sofre uma mudança de padrão nucleóide das características de relaxamento para características de condensação [47].

Outros estudos [40, 45] também trazem explicações sobre os radicais livres ROS, de como estes agem na estrutura da bactéria e o efeito da exposição à radiação UV-A. Esta última que pode causar graves alterações na estrutura da membrana, incluindo mudança nas atividades da enzima ligada à membrana, vias metabólicas, sistemas de transporte e alterações da permeabilidade, levando à morte das células bacterianas.

No trabalho de Ibanez e colaboradores [40], foram utilizadas intensidades sub-letais de UV-A, que não produzem normalmente as alterações descritas anteriormente. No entanto a presença de TiO_2 durante a irradiação provocou uma inativação importante das bactérias Gram (-) ensaiadas. A explicação para a inativação é atribuída à geração de muitas espécies de radicais livres chamadas ROS, porém a natureza destas espécies ainda é controversa. Em processos fotocatalíticos na presença de oxigênio, são geradas duas espécies: radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e superóxidos ($\text{O}_2\cdot^-$), sendo essas espécies conhecidas por serem altamente reativas com amostras biológicas. Outras espécies de oxigênio reativo também têm sido propostos, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxil ($\text{HO}_2\cdot$).

Embora um estudo exaustivo não tenha sido feito e os mecanismos do processo ainda sejam desconhecidos, existem algumas evidências e sugestões já relatadas ao longo do trabalho sobre os passos que levam à inativação celular. Nos primeiros trabalhos, a atividade bactericida foi atribuída à inibição da respiração pela diminuição da formação de sua Coenzima A [48].

Mais tarde, alterações foto-induzida, causadas por ROS que causavam um transtorno significativo nas membranas celulares foram demonstradas, levando finalmente à ruptura da parede celular e completa morte celular. Kikuchi e colaboradores [49] sugeriram que radicais hidroxila não são a única espécie responsável pelo efeito bactericida, mas também a ação conjunta do peróxido de hidrogênio, juntamente com o radical superóxido podem ser importantes.

Alguns trabalhos atribuem a ação fotocatalítica do TiO_2 à peroxidação dos componentes fosfolipídeos da membrana lipídica, induzindo a desordem da membrana celular, seguida de perda de funções essenciais como a atividade respiratória e morte celular [50].

Trabalhos recentes [51] relatam que os íons dos óxidos bactericidas afetam quimicamente as membranas celulares, levando-os a quebrar, as células bacterianas são danificadas, onde ocorre a formação de “buracos” em sua parede celular, levando-as a morte, enquanto que as nanopartículas do óxido vão se acumulando na membrana bacteriana. A evidência mais direta de dano à membrana já havia sido descrita por Sunada e colaboradores [52] baseada na destruição fotocatalítica simultânea de endotoxina produzida por células.

3.4 Outros óxidos e seus efeitos bactericidas.

Entre outros óxidos bastante estudados pelo efeito bactericida, tem-se o já conhecido óxido de prata e o atualmente analisado, o óxido de zinco que também vem se mostrando um agente bactericida eficaz.

A elevada atividade bactericida está relacionada à concentração de nanopartículas de Ag^+ imobilizadas na superfície de um filme fino de sílica pelo método de sol-gel contra as bactérias: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Estima-se que o principal mecanismo de liberação de prata em longos tempos é determinado com base na difusão de água na superfície dos poros do filme de sílica. Portanto, as nanopartículas de Ag^+ incorporadas perto da superfície do filme fino SiO_2 mostra-se eficaz para ser utilizado em várias aplicações com uma atividade antibacteriana forte e de longo prazo [53].

Outros estudos recentes [54] relatam a bioatividade da prata quando associada com outros compostos, como por exemplo, na formação de uma membrana biocerâmica de Ag-TiO_2 /hidroxiapatita (HAP , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) / Al_2O_3 .

A membrana preparada foi caracterizada como uma estrutura de membranas microporosas, com média de 0,8 μm de diâmetro dos poros e camada com uma espessura de 10 μm quando preparada em substrato de alfa- Al_2O_3 .

A camada de HAP e Ag-fotocatalisador TiO_2 na inativação de *Escherichia coli* (*E. coli*) em suspensão. HAP agiu como um eficaz absorvente de alta bacteriana, enquanto Ag-TiO_2 tinha poderoso ataque fotocatalítico para cepas de *E. coli*.

A remoção de *E. coli* ainda foi analisada com iluminação ultravioleta e no escuro, onde pode-se observar, uma melhora de 71,7 % na eficácia bactericida após exposição de 1 hora sob a luz ultravioleta, se comparado com o escuro. Estes

resultados mostraram que esta membrana apresenta propriedade antiincrustantes, que podem integrar multifunções como: separação por membranas, adsorção de bactérias e inativação fotocatalítica, o que sugere grande potencial para o tratamento antibacteriano das águas subterrâneas e água potável [54].

Outro estudo [55] também interessante é uma técnica simples, aumentar a eficácia da ação bactericida em substratos de tecido (algodão, celulose) por enxerto nano conjugado de prata com TiO_2 , através do ligante enediol, colagem de óxido de metal e resina de desidratação. O tratamento garante que os nanoconjugados estão ligados covalentemente aos materiais do substrato de tecido.

O teste desses substratos em diversas lavanderias, utilizando a bactéria *Escherichia coli* por via aquática, obteve-se resultados satisfatórios em relação à inibição da bactéria, se comparado com amostras que continham somente TiO_2 . Este estudo ainda mostra a influência da Irradiação solar, onde após 60 minutos de irradiação solar, a eficiência global bactericida atingiu 96% após 7,5 horas de cultura e após 60 minutos de irradiação solar de luz artificial, a eficiência global bactericida atingiu 99 % [55].

Akhavan [56], mostra em seu estudo a fotodegradação de bactérias *Escherichia coli* na presença de nanocompósito $\text{Ag-TiO}_2/\text{Ag/a-TiO}_2$ na forma de filme, investigando na luz visível e nas irradiações de luz solar. O filme nanocompósito foi sintetizado por deposição sol-gel de uma camada de prata de 30 nm em uma camada de TiO_2 anatase formando um filme de aproximadamente 200 nm .

A atividade antibacteriana do filme nanocompósito contra a bactéria *E. coli* foi 5,1 vezes mais forte do que a atividade do TiO_2 , no escuro. A foto-atividade antibacteriana do filme nanocompósito expostos à luz solar foi medida de 1,35 e

6,90 vezes melhor do que a atividade do Ag/a-TiO₂ e TiO₂, respectivamente. O principal mecanismo de liberação de íons prata foi inter-difusão de nanopartículas de prata e água através dos poros da camada de TiO₂.

A durabilidade do filme nanocompósito foi de pelo menos 11 vezes maior do que o filme Ag/a-TiO₂. Chegou-se a conclusão que o fotocatalisador Ag-TiO₂/Ag/a-TiO₂ pode ser nomeado como um material nanocompósito muito eficaz e de duradoura atividade antibacteriana [56].

Applerot e colaboradores [57], mostraram que nanopartículas de ZnO depositadas na superfície de uma lâmina pela irradiação ultra-som apresentam uma atividade antibacteriana para culturas de *Escherichia coli* (Gram-negativas) e *Staphylococcus aureus* (Gram positivas) mesmo que a relação superficial de filme/vidro seja de 0,13 % (% m / m).

O trabalho realizado por Mosnier e co-autores [58], descreve a interação do metal com a bactéria e mostra que um filme de ZnO de 2 µm de espessura depositado por laser, à temperatura ambiente em uma planície de substrato de vidro soda cal, apresenta elevada atividade antibacteriana para a bactéria *Staphylococcus epidermidis* quando iluminados por uma fonte de luz UVA, para comprimentos de onda de cerca de 36 nm.

O filme depositado apresentou superfície de rugosidade RMS de 49,7 nm que, após ataque de raios UV, passou a ser de 68,1 nm. Com base nestes dados, propôs-se um modelo para a mediação da atividade bactericida em que a geração de fótons de espécies altamente oxidantes e a presença de sítios ativos gerando defeitos de superfície desempenham um papel importante nessa característica bactericida [58].

Todos os métodos e estudos descritos para tais óxidos são de grande e especial interesse da sociedade devido ao grave problema de desinfecção dos biofilmes patogênicos que se formam nos dispositivos médicos e nas superfícies de implantes, como também no próprio problema de infecção hospitalar, freqüente em muitos hospitais.

3.5 Bactérias

As bactérias são geralmente microscópicas ou submicroscópicas (detectáveis apenas com uso de um microscópio eletrônico) e suas dimensões variam de 0,5 a 5 μm . Elas são os organismos mais bem sucedidos do planeta em relação ao número de indivíduos [59].

A quantidade de bactérias no intestino de uma pessoa é superior ao número total de células humanas no corpo da mesma, por exemplo. Uma quantidade de 10^{12} bactérias ocupam 1 cm^3 e pesam cerca de 1 g. A contribuição dessas pequenas partículas para a turbidez de uma suspensão é tão grande, que um fluido transparente como a urina torna-se visivelmente opaco quando a quantidade de bactérias é superior de 1 a 10 milhões por mL. Cada ser humano carrega geralmente uma enorme quantidade de bactérias no intestino grosso, cerca de 10 a 100 trilhões [60].

3.5.1 Classificação Gram

Muito usada para identificar bactérias, é feita com base em uma técnica de coloração desenvolvida pelo microbiologista dinamarquês Hans Christian Gram, a técnica de Gram; dividindo as bactérias em dois grupos:

- Gram-positivas: Bactérias Gram positivas protegem sua membrana citoplasmática com uma parede celular espessa. O principal componente da parede é um polímero complexo, chamado mureína. Esta cinta rígida de mureína permite a bactéria sobreviver num meio com pressão osmótica menor que a de seu citoplasma, resistem também a compostos nocivos, inclusive sais biliares e pode ser observada na figura 3.1 [61].

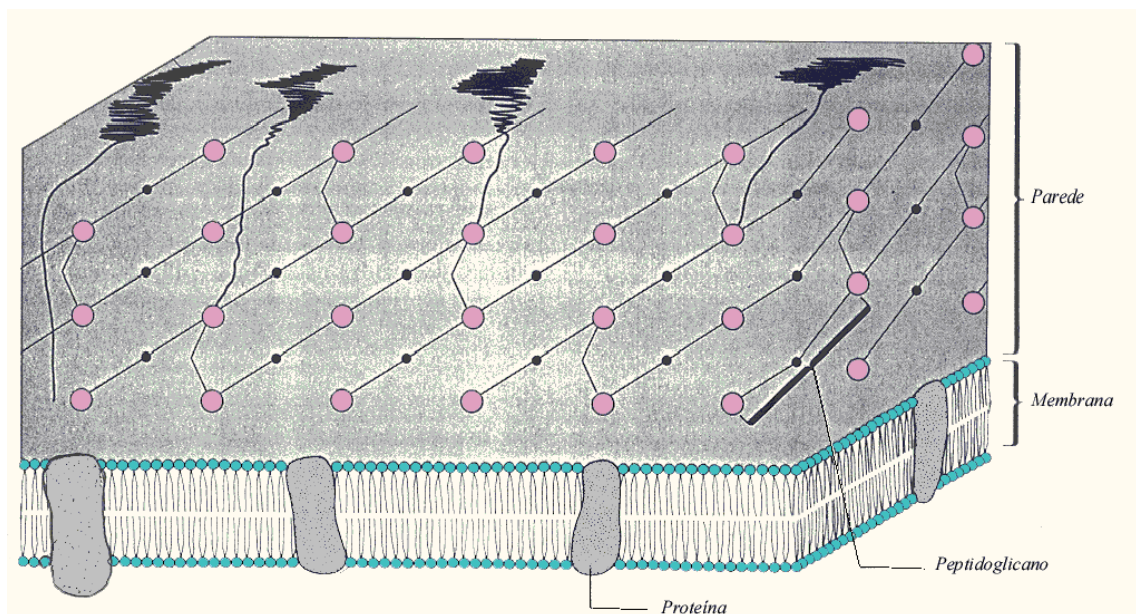


Figura 3.1 Características da parede celular de uma bactéria Gram-positiva [61].

