



Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Curso Bacharelado em Química
Departamento de Química – DAQUI



CARLISE HANNEL FERREIRA

**INATIVAÇÃO DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* USANDO
FILMES DE TiO_2 CRESCIDOS ELETROQUIMICAMENTE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2016

CARLISE HANNEL FERREIRA

**INATIVAÇÃO DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* USANDO
FILMES DE TiO₂ CRESCIDOS ELETROQUIMICAMENTE**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado ao Departamento de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Pato Branco - como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Mariana de Souza Sikora

Co-orientadora: Dra. Vidiany Aparecida Queiroz Santos

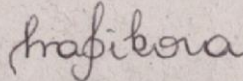
PATO BRANCO

2016

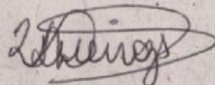
TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Inativação da Staphylococcus aureus usando filmes de TiO2 crescidos eletroquimicamente**, foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° 10.2.2016-B de 2016.

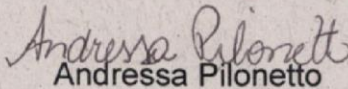
Fizeram parte da banca os professores.



Mariana de Souza Sikora



Vidiany Aparecida Queiroz Santos



Andressa Pilonetto

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a professora doutora Mariana de Souza Sikora, por ter me ensinado e por acreditar em mim e no nosso projeto, sendo sempre muito atenciosa e disposta a ajudar e retirar quaisquer dúvidas, e a doutora Vidiany Aparecida Queiroz Santos, por ter me co-orientado e me ensinado a parte prática do processo.

Aos meus pais Jusselene e Carlos e ao meu irmão Matheus e a toda família que me apoiaram todos esses anos e não me deixaram desanimar nas dificuldades dessa caminhada. Ao meu namorado João Augusto que acreditou em mim, e em nós passando grande parte dessa caminhada comigo.

Aos meus amigos que fiz durante essa caminhada, e aos que já faziam parte dela. Ao meu amigo Elthon Ferreira Passos que me acompanhou em grande parte desse caminhada e que me mostrou que a pesquisa pode ser divertida quando se tem alguém que nos ajude. A minha amiga Michelli Mandelli que esteve comigo até o final sempre me apoiando e me puxando a orelha quando estava desanimada e cansada.

E por fim, a Universidade Tecnológica do Federal do Paraná e ao departamento de química por ter me dado a oportunidade de aprender, e aos Mestres que me passaram seus conhecimentos. Um muito obrigada a todos que fizeram parte dessa jornada.

RESUMO

FERREIRA, Carlise Hannel. Inativação da *Staphylococcus aureus* usando filmes de TiO₂ crescidos eletroquimicamente. 2016. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

A fotocatalise é uma técnica vantajosa na descontaminação química e biológica de efluentes, e sua utilização vem crescendo constantemente nas últimas décadas. Em um processo fotocatalítico, utiliza-se além da fonte de irradiação luminosa, um catalisador capaz de gerar um par de portadores elétron/lacuna. Tais portadores são responsáveis pela degradação de compostos químicos como fármacos e corantes e pela inativação de bactérias patogênicas. Um dos fotocatalisadores mais utilizados é o dióxido de titânio (TiO₂), pois apresenta características como inércia, estabilidade química e baixa solubilidade além da alta capacidade de modulação do material formado (pó, filmes porosos, filmes nanotubulares, etc). No presente trabalho investigou-se a influência das propriedades morfológicas e microestruturais de filmes de TiO₂, na fotoativação de *Staphylococcus aureus*. Os filmes foram sintetizados por meio da técnica *plasma electrolytic oxidation* (PEO), variando a temperatura, a densidade de corrente e a concentração do eletrólito (H₃PO₄). As amostras foram quantificadas em relação ao diâmetro de poro, por meio de microscopia eletrônica de varredura utilizando o software *ImageJ*. O tamanho do cristalito dos filmes sintetizados foi obtido pela aplicação da equação de Scherrer aos dados extraídos dos difratogramas. Os resultados mostraram que há influência de ambos os parâmetros na eficiência fotocatalítica do processo de inativação da bactéria. Observou-se que a eficiência é maior para filmes com diâmetros de poro maiores que 0,2 µm, os quais permitem a entrada do microrganismo na estrutura porosa do filme. Além disso, observou-se que a eficiência é diretamente proporcional ao tamanho de cristalito, fato este explicado pela diminuição de centros de recombinação de pares elétron/lacuna, o que promove o aumento da eficiência do processo de inativação da *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: Fotocatalise, microrganismos, Dióxido de Titânio.

ABSTRACT

FERREIRA, Carlise Hannel. Inactivation of *Staphylococcus aureus* using TiO₂ films grown electrochemically. 2016. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2016.

The photocatalysis is an advantageous technique in chemical and biological decontamination of effluents and their use has been growing steadily in recent decades. In a photocatalytic process, it is used beyond the light irradiation source, a catalyst capable of generating a pair of electron carriers /gap. These carriers are responsible for the degradation of chemical compounds as pharmaceuticals and dyes, and the inactivation of pathogenic bacteria. One of the most commonly used photocatalyst is TiO₂ due to its characteristics as chemical inertness and stability, low solubility besides the high modulation capability of formed material (powder, porous films, nanotubulars movies, etc.). In the present study we investigated the influence of morphological and microstructural properties of TiO₂ films in photoinactivation bacteria *Staphylococcus aureus*. The films were synthesized by the technique plasma electrolytic oxidation (PEO) varying the temperature, current density and concentration of the electrolyte (H₃PO₄). The samples were quantified in relation to the pore diameter through the treatment of images of scanning electron microscopy using *ImageJ* software. The crystallite size of the synthesized films was obtained by applying the Scherrer equation to difratograms extracted from the XRD. The results show that there is an influence of both parameters on the photocatalytic efficiency of the bacterial inactivation process. It was observed that the efficiency is higher for films with pore diameters larger than 0,2 micrometres which allow the entry of the microorganism in the pore structure of the film. Furthermore, it was observed that the efficiency is directly proportional to crystallite size, and this was explained by the decrease of pairs of recombination centers electron/gap, which promotes increased efficiency of inactivation of *Staphylococcus aureus* process.

Keywords: Photocatalysis, Microorganisms, Titanium Dioxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura morfológica da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figura 2 - Estrutura celular de uma bactéria Gram-Positiva.....	15
Figura 3 - Processo de fotólise.....	17
Figura 4 -Processo de fotocatálise	19
Figura 5 - Estrutura cristalina do TiO ₂ nas três formas diferentes (a) anatase (b) brookita (c) rutilo.	22
Figura 6 - Reator utilizado para a inativação da bactéria <i>S. aureus</i>	26
Figura 7 – Micrografias das amostras obtidas de acordo com as condições descritas na Tabela 1	28
Figura 8 - Difractogramas dos filmes de TiO ₂ sintetizados por PEO de acordo com as condições experimentais apresentadas na Tabela 1.....	29
Figura 9 - Curva da fotólise e do controle no escuro demonstrando o perfil de crescimento/inativação de <i>S. aureus</i> em função do tempo de reação.	31
Figura 10 – Contagens de UFC de <i>S. aureus</i> observadas para a curva controle no escuro, durante os 120 min de reação.	31
Figura 11 - Contagens de UFC de <i>S. aureus</i> observadas para a curva controle por fotólise, durante os 120 min de reação.....	32

Figura 12- Curvas de inativação de <i>S. aureus</i>	34
Figura 13 – Contagens de UFC referentes à inativação de <i>S aureus</i> durante os 120 min de reação fotocatalítica, utilizando os diferentes filmes de TiO ₂ sintetizados.	35
Figura 14 - Influência do Diâmetro de poro na constante de velocidade..	37
Figura 15 - Influência do diâmetro de poro na fotoatividade dos filmes sintetizados.	38
Figura 16 - Parâmetros do difratograma utilizados na equação de Scherrer e seu significado.....	40
Figura 17 - Influência do Tamanho do Cristalito na constante de velocidade.	41
Figura 18 - Influência do tamanho do cristalito dos filmes sintetizados na eficiência do processo fotocatalítico de inativação de <i>S. aureus</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros utilizados para a síntese dos filmes de TiO₂ 23

Tabela 2: Parâmetros cinéticos, microestruturais e morfológicos das amostras..... 36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVOS GERAIS	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	14
3.2 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS	16
3.3 PROCESSO HOMOGÊNEO - FOTÓLISE	17
3.4 PROCESSO HETEROGÊNEO - FOTOCATÁLISE.....	18
3.5 SEMICONDUTORES.....	20
3.6 DIÓXIDO DE TITÂNIO	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 FILMES DE TiO ₂ CRESCIDOS EM MEIO DE ÁCIDO FOSFÓRICO .	23
4.2 ESTUDO DA INATIVAÇÃO DA BACTÉRIA S. AUREUS.....	23
4.2.1 PRÉ-CULTIVO DA CEPA	24
4.2.2 ENSAIOS FOTOCATALÍTICOS.....	24
4.3.3 FLUXOGRAMA DO PROCESSO	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 CARACTERIZAÇÃO	27
5.2 ATIVIDADE FOTOCATALÍTICA.....	29
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44

1 INTRODUÇÃO

O problema da contaminação de recursos hídricos devido à falta de tratamento adequado em esgotos domésticos e industriais, áreas agrícolas contaminadas com agrotóxicos e principalmente com microrganismos patogênicos, é recorrente tanto nos países desenvolvidos como nos subdesenvolvidos. O consumo dessa água pode levar a problemas de saúde, como por exemplo, os relacionados a doenças gastrointestinais (SILVA; ARAÚJO, 2003). Como forma de minimizar esses problemas, diferentes metodologias para tratamento de efluentes vêm sendo estudadas. Dentre estas destaca-se o processo de fotocatalise.

A fotocatalise pertence a uma classe de processos conhecidos como Processos Oxidativos Avançados (POA's), e é basicamente relacionada com a absorção de luz por um material semicondutor, promovendo a geração de pares elétron/lacuna, devido à transição do elétron da banda de valência para a banda de condução, gerando assim espécies radicalares como O_2^\bullet , HO_2^\bullet , $\bullet OH$ na superfície do semicondutor. Estas espécies radicalares são bastantes reativas e pouco seletivas (TEIXEIRA; JARDIM, 2004), e no contexto microbiológico ela atua sobre a membrana plasmática do microrganismo, levando-o à morte (ROGUSKA et al., 2014).

O radical hidroxila ($\bullet OH$), tornou-se o foco de muitas pesquisas sobre a oxidação química de compostos orgânicos (IRELAND et al., 1993). Dessa forma, o processo fotocatalítico tem se mostrado uma técnica promissora na inativação de microrganismos devido à facilidade na implementação do processo (CORDEIRO; LEITE; DEZOTTI, 2004). Pode

ser utilizado para a degradação de diversas bactérias como *E.coli*, *S. aureus*, *S epidermidis*, entre outras (YU et al., 2011).

A fotocatalise dos microrganismos é promovida pela incidência de luz na presença de um fotocatalisador. Dente os materiais estudados, o TiO_2 é o mais utilizado em fotocatalise, principalmente devido à alta atividade fotocatalítica e estabilidade química. Tais características o torna promissor na eliminação de microrganismos em muitas aplicações, como por exemplo, no revestimento antibacteriano (ROGUSKA et al., 2014).

No presente trabalho, foi estudada a degradação fotocatalítica da bactéria *S. aureus*, utilizando filmes de TiO_2 previamente crescidos por *plasma electrolytic oxidation* (PEO). A atividade fotocatalítica dos filmes foi avaliada através do processo de inativação da bactéria e posteriormente, a fotoatividade dos materiais sintetizados foi correlacionada com propriedades morfológicas, como diâmetro de poros, bem como com propriedades microestruturais, como tamanho de cristalito.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo principal a inativação da bactéria *Staphylococcus aureus*, correlacionando a fotoatividade com as propriedades morfológicas e microestruturais de filmes de TiO₂, crescidos por PEO.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a cinética de inativação de *Staphylococcus aureus* utilizando luz ultravioleta;
- Calcular as constantes de velocidades a partir da ordem da reação;
- Calcular a eficiência do processo de inativação do microrganismo;
- Correlacionar a atividade fotocatalítica dos filmes de TiO₂ com suas propriedades morfológicas e microestruturais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

As bactérias são organismos simples, pois são compostos de uma única célula, sendo classificadas como procariontes. Dentre elas, o *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias causadoras de diversas doenças, sendo considerada um sério problema para a saúde pública pelos órgãos de saúde (CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011).

O *Staphylococcus aureus* é um microrganismo Gram positivo, do gênero *Staphylococcus* e da família Micrococcaceae. São classificadas como aeróbios ou anaeróbios facultativos, que se reproduzem tanto na presença como na ausência de oxigênio (MADIGAN et al., 2006). Como apresentado na Figura 1, apresenta morfologia esférica e formam agrupamentos celulares semelhantes à cachos de uvas, que tem aproximadamente um diâmetro de 0,2 a 1,5 μm (TAVARES, 2000).

São imóveis, não esporulados e geralmente são encapsulados (CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011). *S. aureus* possui parede celular espessa, constituída de peptídioglicano e membrana plasmática composta de fosfolípídeos, como representado na Figura 2.