Pelo emprego da coloração de Gram, tingem-se na cor púrpura ou azul quando fixadas com cristal violeta, porque retêm esse corante mesmo sendo expostas a álcool.

- Gram-negativas (Figura 3.2): as bactérias Gram negativas tem uma solução diferente para o problema da proteção da membrana citoplasmática. Essas bactérias possuem uma estrutura completamente diversa, uma parede celular mais delgada e uma segunda membrana lipídica - distinta quimicamente da membrana plasmática - no exterior desta parede celular de mureína. Essa membrana é capaz de resistir a danos por diversas substâncias químicas e de um modo geral, as Gram-negativas são mais resistentes a muitos antibióticos, especialmente a penicilina [61].

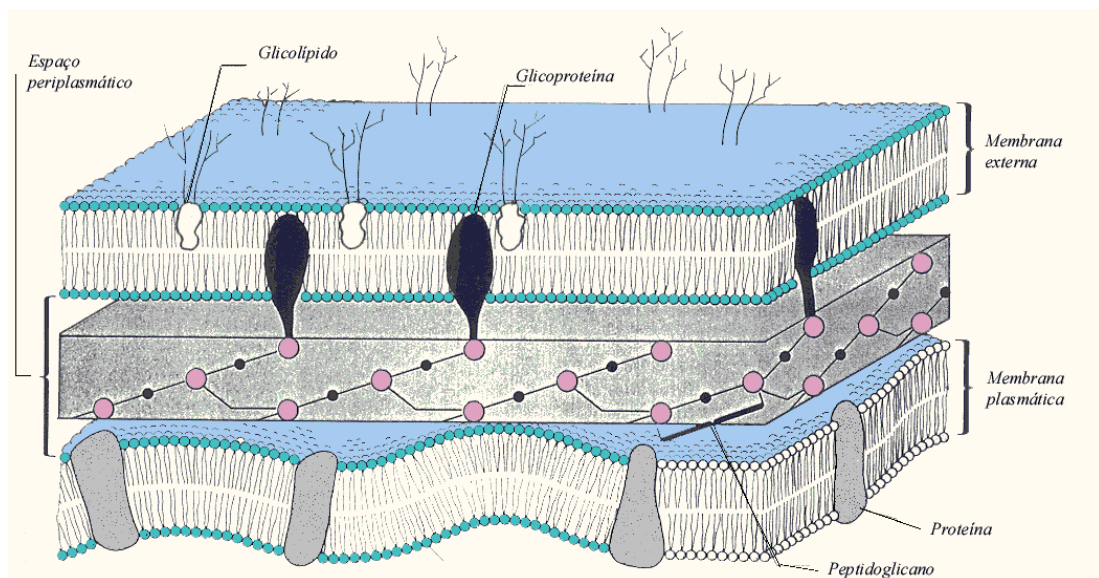


Figura 3.2 Características da parede celular de uma bactéria Gram- Negativas [61].

No processo de coloração o lipídio dessa membrana mais externa é dissolvido pelo álcool e libera o primeiro corante: cristal violeta. Ao término da coloração, essas células são visualizadas com a tonalidade rosa-avermelhada do segundo corante, safranina que lhes confere apenas a coloração vermelha.

A *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa que, juntamente com a *Staphylococcus aureus* é a mais comum e uma das mais antigas bactérias simbiontes do homem. E entre as principais doenças causadas por ela estão a toxiinfecção alimentar, que pode levar a uma gastroenterite; infecções no trato urinário, frequentes em mulheres jovens; peritonite, quando ocorre a perfuração da parede intestinal e a mortalidade é alta; meningite, onde a maioria dos casos ocorre em recém-nascidos; infecções de feridas; e é uma das responsáveis pela infecção hospitalar e que causam 15% dos casos fatais de septicemia, contra 20% por *Staphylococcus aureus* [59].

Para sobreviver em alguns ambientes e condições, as bactérias não cessam todas as atividades metabólicas quando param de crescer. Podem ao contrário, diminuir o crescimento total, mas continuar algumas atividades sintéticas que lhe permitam fabricar compostos específicos, necessários para a adaptação ao meio. A *E. coli*, quando exaurem a glicose, continuam a realizar baixos níveis de síntese proteica, suficiente para adaptá-las à utilização de outros nutrientes, como outros açúcares, que podem estar presentes no ambiente em que se encontram [59].

3.5.2 Crescimento e suas fases

As bactérias podem se reproduzir com grande rapidez, dando origem a um número muito grande de descendentes em apenas algumas horas. Essa reprodução pode ocorrer por divisão celular das bactérias: a divisão binária, onde os componentes são duplicados para serem divididos em duas novas células ou as vezes por brotamento, onde uma nova célula se desenvolve a partir da superfície de uma célula preexistente e, subsequente, se separa da célula-mãe [62].

Os organismos mostram quatro principais fases de crescimento: (1) fase lag, (2) fase log, (3) a fase estacionária e (4) a fase de declínio ou de morte.

Estas fases formam a curva-padrão de crescimento bacteriano e está representada na figura 3.3.

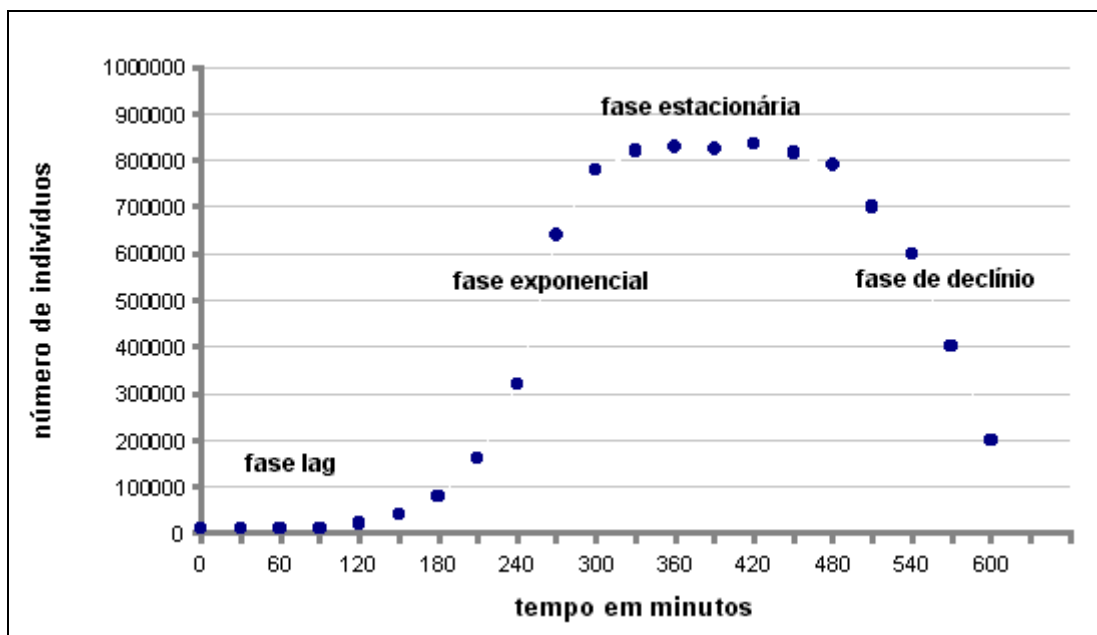


Figura 3.3 Curva-padrão de crescimento bacteriano.

A curva-padrão de crescimento bacteriano é composta das seguintes fases:

(1) Fase Lag: Fase de adaptação metabólica ao novo ambiente; o metabolismo celular está direcionado para sintetizar as enzimas requeridas para o crescimento nas novas condições ambientais encontradas pelas células. O número de indivíduos não aumenta nesta fase, podendo até mesmo decrescer. A duração desta fase depende das condições ambientais nas quais as células se encontravam anteriormente. A fase lag será tão mais longa quanto maiores as diferenças de composição do ambiente anterior ou se a população for constituída de bactérias esporuladas [62].

(2) Fase Log: Fase na qual o número de células da população dobra a cada geração. Esta taxa de crescimento não pode ser mantida indefinidamente em um sistema fechado. Após um determinado período de crescimento exponencial, as condições ambientais tornam-se desfavoráveis pela escassez de nutrientes essenciais, acúmulo de metabólitos tóxicos e limitação de espaço. A duração dessa fase é altamente variável dependendo tanto das características genéticas da bactéria quanto das condições ambientais [62].

(3) Fase estacionária: Fase em que a taxa de crescimento diminui significativamente devido às condições limitantes do meio. As células continuam metabolizando e se dividindo, mas parte das células torna-se inviável e a taxa de divisão celular é muito próxima da taxa de morte celular, o que mantém constante o número de células viáveis na população. A curva de crescimento atinge um platô. A duração da fase estacionária depende do balanço entre a taxa de divisão celular e o número de células que vão se tornando inviáveis (morte celular ou incapacidade de se dividir) devido às condições ambientais tornarem-se progressivamente desfavoráveis [62].

(4) Fase de declínio: Fase em que as células perdem a capacidade de se dividir, a taxa de morte celular torna-se maior que a taxa de divisão e o número de células viáveis decresce exponencialmente até a completa extinção da população. Nesta fase muitas células assumem formas incomuns. Em bactérias formadoras de esporos sobrevivem mais esporos que células vegetativas. A duração desta fase é

variável dependendo tanto das características genéticas da bactéria quanto das condições ambientais [62].

4 Materiais e Métodos

A metodologia deste trabalho foi desenvolvida através das seguintes etapas:

4.1 Etapa 1: Caracterização do TiO_2 :

Utilizou-se o dióxido de titânio comercial (Synth 91 %) que foi caracterizado pelas técnicas de difração de raios X e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A técnica de difração de raios X (Shimadzu XRD6000) foi realizada na faixa de 20° a 80° com varredura de $0,02^\circ/\text{min}$, para determinação das fases formadas. Dos difratogramas obtidos para o dióxido de titânio, calculou-se o tamanho médio de cristalitos pela equação de Scherrer.