Figura 1 - Estrutura morfológica da bactéria *Staphylococcus aureus*

Fonte: www.institutododelta.com.br

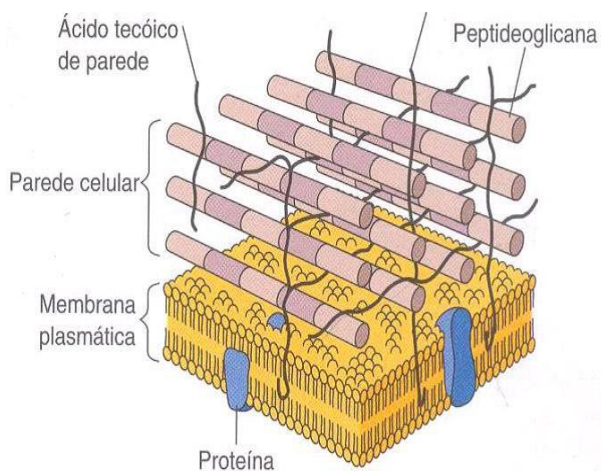


Figura 2 - Estrutura celular de uma bactéria Gram-Positiva

Fonte: <http://pt-br.aia1317.wikia.com/wiki/Colora>

S. aureus são geralmente encontrados nas fossas nasais e são responsáveis pelo desenvolvimento de doenças comunitárias e infecções hospitalares, que podem ser infecções simples ou até mesmo infecções

mais severas. Durante seu desenvolvimento e colonização do tecido, a bactéria *S. aureus* libera compostos tóxicos, como as esfoliatinas, que são levadas pela corrente sanguínea para todo corpo (CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011). Uma das formas de se eliminar esses microrganismos é por fotocatálise, neste processo pode-se utilizar o dióxido de titânio como catalisador. As características deste material serão apresentadas na próxima seção.

3.2 PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS

Os POA's são um conjunto de métodos utilizados para degradar substâncias orgânicas à substâncias menores como, por exemplo, moléculas de dióxido de carbono CO_2 e água. As moléculas formadas por este processo, geralmente não são tóxicas (LOPES; DANIEL, 2004). O POA consiste em gerar radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) livres, que tem caráter altamente oxidativo, e são formados principalmente pela presença de O_3 e H_2O_2 no meio reacional, sendo utilizado ou não um catalisador. O rompimento das ligações acontece devido à interação desses radicais com compostos orgânicos (TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

Os catalisadores dentro de uma reação têm a função de aumentar a velocidade da reação e conseqüentemente diminuir sua energia de ativação. No caso dos fotocatalisadores, são materiais que catalisam uma determinada reação na presença de luz. Esses materiais catalisadores podem se apresentar em uma fase diferente dos outros componentes da reação (processo heterogêneo). Quando o catalisador se encontra na

mesma fase do meio reacional o processo é dito homogêneo (TEIXEIRA; JARDIM, 2004).

3.3 PROCESSO HOMOGÊNEO - FOTÓLISE

A fotólise é um processo onde moléculas orgânicas são degradadas pela incidência da luz ultravioleta. Com a radiação da luz as ligações químicas são rompidas e há a formação de radicais livres, como é demonstrado na Figura 4.

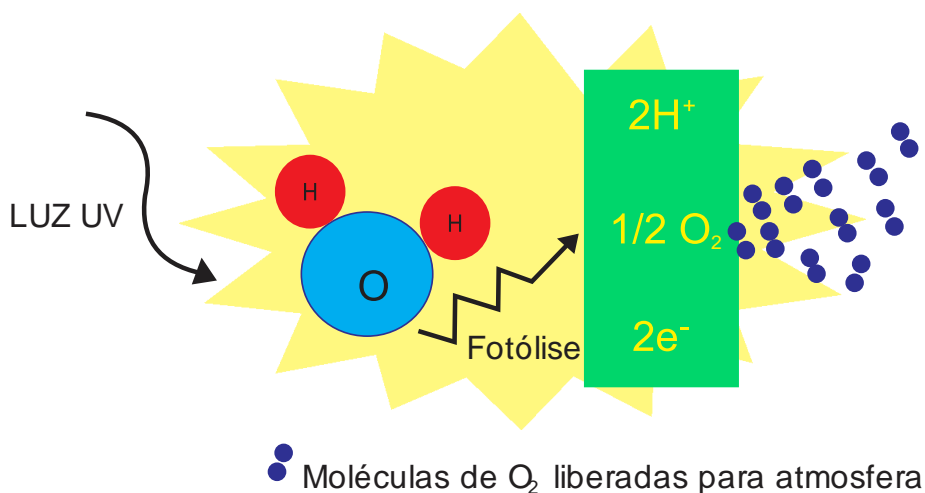


Figura 3 - Processo de fotólise

Fonte: Adaptado de <http://www.biorede.pt/resources>

Em alguns casos, esse processo pode ser considerado mais lento quando comparado a velocidade de um processo de fotocatalise (TEIXEIRA; JARDIM, 2004). É importante ressaltar, que o processo de fotólise ocorre paralelamente ao processo de fotocatalise, já que este depende somente de espécies de H_2O e íons OH^- presentes no meio reacional.

3.4 PROCESSO HETEROGÊNEO - FOTOCATÁLISE

A fotocatalise tem sua origem na década de 70, quando Honda e Fujishima (FUJISHIMA; HONDA, 1972), começaram a pesquisar células eletrolíticas para a produção de um combustível proveniente de materiais de baixo custo. Sendo assim eles descreveram a oxidação da água em suspensão de TiO_2 , tendo como produto a formação de H_2 e O_2 (NOGUEIRA; JARDIM, 1998).

O princípio básico da fotocatalise está apresentado na Figura 4, e envolve a ativação de um semicondutor, no caso o TiO_2 , por luz branca ou luz ultravioleta, sendo o segundo tipo, mais eficaz devido a morfologia do dióxido de titânio ser capaz de absorver melhor esse tipo de irradiação (ŠTENGL et al., 2007).

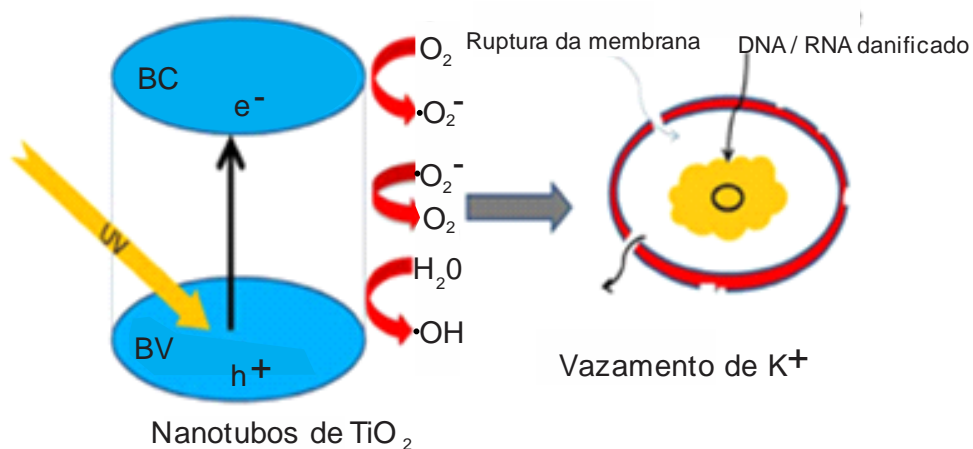
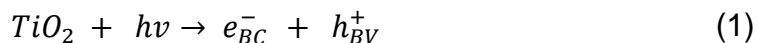


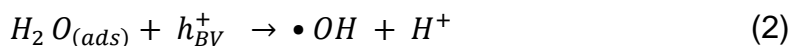
Figura 4 -Processo de fotocatalíse

Fonte: Adaptado de (PODPORSKA-CARROLL et al., 2015)

O TiO₂ possui um *bandgap* de aproximadamente 3,2 eV. A absorção de um fóton com energia superior a esse *bandgap* promove um elétron que se encontra na BV para a BC, formando assim espaços, denominados lacunas (h⁺), como pode ser visualizado na equação 1.