(equação 4.1) [65].

$$\text{Tamanho médio de cristalitos} = \frac{K\lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (4.1)$$

Onde K é o formato médio de cristalitos, valor considerado 0,9 devido ao formato dos cristais não serem perfeitamente esféricos, λ é o comprimento de onda, β é a largura a meia altura do pico e θ é a posição do pico

A análise de sua morfologia foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando o equipamento Shimadzu - SSX-550 Superscan.

4.2 Etapa 2: Preparação do filme no substrato vítreo:

O filme fino de TiO_2 comercial foi produzido pelo método de impregnação forçada de óxidos com elevada pressão. Para a formação desse filme fino, um forno específico foi confeccionado, o qual suporta altas pressões e altas temperaturas.

Primeiramente os substratos vítreos foram devidamente limpos na seguinte ordem com a utilização de um aparelho de ultrassom: lavagem com detergente básico diluído em água, seguida de uma lavagem em detergente neutro também diluído em água e duas lavagens em água destilada, com o propósito de retirar matéria orgânica e mineral, garantindo limpeza total, sem deixar resíduos. Os substratos foram secos naturalmente e guardados separadamente em embalagens plásticas.

Depois de limpos, o substrato coberto com dióxido de titânio foi submetido a um tratamento térmico na temperatura de 320°C com pressão constante de $1,80\text{ MPa}$ exposto por um período de 24 horas.

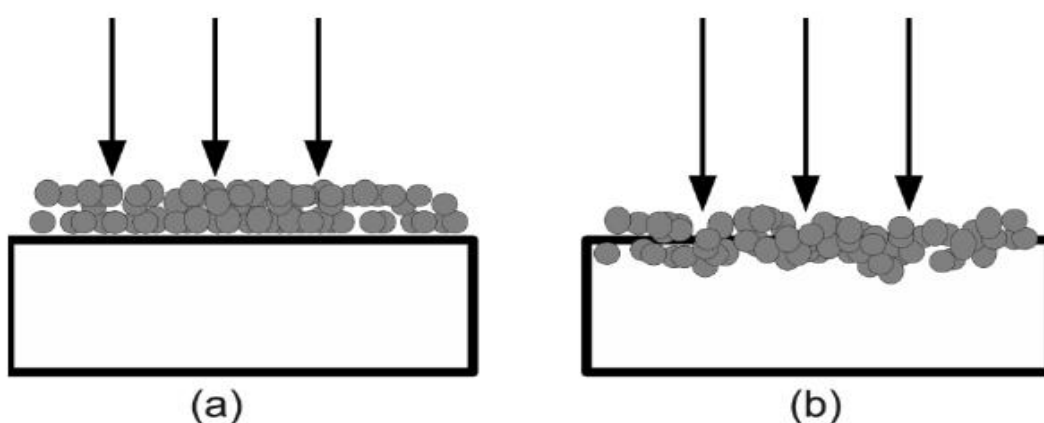


Figura 4.1 Mecanismo do processo de impregnação de TiO_2 usando alta pressão em baixa temperatura em função do tempo, a) T_0 b) T_1 . [66]

Em seguida os substratos vítreos foram lavados em banhos ultrassônicos com álcool isopropílico, repetindo o processo com água destilada.

4.3 Etapa 3: Caracterização do filme:

Os filmes resultantes deste tratamento térmico foram caracterizados por técnica de difração de raios X com baixo ângulo (Shimadzu XRD6000). A morfologia dos filmes foi avaliada através da microscopia eletrônica de varredura por campo de emissão “*field emission gun*” (FEG) (Zeis Supra 35).

4.4 Etapa 4: Bioatividade do TiO₂

Para o teste bactericida foi realizado um método padrão para análise de atividade bactericida. O seguinte microorganismo foi utilizado: *E. coli* (ATCC 25922), a qual é Gram-negativa. *E. coli* foi escolhida porque bactérias Gram-negativas são responsáveis por mais de 80 % de todas as infecções [3].

Primeiramente as bactérias encontradas em estoque foram inoculadas em meio líquido (caldo nutriente), por um período de 24 horas à temperatura de 37 °C. Após esse período as bactérias crescidas foram inoculadas em Agar Nutriente (0,1 % Agar), para formação de colônias e avaliação da pureza da linhagem bacteriana pelo mesmo período de tempo e igual temperatura.

Após este processo de ativação, as culturas foram crescidas em 100 mL de Caldo Nutriente (meio rico) em frascos de 250 mL durante 24 horas a 37 °C. Para realização do experimento foram utilizadas 10 repetições para cada tratamento, sendo esse o mínimo necessário para se obter resultados estatisticamente precisos.

As alíquotas retiradas foram de 300 µL, tanto do meio de cultura quanto do meio estéril para a realização do procedimento conforme a tabela 4.1.

Tabela 4.1 Tratamentos utilizados para avaliar efeito bactericida/ bacteriostático do filme fino (fase 1)

Tratamento	Filme fino	Pré- esterilização	Cultura de bactéria
1	Sim	Sim	Sim
2	Sim	Sim	Não
3	Não	Sim	Sim
4	Não	Sim	Não
5	Sim	Não	Sim

Os tratamentos foram incubados durante 24 horas numa estufa a 37 °C, após esse período realizou-se as leituras das absorbâncias, 100 µL foram retirados das amostras e adicionados 900 µL de salina 0,9 %, sendo realizadas as leituras em espectrofotômetro a 600 nm. A tabela 4.1 pode ser representada pela figura 4.2 a seguir:

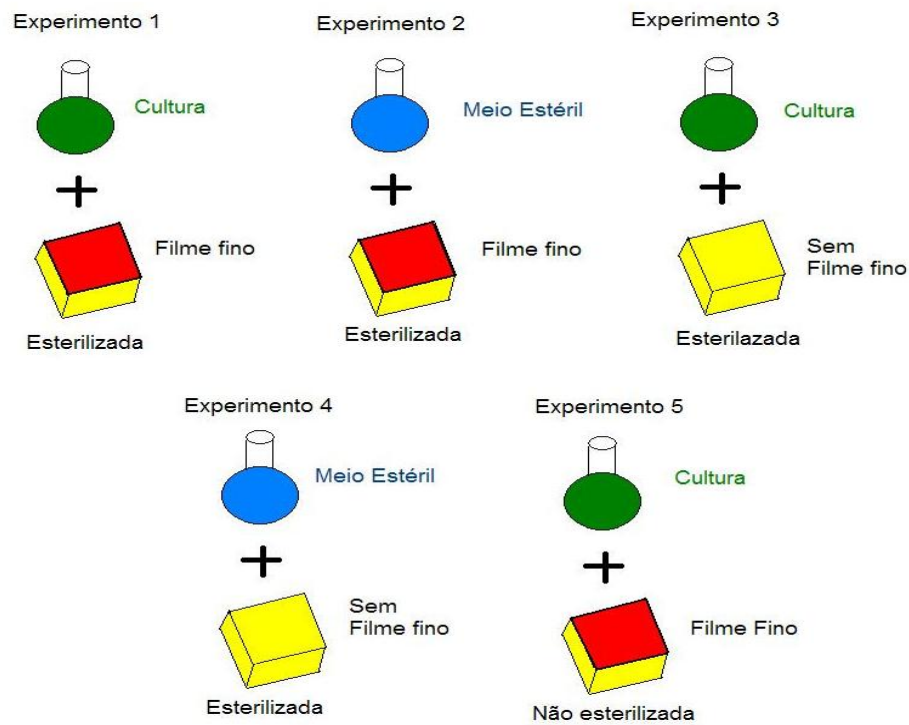


Figura 4.2 Representação esquemática da fase 1 do experimento.

Para a continuidade do experimento, alíquotas de 100 μL dos tratamentos anteriores foram inoculadas em tratamentos sem o filme fino (tabela 4.2), com pré-esterilização, adicionando 200 μL de meio de cultura e estéril, o experimento foi incubado durante 24 horas a 37 °C. Leituras foram realizadas em espectrofotômetro como descritas anteriormente.

Tabela 4.2 Tratamentos utilizados para avaliar efeito bactericida/ bacteriostático do filme fino (fase 2).

Tratamento	Filme fino	Pré- esterilização	Cultura de bactéria
1	Não	Sim	Sim
2	Não	Sim	Não
3	Não	Sim	Sim
4	Não	Sim	Não
5	Não	Não	Sim

Desta forma, foi possível avaliar a bioatividade de filmes finos e ultrafinos de dióxido de titânio em substrato vítreo obtido via processo de impregnação forçada por controle de pressão e de temperatura

A fase 2 do experimento foi realizada com o objetivo de averiguar se o filme formado é bactericida ou bacteriostático, onde um aumento nos valores obtidos de leituras de absorbância indica um crescimento das bactérias (ou seja, o filme é bacteriostático), já se os valores se mantiverem próximos e/ou iguais podem indicar a morte e inativação das bactérias (filme bactericida).

Classificou-se ainda os tratamentos e as fases 1 e 2 conforme a tabela 4.3 a seguir:

Tabela 4.3 Tabela comparativa entre tratamentos para análise da bioatividade.

Ensaio	Resultado	Hipótese
3-1	3>1	Taxa de sobrevivência – com inibição
3-1	3=1	Taxa de sobrevivência – sem inibição
2	-	Controle qualidade do filme
3	100%	Controle qualidade da bactéria
4	0%	Controle qualidade do meio
Fase 1 = Fase 2	Estatisticamente significante	Filme bactericida
Fase 1 < Fase 2	Estatisticamente significante	Filme bacteriostático

5 Resultados e Discussões

Para a determinação da composição do pó utilizado utilizou-se as técnicas de difração de raios X (Figura 5.1) e microscopia eletrônica de varredura (Figura 5.2), respectivamente.

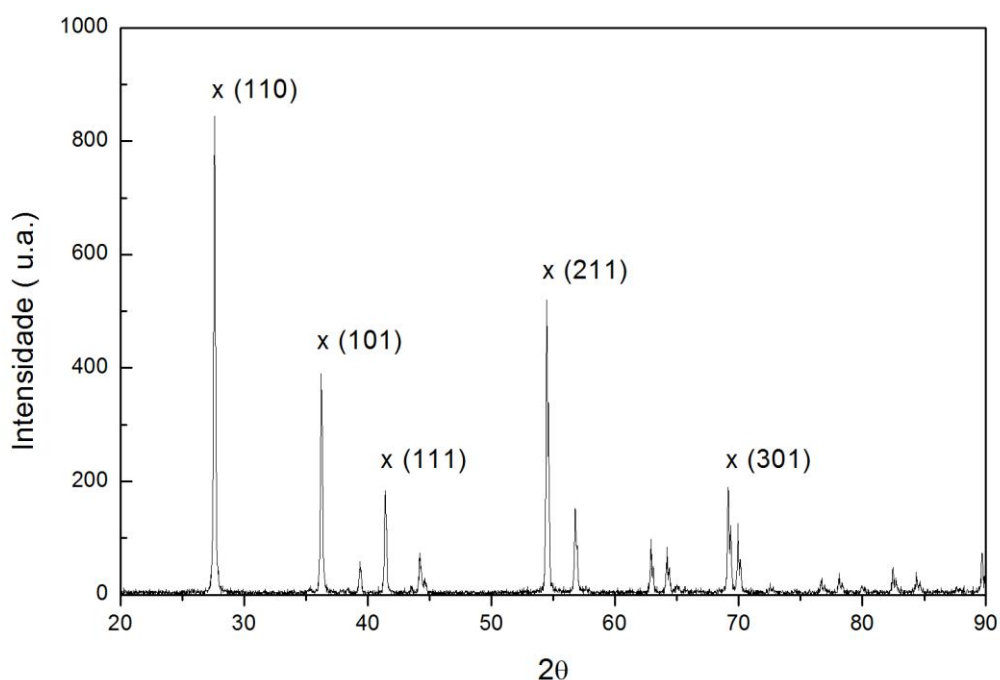


Figura 5.1 Difratoograma de raios X de amostra do pó de TiO_2 em substrato vítreo.

O difratograma representado na figura 5.1 serve para caracterizar a composição monofásica do óxido utilizado, onde pode se perceber os picos característicos do TiO_2 puro na fase rutilo com base nos cartões JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*).

E através do difratograma (Figura 5.1) pode-se calcular o tamanho médio de cristalito do pó pela equação de Scherrer (equação 4.1). Onde o dióxido de titânio apresentou um tamanho médio de cristalito, na ordem de 11,4 nm.

A micrografia da figura 5.2 apresenta a morfologia do dióxido de titânio, quando caracterizado por MEV.

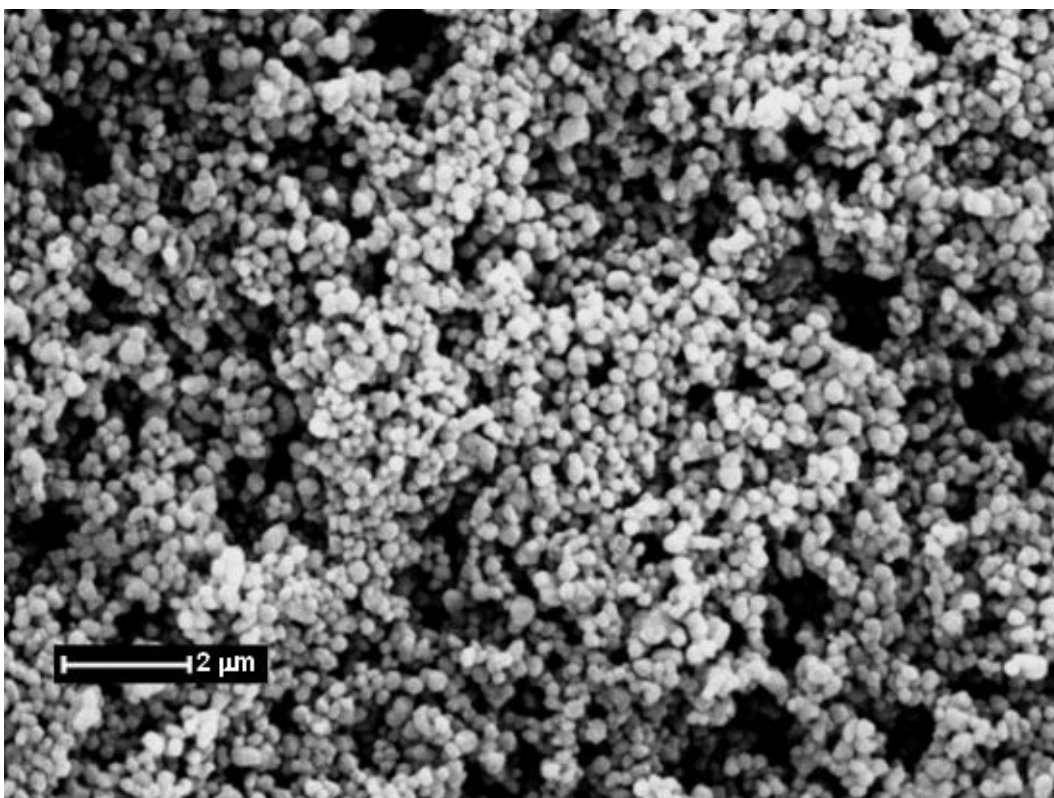


Figura 5.2: Microscopia eletrônica de varredura do pó de TiO_2

Após a preparação do substrato e deposição do filme através da metodologia já descrita nesse trabalho, foi possível caracterizar o filme fino de TiO_2 com a técnica de difração de raios X em baixo ângulo (figura 5.3) e os resultados, comparados aos cartões JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*).

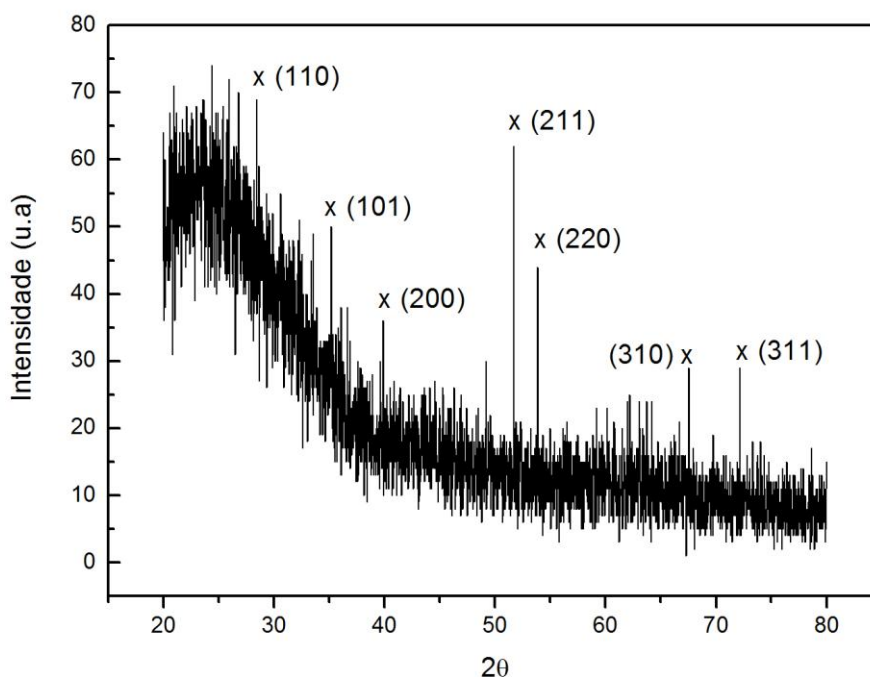


Figura 5.3 Difratoograma de raios X de amostra de filme fino de TiO_2 em substrato vítreo.

Os picos do difratograma da figura 5.3 são indicativos da presença do filme na forma de óxido para o pó utilizado, o TiO_2 , e indicam novamente a fase tetragonal rutilo. Sabe-se que a superfície do filme resultante é diretamente influenciada pela morfologia do pó utilizado, sendo que o pó fino, de preferência nanopós, é impregnado com maior êxito devido a sua elevada reatividade e área de superfície, o que facilita a formação do filme na superfície do substrato devido a uma nucleação mais rápida [1].

A propriedade morfológica do filme fino de TiO_2 , foi avaliada por microscopia de “field emission gun” (FEG) e está representada nas figuras 5.4 e 5.5.

A figura 5.4 é uma seção transversal do substrato vítreo, onde se pode analisar a espessura nanométrica do filme fino formado.

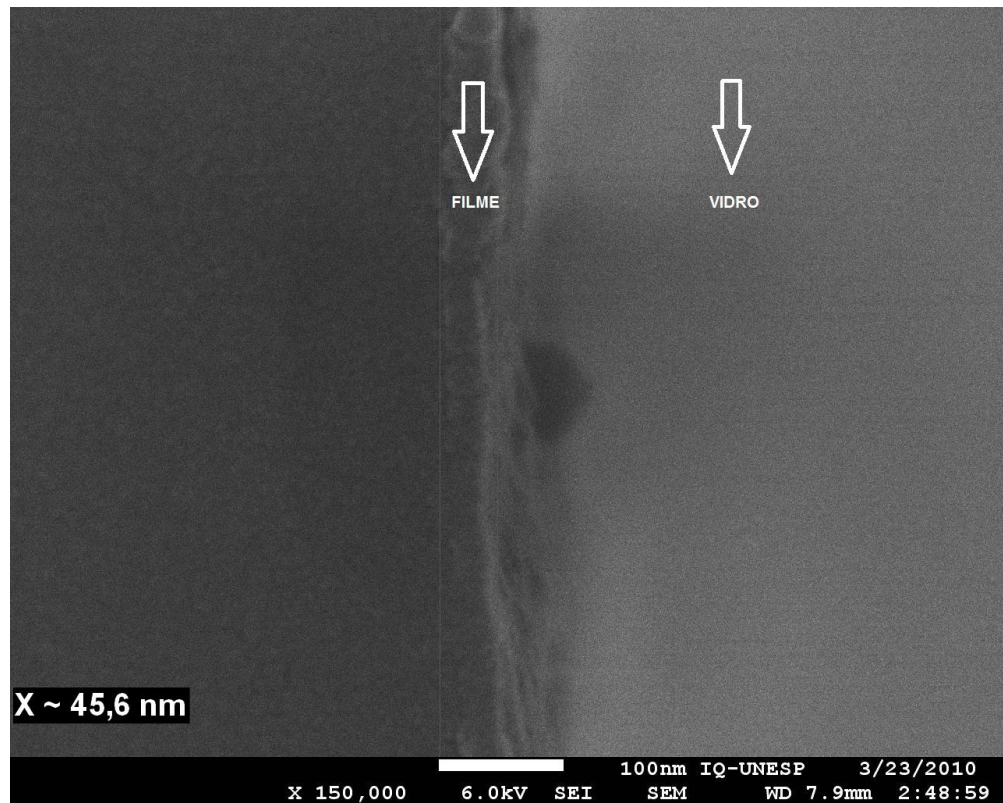


Figura 5.4. Microscopia de FEG do filme fino de TiO_2 formado em substrato vítreo, vista lateral do substrato.

Já na figura 5.5 tem-se uma imagem da superfície do substrato, representada pelas partículas de dióxido de titânio que recobrem a superfície do substrato vítreo.