As lacunas formadas reagem com OH⁻ e com H₂O que estão adsorvidos na superfície do semicondutor TiO₂ e geram os radicais •OH. Os elétrons fotogerados reagem com as moléculas de O₂ e produzem radicais •O₂⁻, como pode-se ver nas equações 2, 3 e 4.





Os radicais formados no processo de fotocatalise utilizando o TiO_2 como semicondutor quando irradiado com uma radiação eletromagnética UV, apresentado nas reações a cima (Equação 2,3,4), são os responsáveis pelo rompimento da membrana plasmática do microrganismo, fazendo então com que não ocorra a proliferação do mesmo.

3.5 SEMICONDUTORES

Materiais semicondutores são quase sempre sólidos e cristalinos, e possuem condutividade elétrica interposta a materiais condutores e isolantes. O aumento da temperatura faz com que as ligações químicas sejam rompidas, proporcionando a excitação dos elétrons da banda de valência, que passam para a banda de condução formando lacunas. As lacunas são de extrema importância no processo de fotocatalise, pois são os portadores responsáveis pela geração de radicais hidroxila (TEIXEIRA; JARDIM, 2004). A geração de lacunas depende da diferença de energia entre a banda de valência e a banda de condução (*bandgap*) do semicondutor (VAN VLACK, 1998).

Os materiais semicondutores podem ser classificados como intrínsecos ou extrínsecos. Os intrínsecos são materiais que possuem comportamento elétrico diretamente relacionado à ausência de impurezas, sendo assim é um material puro (VAN VLACK, 1998). Neste tipo de

semicondutor a concentração de portadores de carga positiva é igual a concentração de portadores de carga negativa.

Para os semicondutores extrínsecos, uma propriedade relacionada é a dopagem, onde se se refere a adição de cristais ou pequenas impurezas ao material. No caso do TiO_2 , mesmo na forma pura, a quantidade de portadores positivos é diferente da quantidade de portadores negativos, fazendo com que este material apresente excesso de portadores negativos. Devido à esta característica, o TiO_2 é conhecido como um semicondutor tipo “n” (CARP; HUISMAN; RELLER, 2004).

3.6 DIÓXIDO DE TITÂNIO

O dióxido de titânio é o óxido natural de titânio com fórmula química TiO_2 . Esse composto é um sólido cristalino quimicamente estável, anfótero, com comportamento tanto ácido como básico. Como apresentado na Figura 5, o TiO_2 é um sólido polimorfo, pois apresenta três formas cristalinas, a anatase com geometria tetragonal, a brookita (ortorrômbica) e o rutilo (tetragonal). A primeira e a última, são as duas formas que são ativas para a fotodegradação pois apresentam absorção de luz na região do ultravioleta, tornando essa material um ótimo fotocatalisador (ŠTENGL et al., 2007).

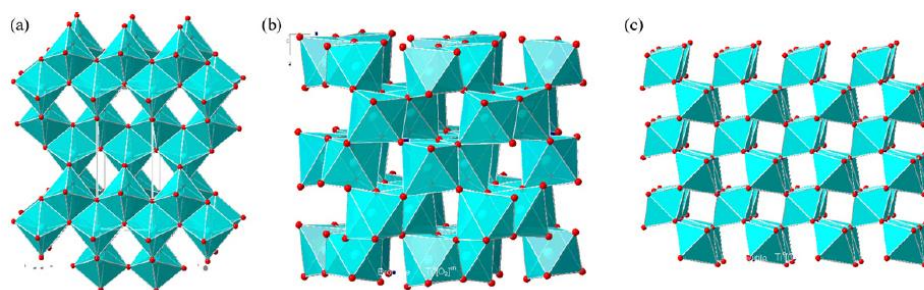


Figura 5 - Estrutura cristalina do TiO₂ nas três formas diferentes (a) anatase (b) brookita (c) rutilo.

Fonte: (ŠTENGL et al., 2007)

O TiO₂ é encontrado em larga escala na crosta terrestre, tornando-se assim um produto viável economicamente. Além disso, por ser um composto atóxico e com baixa solubilidade, o TiO₂ vem sendo utilizado para estudos sobre tratamento de efluentes industriais. Isso acontece devido à capacidade desse óxido em destruir a parede celular de microrganismos, causando a morte celular e conseqüentemente a diminuição destes no meio em questão (IRELAND et al., 1993).

Como o TiO₂ é um material semicondutor, a absorção de fótons com energia superior ao seu *bandgap*, que é o espaço entre a banda de valência (BV) e banda de condução (BC), promove um elétron da BV para a BC, formando portadores tipo lacunas (h⁺) na BV e portadores tipo elétrons (e⁻) na BC. Esta característica torna o dióxido de titânio um fotocatalisador (PODPORSKA-CARROLL et al., 2015). Tal processo vem sendo estudado desde 1972, quando os pesquisadores Honda e Fujishima (FUJISHIMA; HONDA, 1972) com o intuito de produzir combustíveis mais baratos, utilizaram células fotoquímicas para transformar energia solar em energia química e estudaram a oxidação da água nessas células para a produção de H₂ e O₂ (NOGUEIRA; JARDIM, 1998).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FILMES DE TiO₂ CRESCIDOS EM MEIO DE ÁCIDO FOSFÓRICO

Os filmes utilizados no presente trabalho foram sintetizados previamente por (SIKORA, 2011), onde foram avaliados os seguintes parâmetros de síntese: densidade de corrente, temperatura e concentração de H₃PO₄ que foi utilizado como eletrólito. As condições experimentais de síntese de cada filme estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros utilizados para a síntese dos filmes de TiO₂

Filmes	Densidade de corrente (j) (mA cm ²)	Temperatura (°C)	Concentração de H ₃ PO ₄ (mol L ⁻¹)
F1010005	10	10	0,05
F2010005	20	10	0,05
F1020005	10	20	0,05
F2020005	20	20	0,05
F101005	10	10	0,5
F201005	20	10	0,5
F102005	10	20	0,5
F202005	20	20	0,5

Fonte: Sikora (2011)

4.2 ESTUDO DA INATIVAÇÃO DA BACTÉRIA *S. AUREUS*

4.2.1 PRÉ-CULTIVO DA CEPA

Para o cultivo da cepa, foi utilizado uma cepa padrão de *S.aureus* com ATCC 25923, onde se trabalhou com o microrganismo puro. Com essa cepa padrão foram feitos repiques para se utilizar no decorrer do estudo. Para o repique foi pego uma alçada de células do microrganismos puro e foi transferido para placas devidamente esterilizadas e com o meio já solidificados de Brain Heart Infusion Broth (BHI) da marca Acumedia mais o ágar-ágar da Merck. Foram feitas estrias nas placas e deixadas em esfufa bacteriológica a 37 °C *overnight*.