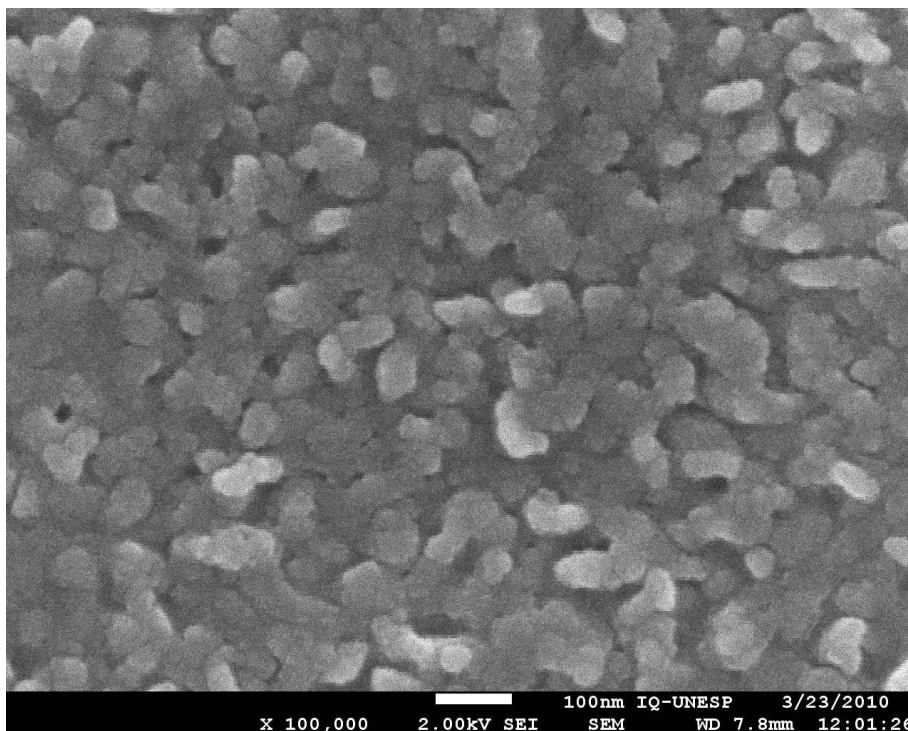


Figura 5.5 Microscopia de FEG do filme fino de TiO_2 formado em substrato vítreo, vista da superfície do filme.

A figura 5.4 comprova a formação do filme fino e sua possível espessura que é muito inferior a 45 nm, podendo assim, ser considerado filme ultrafino. Já na figura 5.5 é possível analisar a morfologia desse filme de TiO_2 .

Sugere-se que a formação do filme fino ocorre devido à troca iônica induzida, gerando um aumento na cristalização vítrea, onde os íons do óxido utilizado substituem alguns átomos presentes na rede do vidro, desde que estejam em concentrações apropriadas, que por sua vez, resultam no aumento da solubilidade em relação aos cristais formadores do vidro [64].

Isto afeta o equilíbrio termodinâmico do sistema formador do vidro, o qual, acima da T_g é considerado um equilíbrio metaestável (solução líquida), levando a uma solução supersaturada, provocando a precipitação dos cristais

correspondentes [63]. Neste caso, o vidro fundido e a formação de sais de sódio solúveis facilitam a impregnação de pós na superfície vítrea [64].

O aparecimento dos pequenos grãos de óxidos na superfície do vidro está em conformidade com a dimensão do óxido utilizado. Desta forma, acredita-se que, ao mesmo tempo em que a pressão exerce a função de gerar o contato da interface, a temperatura e o tempo são facilitadores da difusão dos grãos de óxidos na superfície do vidro.

Após a obtenção do filme fino e a comprovação de sua formação, foram realizados os testes para analisar a bioatividade do filme de TiO_2 .

Primeiramente analisou-se o crescimento da *Escherichia coli* com ausência de inibidores, para se obter uma curva de crescimento padrão na qual é possível analisar as fases de crescimento bacteriano (Figura 5.6). A cultura foi padronizada partindo de uma absorbância inicial de 0,05 nm, acompanhou-se o crescimento da bactéria, retirando alíquotas de 1000 μL a cada duas horas para realizar novas leituras.

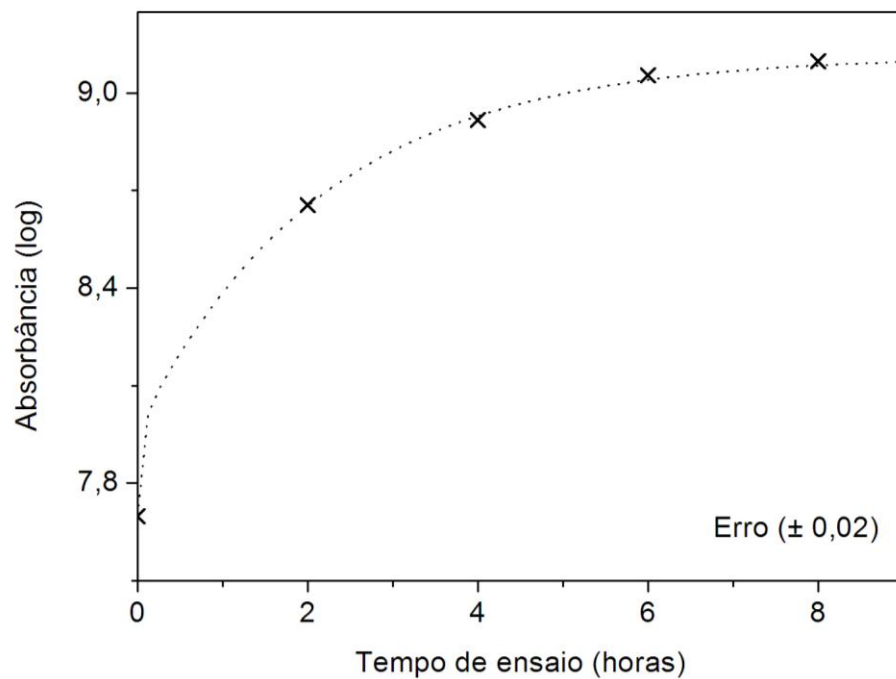


Figura 5.6 Curva de crescimento padrão bacteriano para a *E. coli*.

É possível observar na curva, que a *E. coli* não apresentou a fase lag, fase em que a bactéria se adapta ao meio e o crescimento é lento, isto se deve ao fato da cultura ter sido previamente crescida em outro meio antes da padronização para o início da curva.

Outro comportamento da *E. coli* observado é seu rápido crescimento, pois em aproximadamente 6 horas após a inoculação ela já se apresentava em fase estacionária, onde a divisão celular decresce a um ponto em que novas células são produzidas com a mesma velocidade com que as células antigas morrem, e o meio contém uma quantidade limitada de nutrientes e podendo conter resíduos tóxicos.

É possível também analisar a morfologia da *Escherichia coli* através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 5.7).

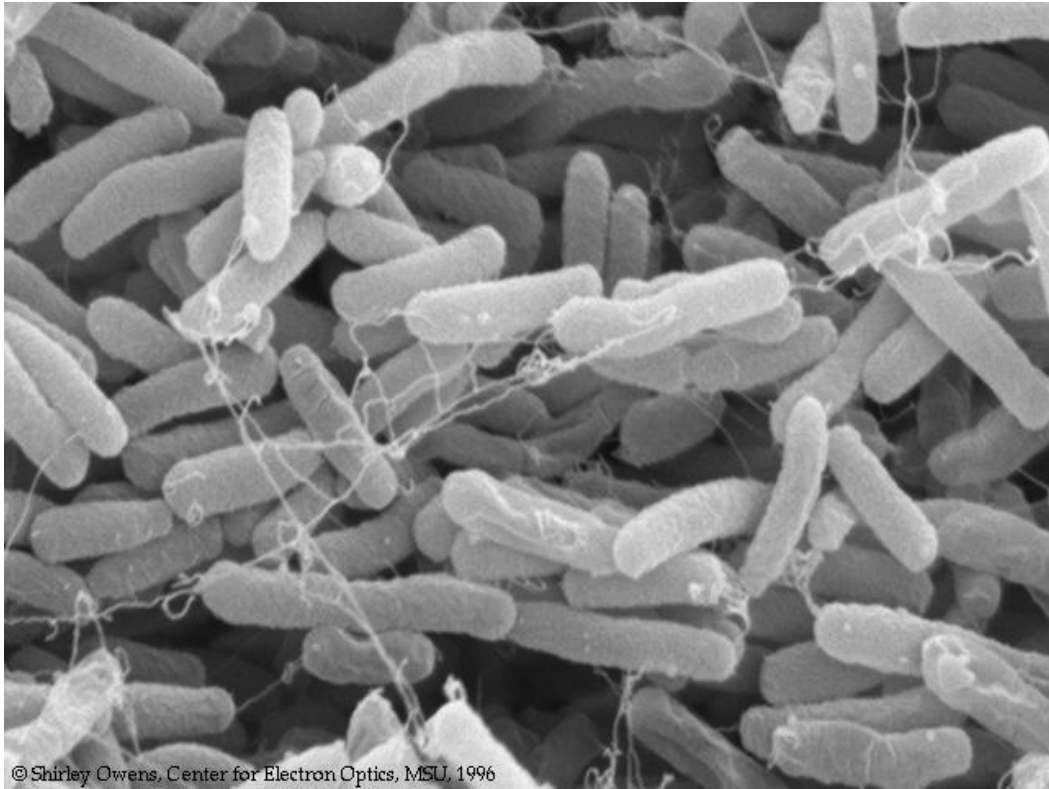


Figura 5.7 Microscopia eletrônica de varredura da *E. coli* [67]

Ao observar a figura 5.7 é possível ver a forma característica de bacilo da *Escherichia coli*. Os bacilos têm forma de bastonetes, podendo apresentar extremidades retas (*Bacillus anthracis*), arredondadas (*Salmonella*, *E. coli*), ou ainda afiladas (*Fusobacterium*). Como seu plano de divisão é fixo, ocorrendo sempre no menor eixo, os bacilos exibem uma menor variedade de arranjos, sendo, via de regra encontrados isolados, como diplobacilos ou ainda como estreptobacilos [62].

O tamanho e a forma de algumas bactérias pertencentes à mesma categoria podem variar, pois dependem dos nutrientes presentes no meio. Por exemplo, num meio abundante de nutrientes a divisão celular é rápida e os bastonetes são freqüentemente duas vezes maiores do que aqueles em meios com suprimento moderado de alimentos.

Depois de observar a morfologia da bactéria apresentada pela literatura na figura 5.7 e da análise do crescimento da *E.coli*, pode-se testar a bioatividade do filme e para isso foram realizadas 10 repetições para cada tratamento (descritos no item 4.4 - etapa 4). Após o período de crescimento de 24 horas em uma estufa a 37 °C, realizaram-se as leituras de absorvâncias da primeira fase dos tratamentos, conforme a tabela 5.1, que traz os dados de um dos experimentos realizados.

Tabela 5.1 Valores de absorvância encontrados para os tratamentos na fase 1 (absorvância x 10^2 E $\pm 10^{-4}$).

Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
2,0	0,0	2,5	0,5	1,0
2,0	0,0	1,5	0,5	1,0
1,5	0,0	2,5	0,5	1,0
1,5	1,0	1,0	0,0	1,0
1,0	0,5	1,5	0,0	1,5
1,5	1,5	1,5	0,5	1,0
1,0	0,5	1,0	0,5	1,5
2,0	0,5	3,0	0,0	2,0
0,5	0,0	2,5	0,0	1,0
2,0	0,0	2,5	0,5	2,0

Os resultados encontrados na tabela 5.1, apresentam os valores de absorbância encontrados após um período de crescimento das bactérias. Nota-se que os controles de meio estéril tratamento 2 (filme + meio estéril + esterilização) e tratamento 4 (sem filme + meio estéril + esterilização) apresentaram valores entre 0 e $1,5 \times 10^2$ nm, mostrando assim que a contaminação externa foi mínima nos tratamentos.