4.2.2 ENSAIOS FOTOCATALÍTICOS

Para os ensaios fotocatalíticos, a bactéria *S. aureus* ATCC 25923 que foi utilizada foi a do pré cultivo descrita a cima, onde foi reativada em caldo BHI, preparado conforme as instruções do fabricante (37 g/L), e incubado a 37 °C *overnight*. Em seguida, o caldo foi centrifugado a 2500 rpm por 20 min e a massa celular foi ressuspendida em solução salina 0,9%. A padronização do microrganismo foi feita utilizando escala de Mc Farland 0,5, onde foram adicionados em tubos de ensaio, 9,95 mL de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) (1%) e 0,05 mL de Cloreto de Bário (BaCl₂) (1%), onde a

quantidade de BaCl₂ colocada em solução de H₂SO₄ provoca a turvação da solução, onde medindo em UV-Vis em 600 nm obtendo-se uma absorbância de 0,113, o que corresponde a 10⁸ UFC/mL do microrganismo no início do processo.

No reator fotoquímico, como descrito na Figura 6, foram diluídos 20 mL da suspensão microbiana em 200 mL de Caldo BHI, atingindo concentração celular final no reator de 10⁶ UFC/mL. O reator fotocatalítico foi mantido sob agitação constante durante 2 horas de reação, para todos os ensaios realizados, tanto para fotólise, controle e para os filmes da Tabela 1.

Para a inativação das bactérias, utilizou-se uma lâmpada de luz UV com comprimento de onda de 257 nm e intensidade de 116 $\mu\text{W cm}^{-2}$. Foram retiradas alíquotas de 1 mL, em intervalos de 20 minutos, durante 2 horas de reação. Em seguida, foram feitas diluições seriadas e então foram retirados 100 μL (das diluições selecionadas) para serem plaqueados pelo método *spread plate* (método de superfície) em ágar BHI. O plaqueamento de todas as alíquotas foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, em temperatura de 37 °C por 24 horas e posteriormente, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados foram expressos em UFC/mL de bactérias.

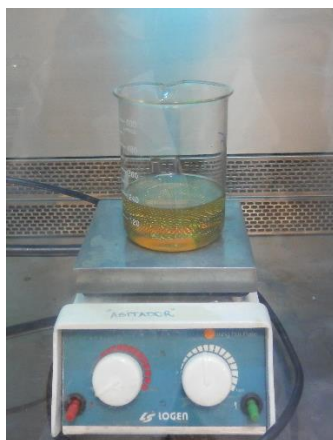
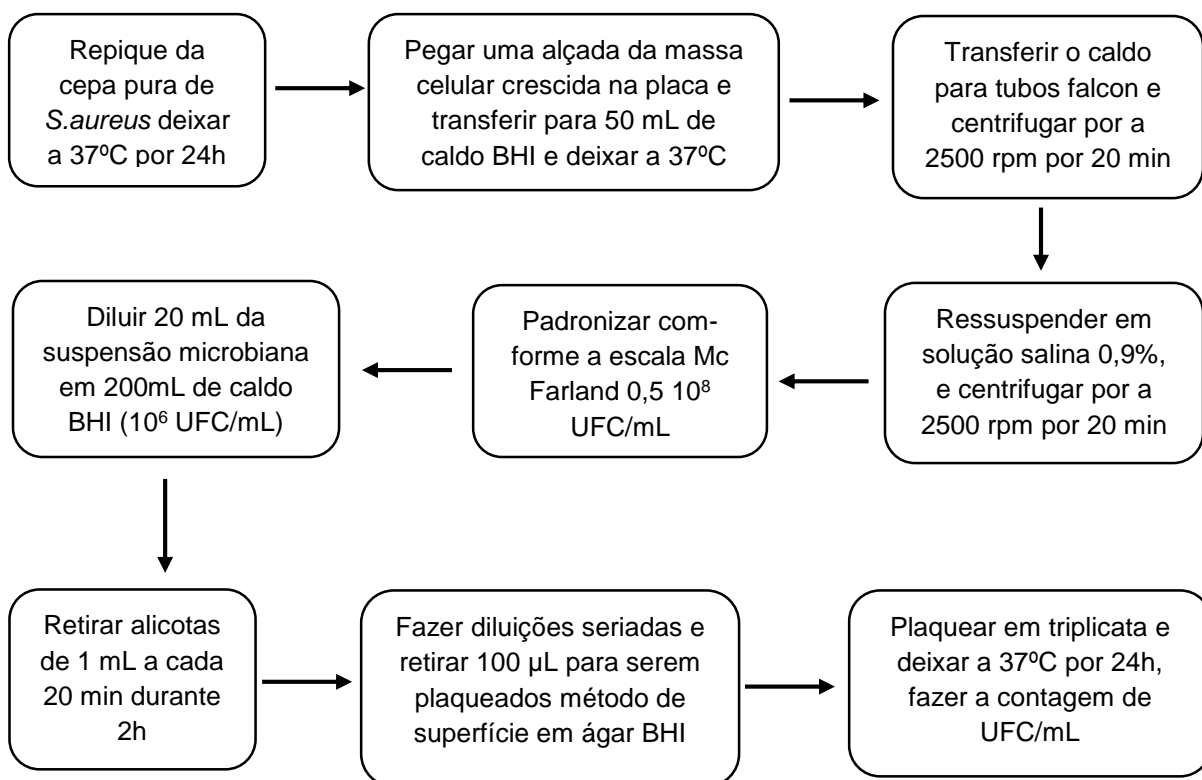


Figura 6 - Reator utilizado para a inativação da bactéria *S. aureus*

4.3.3 FLUXOGRAMA DO PROCESSO



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO

Os filmes sintetizados conforme a Tabela 1 foram caracterizados em trabalhos anteriores (SIKORA, 2011), por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando como fonte emissora de elétrons, um emissor de efeito de campo (FEG). As fotomicrografias estão apresentadas na Figura 7.

Conforme demonstrado na Figura 7, houve grande diferença na morfologia dos filmes que foram sintetizados em uma menor concentração de H_3PO_4 , quando comparados aos que foram obtidos em uma maior concentração do ácido (Tabela 1 e Figura 7). Nota-se que a formação de poros de TiO_2 foi mais evidente e apresentou menos irregularidades para os filmes que foram sintetizados com maior concentração do eletrólito ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de H_3PO_4).

Filmes crescidos em altas concentrações de H_3PO_4 apresentam alta resistividade. Além disso, durante o crescimento foi observada a emissão de sparks (SIKORA, 2011). A região adjacente ao evento de spark apresentou alta cristalinidade (SIKORA et al., 2015) o que pode ser comprovado pela análise dos difratogramas dos filmes analisados, conforme demonstrado na Figura 8.