Os valores do tratamento 3 (sem filme + cultura + esterilização - média de $1,9 \times 10^2$ nm) mostram um maior crescimento das bactérias se comparado com o número 1 (filme + cultura + esterilização - média de $1,5 \times 10^2$ nm) e o número 5 (filme + cultura + sem esterilização média de $1,3 \times 10^2$ nm). Porém esses valores não trazem a quantidade aproximada de células existentes nas alíquotas retiradas.

Os valores de absorbância então foram multiplicados por 10^9 para encontrar o número de células de *E. coli* existentes em cada tratamento, conforme a tabela 5.2.

Tabela 5.2 Número de células em cada tratamento na fase 1 (Absorbância $\times 10^7 \pm 10^5$).

Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
2,0	0,0	2,5	0,5	1,0
2,0	0,0	1,5	0,5	1,0
1,5	0,0	2,5	0,5	1,0
1,5	1,0	1,0	0,0	1,0
1,0	0,5	1,5	0,0	1,5
1,5	1,5	1,5	0,5	1,0
1,0	0,5	1,0	0,5	1,5
2,0	0,5	3,0	0,0	2,0
0,5	0,0	2,5	0,0	1,0
2,0	0,0	2,5	0,5	2,0

A partir do número de células tornou-se possível analisar os resultados da ação do filme, porém o cálculo do log faz com que a análise tenha maior precisão.

Desta forma, calculou-se a somatória do log (tabelas 5.3) para efeito de comparação com a fase 2 (repetição dos tratamentos da fase 1 na ausência de filme).

Tabela 5.3 Log dos resultados e somatória do log para a fase 1 do experimento ($E \pm 10^{-1}$).

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
	7,3	0,0	7,4	6,7	7,0
	7,3	0,0	7,2	6,7	7,0
	7,2	0,0	7,4	6,7	7,0
	7,2	7,0	7,0	0,0	7,0
	7,0	6,7	7,2	0,0	7,2
	7,2	7,2	7,2	6,7	7,0
	7,0	6,7	7,0	6,7	7,2
	7,3	6,7	7,5	0,0	7,3
	6,7	0,0	7,3	0,0	7,0
	7,3	0,0	7,3	6,7	7,3
Σ	71,5	34,3	72,5	40,2	71,0

Realizou-se então a segunda etapa da análise da bioatividade do TiO_2 (fase 2), agora os tratamentos foram realizados na ausência de filme fino a fim de se obter resultados que comprovassem o efeito bactericida e/ou bacteriostático do filme. Sendo que um aumento nos valores obtidos das leituras da absorbância indica um crescimento das bactérias, já se os valores se mantiverem próximos e/ou iguais podem indicar a morte ou o não crescimento das bactérias, podendo assim realizar uma classificação da bioatividade do filme.

A tabela 5.4 traz os resultados das leituras de absorvância para a fase 2 do experimento realizado após um período de 24 horas numa estufa a 37°C com ausência de filme fino.

Tabela 5.4 Valores de absorvância encontrados para os tratamentos na fase 2 (absorvância $\times 10^2 \text{ E} \pm 10^{-4}$).

Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
0,5	0,0	3,0	2,0	4,5
3,0	1,0	4,0	0,5	3,0
3,0	2,0	2,0	1,0	1,0
3,0	0,0	3,0	0,0	1,5
1,0	1,5	2,5	5,0	3,0
5,0	1,0	3,5	1,0	2,5
1,0	0,0	2,0	0,0	1,5
1,5	0,5	1,5	1,0	1,5
1,0	0,0	5,0	0,0	4,0
1,5	1,0	2,0	0,0	1,0

Dos resultados de absorvância obtidos para a fase 2 podemos perceber que o crescimento das bactérias no tratamento 1 (sem filme + cultura + esterilização na fase 2 - média de $2,0 \times 10^2 \text{ nm}$) é estatisticamente insignificante, sendo a diferença entre a fase 1 (com filme) e a fase 2 (sem filme) é de aproximadamente $0,5 \times 10^2 \text{ nm}$.

No experimento 3 (sem filme + cultura + esterilização), as bactérias continuam a crescer, comparando-se a fase 1 (tratamento 3 sem filme - $1,9 \times 10^2$ nm) com a fase 2 (tratamento 3 sem filme - $2,8 \times 10^2$ nm). Já no experimento 5 (sem filme + cultura + sem esterilização na fase 2), onde não é realizada a esterilização do substrato vítreo, acredita-se que este seja o motivo do aumento da concentração de células bacterianas, pois o substrato sem filme adicionado pode estar contaminado e quando em contato com um meio rico em nutrientes desenvolve o crescimento desses organismos presentes em sua superfície, interferindo assim no resultado, onde a fase 1 (com filme - $1,3 \times 10^2$ nm) possui um ótimo resultado, em contraste a fase 2 (sem filme - $2,3 \times 10^2$ nm) mostra um grande aumento no valor da absorbância, comparado com o tratamento 1 (sem filme + cultura + esterilização) na fase 2, no qual é realizada esterilização.

Novamente multiplicaram-se os valores de absorbância por 10^9 para se obter o número de células existente, conforme tabela 5.5

Tabela 5.5 Número de células em cada tratamento na fase 2
(Absorbância $\times 10^7 \pm 10^5$).

Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
0,5	0,0	3,0	2,0	4,5
3,0	1,0	4,0	0,5	3,0
3,0	2,0	2,0	1,0	1,0
3,0	0,0	3,0	0,0	1,5
1,0	1,5	2,5	5,0	3,0
5,0	1,0	3,5	1,0	2,5
1,0	0,0	2,0	0,0	1,5
1,5	0,5	1,5	1,0	1,5
1,0	0,0	0,5	0,0	4,0
1,5	1,0	2,0	0,0	1,0

Assim, pode-se calcular o log e a somatória do log dos resultados para a fase 2. (tabela 5.6)

Tabela 5.6 Log dos resultados e somatória do log para a fase 2 do experimento ($E \pm 10^{-1}$).

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
	6,7	-	7,5	7,3	7,7
	7,5	7,0	7,6	6,7	7,5
	7,5	7,3	7,3	7,0	7,0
	7,5	-	7,5	-	7,2
	7,0	7,2	7,4	7,7	7,5
	7,7	7,0	7,5	7,0	7,4
	7,0	-	7,3	-	7,2
	7,2	6,7	7,2	7,0	7,2
	7,0	-	7,7	-	7,6
	7,2	7,0	7,3	-	7,0
Σ	72,3	42,2	74,3	42,7	73,3

Os cálculos relatados anteriormente foram feitos para todos os experimentos realizados. Após um número significativo de experimentos, calculou-se a média das somatórias encontradas para uma análise global da bioatividade do filme fino de TiO_2 . Sendo a média encontrada relatada na tabela 5.7.

Tabela 5.7 Média das somatórias dos experimentos analisados ($E \pm 10^{-1}$).

	Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4	Tratamento 5
Média da Σ Fase 1	70,9	36,0	70,8	36,0	64,0
Média da Σ Fase 2	73,7	44,0	75,0	41,0	74,0

E a partir da média dos experimentos realizados foi possível construir um gráfico que representa o efeito do filme sobre as bactérias. (Figura 5.8)

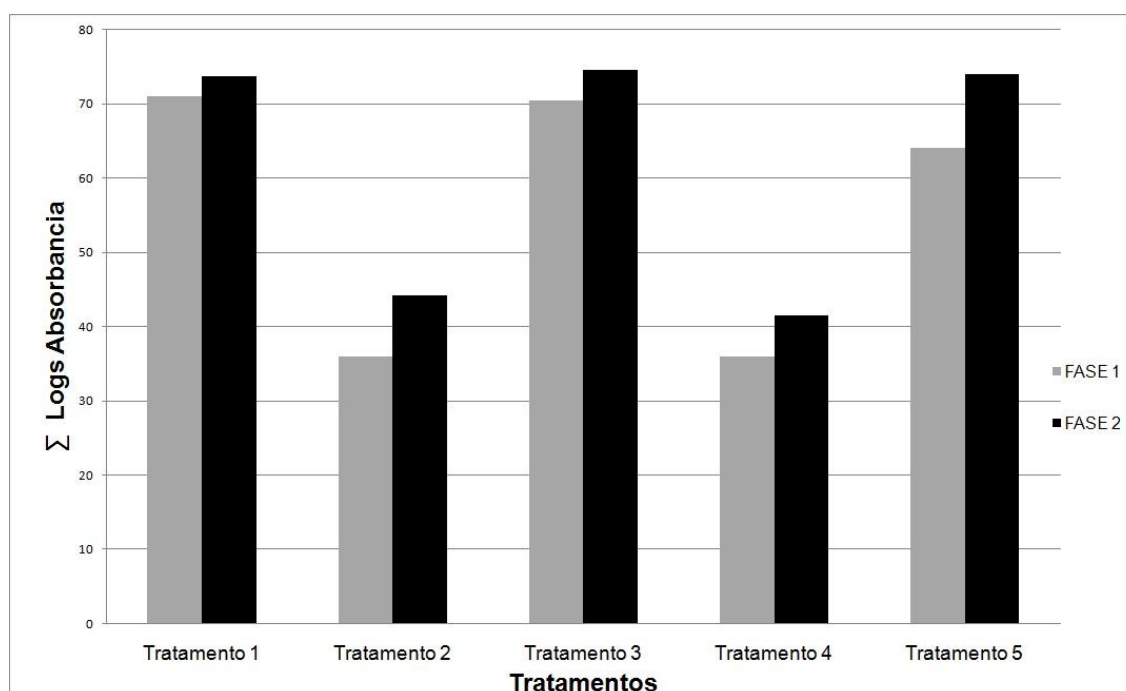


Figura 5.8 Média das somatórias dos experimentos.

Se comparado a fase 1 dos tratamentos 1, 3 e 5: sendo o tratamento 1 (filme fino + cultura + esterilização), o tratamento 3 (sem filme fino + cultura + esterilização) e o tratamento 5 (filme fino + cultura + sem esterilização), é possível notar a inibição que o filme provoca no crescimento da bactéria ao longo de um período de 24 horas. Outro fator importante a ser analisado é o efeito de inibição do

filme no tratamento 5 (filme fino + cultura + sem esterilização) ser maior que no tratamento 1 (filme fino + cultura + esterilização), acredita-se que isso se deve pelo fato de que ao esterilizar a lamínula através da flambagem, haja uma perda de radicais livres na superfície, que reagem com o oxigênio, tornando-se mais estáveis, tendo assim uma perda efetiva da ação do filme, uma vez que, como já relatado, sabe-se que o possível mecanismo de ação do TiO_2 são os radicais livres que afetam a superfície da membrana externa da bactéria, causando danos, deixando-as expostas ao meio ambiente.

Com a obtenção da média dos resultados foi possível então comparar a fase 1 (com filme fino) do experimento com a fase 2 (repetição dos tratamentos da fase 1 na ausência de filme) e classificar os tratamentos em

- ➔ Taxa de sobrevivência – com inibição: as bactérias apresentam um desenvolvimento maior em um meio sem a presença de filme, podendo representar uma diminuição do metabolismo das bactérias quando há presença do filme de TiO_2 .
- ➔ Taxa de sobrevivência – sem inibição: o desenvolvimento da bactéria é igual quando comparado a presença ou não de um filme, ou seja, as bactérias não apresentam inibição na presença do filme de TiO_2 .
- ➔ Controle de qualidade do filme fino, ou seja, se todos os cuidados durante o processo de impregnação do filme fino foram tomados, se os filmes foram realmente formados e se o processo de limpeza desses materiais foi eficiente.
- ➔ Controle de qualidade da bactéria, no momento em que a bactéria foi ativada, se não ocorreu nenhum erro de natureza humana, e/ou a avaliação da taxa de crescimento da bactéria.

- ➔ Controle de qualidade do meio, se o meio foi contaminado podendo alterar os resultados a serem obtidos.
- ➔ Filme fino bactericida, as bactérias não sobrevivem ao meio, e quando retiradas não voltam a crescer, considerando-se assim, possível eficiência do TiO_2 .
- ➔ Filme fino bacteriostático, as bactérias têm o seu crescimento interrompido pelo filme, porém quando retiradas de cima desse substrato e colocadas em outro meio livre de filme, voltam a crescer e se desenvolver.

Essa classificação foi resumida anteriormente na tabela 4.3 nos materiais e métodos.

Conclui-se então que o filme fino de TiO_2 apresenta características bacteriostáticas, pois a média do tratamento 1 (filme fino + meio de cultura) apresenta os valores estatisticamente significantes da fase 1 (com filme fino) menores que da fase 2 (sem filme fino). Outro dado importante é a comprovação da inibição da bactéria, sendo os valores obtidos para o tratamento 3 (sem filme fino + cultura + esterilização) são maiores que do tratamento 1 (filme fino + cultura + esterilização). Os outros tratamentos realizados serviram apenas de controles para análise das condições do experimento, como controle da qualidade do meio, qualidade do filme fino e a qualidade da própria cultura de bactéria utilizada.

Uma explicação para o efeito bacteriostático encontrado pode ser sugerida devido ao fato de o dióxido de titânio encontrar-se na fase rutilo, forma mais estável e por isso possuir uma menor quantidade de radicais livres disponíveis, porém, o resultado se mostra satisfatório, uma vez que, até então nenhum estudo traz informações sobre o poder de inibir o crescimento de bactérias com a fase rutilo. Já o efeito bactericida do dióxido de titânio na fase anatase é relatado em diversos

estudos que comprovam o seu efeito, embora o mecanismo de inativação da bactéria também seja parcialmente desconhecido.

Sendo a infecção hospitalar, também conhecida como infecção nosocomial (causada em muitos casos pela *Escherichia coli*), uma preocupação mundial, onde dados mostram que em média 10 % dos pacientes admitidos, adquirem uma infecção, aumentando a duração da permanência no hospital e o custo do tratamento. E ainda, destes 10 % (cerca de 2 milhões de pacientes), 20.000 morrem em decorrência dessas infecções [62]. O estudo traz grandes benefícios à sociedade, pois enquanto o uso indiscriminado de antibióticos contribui para o desenvolvimento de bactérias patogênicas mais resistentes, a ação do filme fino não aumenta essa resistência, sendo seguro e com ação efetiva, pois uma vez atacada à membrana externa de uma bactéria, a mesma se torna incapaz de se reproduzir e acaba ficando fragilizada perante condições ambientais.

6. Conclusão

O método de impregnação forçada por alta pressão e alta temperatura foi uma técnica aplicada com sucesso na fabricação de filmes finos de dióxido de titânio (TiO_2) em substrato vítreo.

Como mostrado em estudos anteriores [66], diferentemente de outros métodos existentes, nesse o TiO_2 passa a fazer parte da estrutura do substrato, fazendo com que o filme tenha a mesma vida útil que o substrato.

O TiO_2 na fase rutilo, mais estável, também mostrou-se capaz de inibir o crescimento da bactérias, assim como a fase anatase relatada em outros trabalhos. Sugere-se que o TiO_2 rutilo ataca a membrana externa da bactéria deixando a membrana interna exposta, inibindo a formação de uma nova parede, interferindo na síntese protéica, o que faz com ela seja incapaz de se reproduzir novamente, e fique exposta as condições ambientais, levando a sua morte. A diferença de comportamento é justificada devido ao elevado grau de desordem da fase anatase em relação à fase rutilo.

Foi observado um excelente desempenho do filme fino de TiO_2 contra a *Escherichia coli* Gram-negativa, podendo esses filmes finos serem utilizados como azulejos bacteriostáticos/bactericidas em hospitais, residências, cozinhas industriais, etc.

7. Sugestões para trabalhos futuros

Sendo a metodologia utilizada neste trabalho um grande diferencial na fabricação de filmes finos, e com a obtenção de resultados favoráveis para o óxido estudado, é viável a exploração desta linha de pesquisa nas mais diversas aplicações. Podendo-se sugerir os seguintes trabalhos futuros:

1. Comparação do efeito do TiO_2 com prata e ouro.
2. Testar novos óxidos e suas bioatividades
3. Substituição do substrato vítreo por outros materiais
4. Testar a eficiência do TiO_2 para outros agentes patogênicos

8 Referências

- [1] OZBEN, C.S., TEPEHAN, F.Z., GÜVEN, H.H. and TEPEHAN, G.G., Thin film thickness determination with neutron activation analysis, **Applied radiation and isotopes: including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine**, vol. 55, pp. 9-12, Jul. 2001.
- [2] ALVES, A., RONCONI, O.L., GALEMBECK, C.M., Decomposição de precursores metalorgânicos: uma técnica química de obtenção de filmes finos, **Química Nova**, vol. 25, pp. 69-77, 2002.
- [3] SAYER, M. and SREENIVAS, K., Ceramic Thin Films: Fabrication and Applications, **Science**, vol. 247, pp. 1056-1060, 1990.
- [4] CAVA S., SEQUINEL T., TEBCHERANI S.M., MICHEL M.D., LAZARO S.R. and PIANARO S.A., Microstructure of ceramic particles infiltrated into float glass surfaces by high gas pressure impregnation, **Journal of Alloys and Compounds**, vol. 484, pp. 877-881, 2009.
- [5] SKORB, E.V., Applied Catalysis B : Environmental Antibacterial activity of thin-film photocatalysts based on metal-modified TiO_2 and $\text{TiO}_2\text{: In}_2\text{O}_3$ nanocomposite, **Applied Catalysis B**, vol. 84, pp. 94-99, 2008.
- [6] JEON, H., Preparation and antibacterial effects of Ag–SiO₂ thin films by sol–gel method, **Biomaterials**, vol. 24, pp. 4921-4928, Dec. 2003.
- [7] TAGANTSEV, D.K., KARAPETYAN, G.O., LIPOVSKII, A.A., LOBODA, V.V. Formation of thick glass-ceramics films by ion-exchange. **Journal of the European Ceramic Society**, vol. 21, pp. 2015-2018, 2001.

- [8] LISNYAK, V.V., DUB, S.N., STRATIICHUK, D.A. and STUS, N.V., Nanoindentation study on viscoelasticity in cesium tungstophosphate glasses, **Materials Letters**, vol. 62, pp. 1905 – 1908, 2008.
- [9] LIU, F.A.C.L., HUANG, M.L., p-Type electrical conduction and wide optical band gap in Mg-doped CuAlS₂, **Scripta Materialia**, vol. 58, pp. 1002-1005, 2008.
- [10] KIM, M.S. and KIM, E.S., Green luminescence from Si_{1-x} C_x nanoparticles synthesized by laser annealing of Si nanoparticles and C₆₀ thin films, **Current Applied Physics**, vol. 9, p. S54-S57, 2009.
- [11] LAKSHMINARAYANA, Q., HUCHENG, G.; TENG, Y., JIANRONG, Y., Spectral Analysis of Pr³⁺, Sm³⁺ and Dy³⁺ doped transparent GeO₂-BaO-TiO₂ glass ceramics, **Journal of Luminescence** vol. 129, pp. 59-68, 2009.
- [12] KERN, P., SCHWALLER, P. and MICHLER, J., Electrolytic deposition of titania films as interference coatings on biomedical implants: Microstructure, chemistry and nano-mechanical properties, **Thin Solid Films**, vol. 494, pp. 279 – 286, 2006.
- [13] SAYILKAN, H., Improved photocatalytic activity of Sn⁴⁺-doped and undoped TiO₂ thin film coated stainless steel under UV- and VIS-irradiation, **Applied Catalysis A: General**, vol. 319, pp. 230-236, 2007.
- [14] GIROTTO, C., RAND, B.P., GENOE, J. and HEREMANS, P., Exploring spray coating as a deposition technique for the fabrication of solution-processed solar cells, **Solar Energy Materials & Solar Cells**, vol. 93, pp. 454-458, 2009.

- [15] KHALIFA, Z.S., LIN, H. and SHAH, S.I., Structural and electrochromic properties of TiO_2 thin films prepared by metallorganic chemical vapor deposition, **Thin Solid Films**, vol. 518, pp. 5457-5462, 2010.
- [16] PYUN, M.W., KIM, E.J., YOO, D.-HWANG and HAHN, S.H., Oblique angle deposition of TiO_2 thin films prepared by electron-beam evaporation, **Applied Surface Science**, vol. 257, pp. 1149-1153, 2010.
- [17] MIAO, L., Microstructure and bactericidal ability of photocatalytic TiO_2 thin films prepared by rf helicon magnetron sputtering, **Applied Surface Science**, vol. 238, pp. 125-131, Nov. 2004.
- [18] KIM, D.-JOO, KANG, J.-YI and KIM, K.-SEON, Coating of TiO_2 thin films on particles by a plasma chemical vapor deposition process, **Advanced Powder Technology**, 2009.
- [19] ZHANG, Y.A., SUETSUGU, T. and KADONO, K., Incorporation of silver into soda-lime silicate glass by a classical staining process, **Journal of Non-Crystalline Solids**, vol. 353, pp. 44-50, 2007.
- [20] GÓMEZ-POZOS, A., MALDONADO, H. and OLVERA, M.D.L., Effect of the [Al / Zn] ratio in the starting solution and deposition temperature on the physical properties of sprayed ZnO: Al thin films, **Materials Letters**, vol. 61, pp. 1460 – 1464, 2007.
- [21] AYADI, Z.B., MIR, L.E., DJESSAS, K. and ALAYA, S., Electrical and optical properties of aluminum-doped zinc oxide sputtered from an aerogel nanopowder target, **Nanotechnology**, vol. 18, p. 445702, 2007.