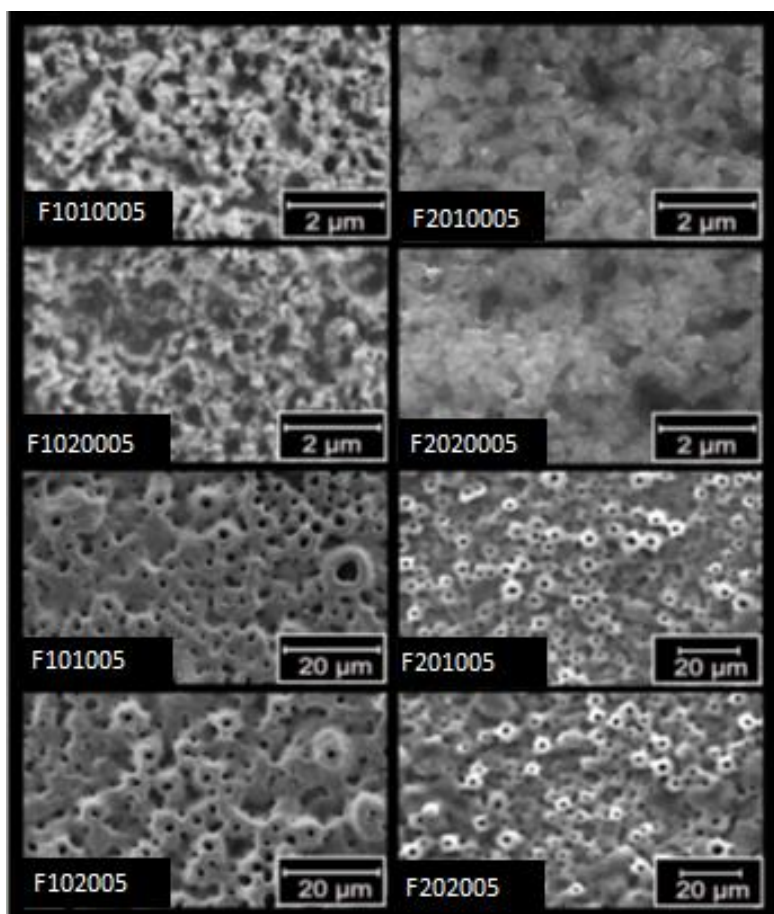


Figura 7 – Micrografias das amostras obtidas de acordo com as condições descritas na Tabela 1

Fonte: Adaptado de (SIKORA, 2011)

Os filmes sintetizados também foram submetidos à caracterização microestrutural, previamente realizados por Sikora (2011), utilizando a técnica de difração de raios-X. Tais resultados podem ser visualizados nos difratogramas da Figura 8, onde o pico assinalado por (*) corresponde a fase anatase, e os demais são referentes aos substrato dos filmes sintetizados a base de titânio.

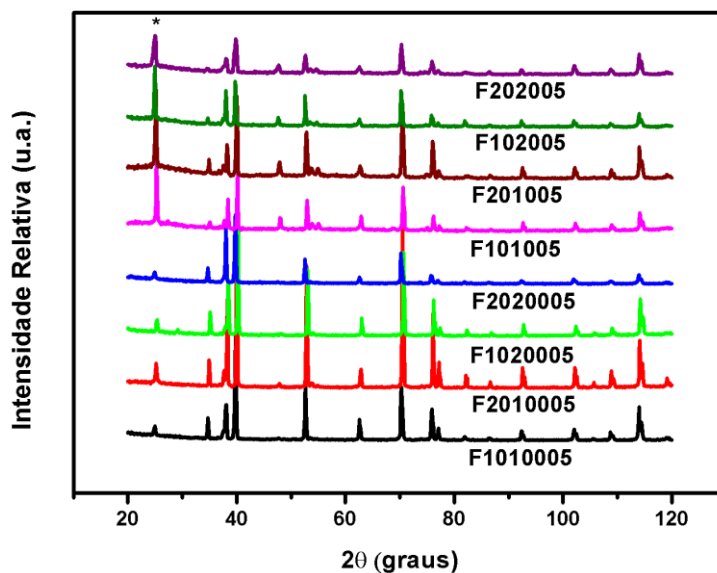


Figura 8 - Difratomogramas dos filmes de TiO₂ sintetizados por PEO de acordo com as condições experimentais apresentadas na Tabela 1.

Fonte: Adaptado de (SIKORA, 2011).

Após caracterizado por MEV e DRX, os filmes foram submetidas a ensaios fotocatalíticos para avaliar a fotoatividade.

5.2 ATIVIDADE FOTOCATALÍTICA

Para o estudo da inativação da bactéria *Staphylococcus aureus*, inicialmente foram realizados dois experimentos controle, o primeiro foi feito inoculando o microrganismo em meio reacional (caldo BHI), sem incidência de luz UV (controle escuro), e o segundo foi realizado expondo o microrganismo às mesmas condições citadas anteriormente, porém com a

incidência de luz UV e sem a presença do fotocatalisador (fotólise). Sendo assim, conseguiu-se observar o comportamento do sistema na presença e na ausência de luz UV, sem a interferência dos materiais fotocatalisadores, conforme demonstrado na Figura 9.

Na curva controle, verificou-se crescimento do microrganismo na ausência de luz, durante todo o processo de 120 min. Por outro lado, a curva da fotólise promoveu grande inativação da bactéria durante todo o experimento.

Nas figuras 10 e 11, estão apresentadas fotografias das placas contendo as contagens das UFC/mL de *S. aureus*, verificadas para as amostras coletadas durante os experimentos controle no escuro e fotólise. Nestas, evidenciam-se a manutenção e aumento das UFC para o controle escuro (Figura 10) e o decréscimo das UFC de *S. aureus*, ou seja, ocorrência de lise celular para o processo de fotólise (Figura 11).

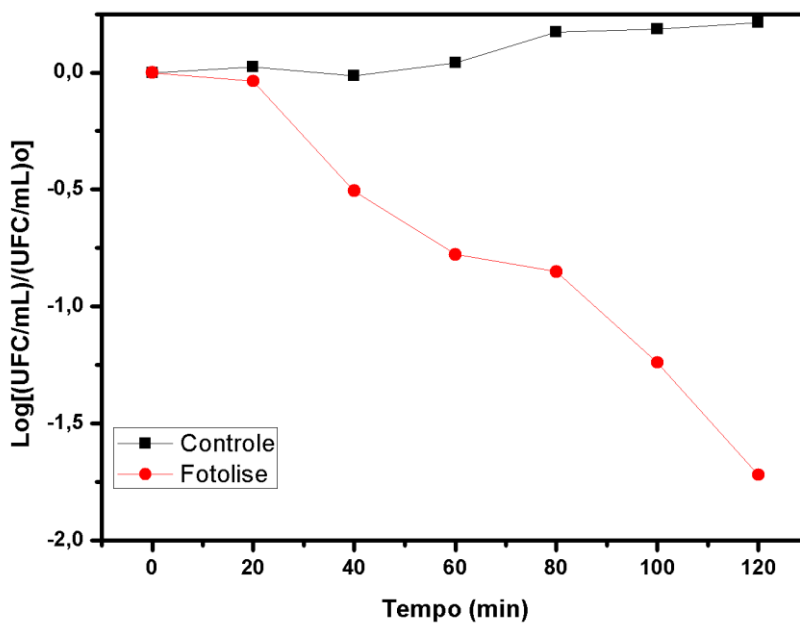


Figura 9 - Curva da fotólise e do controle no escuro demonstrando o perfil de crescimento/inativação de *S. aureus* em função do tempo de reação.

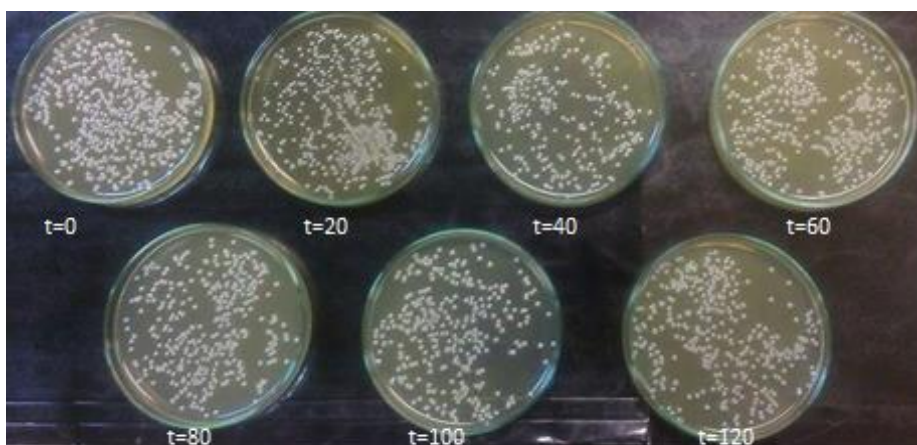


Figura 10 – Contagens de UFC de *S. aureus* observadas para a curva controle no escuro, durante os 120 min de reação.

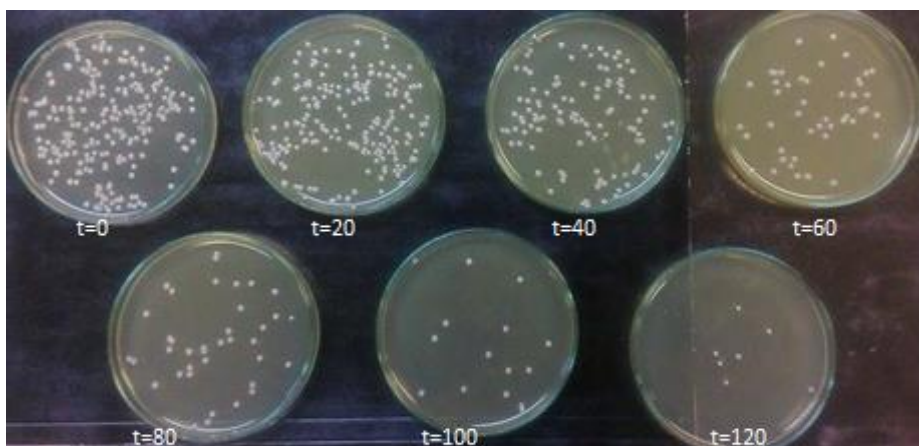


Figura 11 - Contagens de UFC de *S. aureus* observadas para a curva controle por fotólise, durante os 120 min de reação.

A eficiência do processo foi estabelecida através da Equação 5 (CORDEIRO; LEITE; DEZOTTI, 2004), onde calculou-se a taxa de mortalidade de *S. aureus* após os 120 min de experimento. Nesta equação, η_0 representa o número de células vivas iniciais e η_ℓ o número de células vivas ao final do processo.

$$\frac{\eta_0 - \eta_\ell}{\eta_0} \cdot 100 = \text{eficiência (\%)} \quad (5)$$

Conforme a Equação 5, a eficiência encontrada para o processo de fotólise foi de 98,09%, o qual foi muito eficiente na inativação de *S. aureus*. A inativação da bactéria por fotólise foi comparada com a inativação por fotocatalise. O perfil da inativação de *S. aureus* na presença dos catalisadores (fotocatalise) pode ser observado na Figura 12.

Para a interpretação dos resultados da inativação de *S. aureus*, foi calculada a constante de velocidade da reação (k), a qual é representada graficamente pelo coeficiente angular da curva $\log[(\text{UFC/mL})/(\text{UFC/mL})_0]$ versus tempo, conforme apresentado na Figura 12. A reação foi tratada como pseudo-primeira ordem (VALÉRIA; YOKOYAMA, 2006), seguindo o mecanismo de Langmuir. Os resultados calculados para as constantes cinéticas de todas as curvas, incluindo a fotólise, são apresentados na Tabela 2.

Os filmes que apresentaram uma melhor atividade fotocatalítica, F1010005, F2020005, F101005, F201005, F102005, foram os quais apresentaram uma constante de velocidade maior que a da fotólise, e os de resultados inferiores ao do processo de fotólise, F2010005, F1020005, F202005, foram os quais apresentaram uma constante de velocidade inferior, obtendo uma menor eficiência.

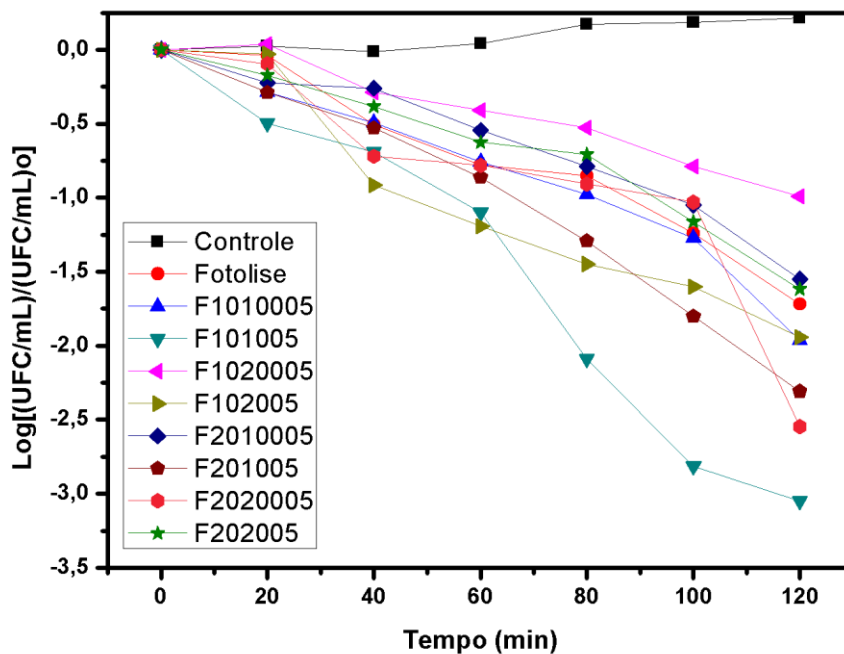


Figura 12- Curvas de inativação de *S. aureus*.

Na Figura 13 estão apresentadas as fotografias das placas contendo as contagens de UFC de *S. aureus* no início ($t=0$) e no fim da reação ($t=120$ min.) para os experimentos de inativação da bactéria por fotocatalise utilizando os filmes de TiO_2 sintetizados em diferentes condições experimentais. Como pode-se notar, os filmes apresentaram alta eficiência na inativação da bactéria em 120 minutos de reação.