- [22] PARK, K., MA, D. and KIM, K.H., The physical properties of Al-doped zinc oxide films prepared by RF magnetron sputtering, **Thin Solid Films**, vol. 305, pp. 201-209, 1997.
- [23] ZIEMATH, E.C., SAGGIORO, B.Z. and FOSSA, S., Physical properties of silicate glasses doped with SnO₂, **Journal of Non-Crystalline Solids**, pp. 3870-3878, 2005.
- [24] BU, S.J., JIN, Z.G., LIU, X.X., YANG, L.R. and CHENG, Z.J., Synthesis of TiO₂ porous thin films by polyethylene glycol templating and chemistry of the process, **Journal of the European Ceramic Society**, vol. 25, pp. 673-679, 2005.
- [25] MARCIANO, F.R., LIMA-OLIVEIRA, D.A., SILVA, N.S. da, DINIZ, A.V., CORAT, E.J. and TRAVA-AIROLDI V.J., Antibacterial activity of DLC films containing TiO₂ nanoparticles, **Journal of Colloid And Interface Science**, vol. 340, pp. 87-92, 2009.
- [26] WU, D., LONG, M., ZHOU, J., CAI, W., ZHU, X., CHEN, C. and WU, Y., Synthesis and characterization of self-cleaning cotton fabrics modified by TiO₂ through a facile approach, **Surface & Coatings Technology**, vol. 203, pp. 3728-3733, 2009.
- [27] BU, S., JIN, Z., LIU, X., YANG, L. and CHENG, Z., Fabrication of TiO₂ porous thin films using peg templates and chemistry of the process, **Materials Chemistry and Physics**, vol. 88, pp. 273-279, 2004.

- [28] YU, J.C., YU, J. and ZHAO, J., Enhanced photocatalytic activity of mesoporous and ordinary TiO₂ thin films by sulfuric acid treatment, **Applied Catalysis B: Environmental**, vol. 36, pp. 31-43, 2002.
- [29] GEBEYEHU, D., BRABEC, C.J. and SARICIFTCI, N.S., Solid-state organicyinorganic hybrid solar cells based on conjugated polymers and dye-sensitized TiO₂ electrodes, **Thin Solid Films**, vol. 403-404, pp. 271-274, 2002.
- [30] STAMATE, M.D., Dielectric properties of TiO₂ thin films deposited by a DC magnetron sputtering system, **Thin Solid Films**, pp. 246-249, 2000.
- [31] DINH, N.N., OANH, N.T.T., LONG, P.D., BERNARD, M.C. and LE GOFF, A.H., Electrochromic properties of TiO₂ anatase thin films prepared by a dipping sol – gel method, **Thin Solid Films**, vol. 423, pp. 70-76, 2003.
- [32] FRETWELL, R. and DOUGLAS, P., An active , robust and transparent nanocrystalline anatase TiO₂ thin film — preparation , characterisation and the kinetics of photodegradation of model pollutants, **Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, vol. 143, pp. 229-240, 2001.
- [33] KALE, S.S., MANE, R.S., GANESH, T., PAWAR, B.N. and HAN, S.-HWAN, Multiple band gap energy layered electrode for photoelectrochemical cells, **Current Applied Physics**, vol. 9, pp. 384-389, 2009.
- [34] LEE, B.-KUK and KIM J.-JOO, Enhanced efficiency of dye-sensitized solar cells by UV – O₃ treatment of TiO₂ layer, **Current Applied Physics**, vol. 9, pp. 404-408, 2009.

- [35] KANTHA, P., PENGPAT, K., JARUPOOM, P., INTATHA, U., RUJIJANAGUL, G. and TUNKASIRI, T., Phase formation and electrical properties of BNLT – BZT lead-free piezoelectric ceramic system, **Current Applied Physics**, vol. 9, pp. 460-466, 2009.
- [36] ALLEN, N., EDGE, M., VERRAN, J., STRATTON, J., MALTBY, J. and BYGOTT, C., Photocatalytic titania based surfaces: Environmental benefits, **Polymer Degradation and Stability**, vol. 93, pp. 1632-1646, 2008.
- [37] CAVALCANTE, P.M.T., DONDI, M., GUARINI, G., RAIMONDO, M. and BALDI, G., Colour performance of ceramic nano-pigments, **Dyes and Pigments**, vol. 80, pp. 226-232, 2009.
- [38] YOON, K., NOH, J., KWON, C. and MUHAMMED, M., Photocatalytic behavior of TiO₂ thin films prepared by sol – gel process, **Materials Chemistry and Physics**, vol. 95, pp. 79-83, 2006.
- [39] ALLEN, N.S., EDGE, M., SANDOVAL, G., VERRAN, J., STRATTON, J. and MALTBY, J., Photocatalytic Coatings for Environmental Applications, **Photochemistry and Photobiology**, pp. 279-290, 2005.
- [40] IBANEZ, J., Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ on Enterobacter cloacae Comparative study with other Gram (-) bacteria, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, vol. 157, pp. 81-85, 2003.
- [41] KOSEKI, H., SHIRAISHI, K., TSURUMOTO, T. et al., Bactericidal performance of photocatalytic titanium dioxide particle mixture under ultraviolet and fluorescent light: an in vitro study **Surface and Interface Analysis**. vol 41, pp- 771-774, 2009.

- [42] VACAROIU, C., ENACHE, M., GARTNER, M., et al., The effect of thermal treatment on antibacterial properties of nanostructured TiO₂(N) films illuminated with visible light . **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, vol 25, pp. 27-31, 2009
- [43] DELGADO, C., GÓMEZ, F.G., MORALES, K.V., Titanium dioxide nanocrystalline bactericidal thin films grown by sol – gel technique, **Microelectronics Journal**, vol. 39, pp. 1333-1335, 2008.
- [44] MATSUNAGA, T., NAMBA, Y. and NAKAJIMA, T., Electrochemical sterilization of microbial cells, **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, vol. 174, pp. 393-400, 1984.
- [45] CHO, M., CHUNG, H., CHOI, W. and YOON, J., Linear correlation between inactivation of E. coli and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection., **Water research**, vol. 38, pp. 1069-77, 2004.
- [46] MANESS, P.-CHING, SMOLINSKI, S., BLAKE, D.M., HUANG, Z., WOLFRUM, E.J. and JACOBY, W.A., Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO₂ Reaction : toward an Understanding of Its Killing Mechanism, **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 65, pp. 4094-4098, 1999.
- [47] CHUNG, C.-JEN, LIN, H.I, CHOU, C.-MAN, HSIEH, P.-YEN and HSIAO, C.-HUNG, Surface & Coatings Technology Inactivation of Staphylococcus aureus and Escherichia coli under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film, **Surface & Coatings Technology**, vol. 203, pp. 1081-1085, 2009.

- [48] CORDEIRO A.C de S., LEITE, S.G.F. and DEZOTTI,M., Inativação por oxidação fotocatalítica de Escherichia Coli E Pseudomonas sp., **Química Nova**, vol. 27, pp. 689-694, 2004.
- [49] KIKUCHI, Y., SUNADA, K., IYODA, T., HASHIMOTO, K. and FUJISHIMA, A., Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, vol. 106, pp. 51-56, 1997.
- [50] DUNLOP, P., The photocatalytic removal of bacterial pollutants from drinking water, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, vol. 148, pp. 355-363, 2002.
- [51] HANEDA, R., IKEGAMI, R., FORTULAN, C., PURQUERIO, B., LONGO, E. and FONTES S., Microfiltration with chemistry treating of commercial membranes and microporous tubes for retention of bacteria E. coli on processing of wastewater of dairy products, **Desalination**, vol. 200, pp. 313-315, 2006.
- [52] SUNADA, K., WATANABE, T. and HASHIMOTO, K., Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film, **Photochemistry and Photobiology A: chemistry**, vol. 156, pp. 227-233, 2003.
- [53] AKHAVAN, O. and GHADERI, E., Bactericidal effects of Ag nanoparticles immobilized on surface of SiO₂ thin film with high concentration, **Current Applied Physics**, vol. 9, pp. 1381-1385, 2009.

- [54] MA, N., FAN, X., QUAN, X. and ZHANG, Y., Ag–TiO₂/HAP/Al₂O₃ bioceramic composite membrane: Fabrication, characterization and bactericidal activity, **Journal of Membrane Science**, vol. 336, pp. 109-117, 2009.
- [55] YANG, C., LIANG, G.L., XU, K.M., GAO, P. and XU, B., Bactericidal functionalization of wrinkle-free fabrics via covalently bonding TiO₂-Ag nanoconjugates, **Journal of Materials Science**, vol. 44, pp. 1894-1901, 2009.
- [56] AKHAVAN, O., Lasting antibacterial activities of Ag-TiO₂/Ag/a-TiO₂ nanocomposite thin film photocatalysts under solar light irradiation, **Journal of colloid and interface science**, vol. 336, pp. 117-24, 2009.
- [57] APPLEROT, G., PERKAS, N., AMIRIAN, G., GIRSHEVITZ, O. and GEDANKEN, A., Coating of glass with ZnO via ultrasonic irradiation and a study of its antibacterial properties, **Applied Surface Science**, vol. 256, pp. S3-S8, 2009.
- [58] MOSNIER, J.-P., O'HAIRE, R.J., MCGLYNN, E., HENRY, M.O., MCDONNELL, S.J., BOYLE, M. A, and MCGUIGAN, K.G., ZnO films grown by pulsed-laser deposition on soda lime glass substrates for the ultraviolet inactivation of Staphylococcus epidermidis biofilms, **Science and Technology of Advanced Materials**, vol. 10, pp. 045003, 2009.
- [59] PELCZAR, J.R.. **Microbiologia**, vol. I, 2ª edição - São Paulo: Makron Books, 1996.
- [60] PURVES, W. K., SADAVA, D., ORIAN, G. H. e HELLER, H. C. **Vida: a ciência da biologia** – 6ª Ed – Porto Alegre: Artmed, pp 461-465, 2002.

- [61] MURRAY, P.R., **Microbiologia Médica**. 4^a ed.: Elsevier, 2004
- [62] BLACK, J.G., **Microbiologia: Fundamentos e Perspectivas**, - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp 129-132, 2002.
- [63] KARAPETYAN, G. O., LOBODA, V. V., TAGANTSEV, D. K. Glass crystallization by ion exchange: formation of NaNbO in thick films at the glass surface. **Journal of Non-Crystalline Solids**, vol. 283, issue 1-3, pp.114–118, 2001.
- [64] ANDRADE, R. M., CAVA, S., SILVA, S. N., SOLEDADE, L. E. B., ROSSI, C. C., LEITE, E. R., PASKOCIMAS, C. A., VARELA, J. A., LONGO, E. Foundry sand recycling in the troughs of blast furnaces: a technical note. **Journal of Materials Processing Technology**, vol. 159, n° 1, pp. 125–134, 2005.
- [65] PATTERSON, A. L. The Scherrer formula for X-Ray particle size determination. **Physical Review**, vol. 56, pp. 978-982, 1939.
- [66] Sequinel, T. **Determinação das propriedades mecânicas e caracterização de Filme fino produzido por impregnação forçada**, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Materiais) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
- [67] Shirley Owens, Center for Electron Optics, MSU, 1996