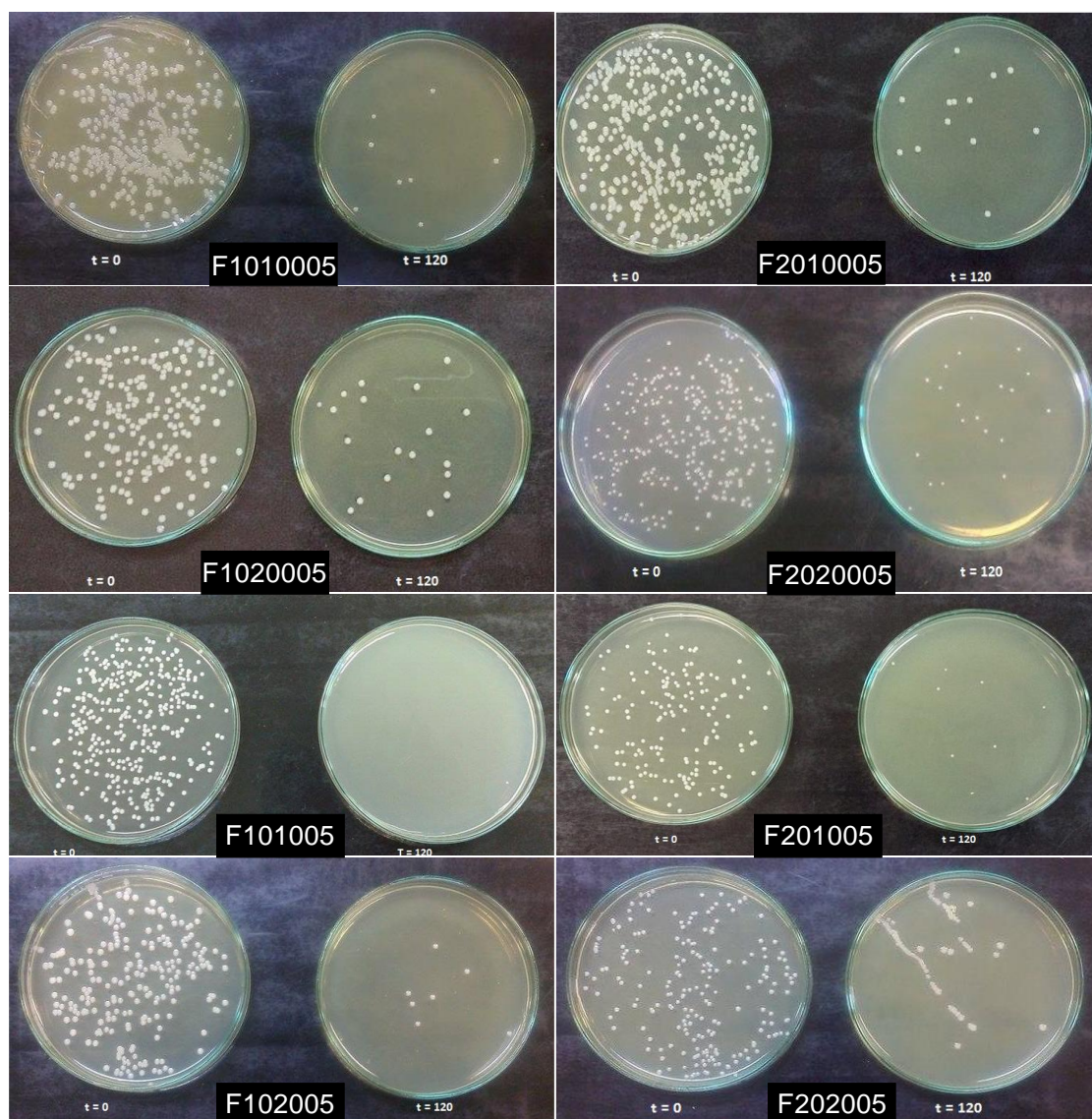


Figura 13 – Contagens de UFC referentes à inativação de *S. aureus* durante os 120 min de reação fotocatalítica, utilizando os diferentes filmes de TiO₂ sintetizados.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos, microestruturais e morfológicos das amostras

Amostra	k (min ⁻¹)	Tamanho do poro (µm)	Tamanho do cristalito (Å)	Eficiência (%)
F1010005	0,01489	0,220	4,18	98,15%
F2010005	0,01221	0,264	4,18	97,18%
F1020005	0,0087	0,200	4,51	89,80%
F2020005	0,01731	0,268	4,16	99,72%
F101005	0,02711	0,807	5,44	99,91%
F201005	0,01914	0,968	4,56	99,51%
F102005	0,01697	1,668	6,73	98,85%
F202005	0,00129	1,028	2,83	97,59%

A constante de velocidade encontrada para a fotólise foi de 0,01412 min⁻¹, comparando com as amostras F1010005, F2020005, F101005, F201005, F102005, a constante de velocidade foi maior, tendo um valor máximo de 0,02711 min⁻¹ para a amostra F101005. Sendo assim, pode-se observar que estas amostras comportaram-se efetivamente como fotocatalisadores, enquanto as amostras F2010005, F1020005, F202005, o material semiconductor apresentou efeito oposto, diminuindo a eficiência do processo em relação a amostra controle de fotólise, tornando-se um inibidor no processo de inativação da bactéria (Tabela 2 e Figura 12). A eficiência

de cada curva de inativação foi calculada e os resultados são apresentados na Tabela 2.

A morfologia dos filmes foi submetida à análise quantitativa do diâmetro de poro, utilizando o software *ImageJ*, realizado em trabalhos anteriores (SIKORA, 2011). Os resultados encontrados, também apresentados na Tabela 2, podem ser analisados na forma de um gráfico paramétrico onde pode-se investigar o comportamento da constante cinética (Figura 14) e da eficiência (Figura 15) em função do diâmetro de poros.

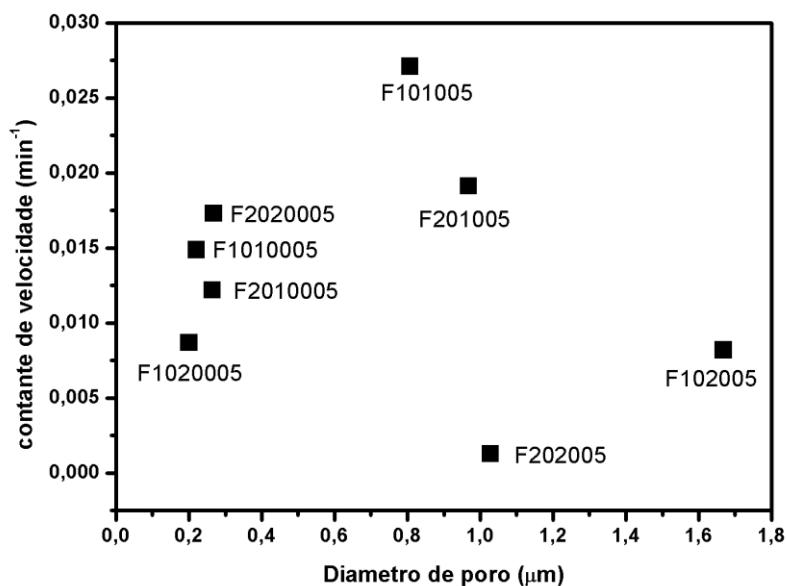


Figura 14 - Influência do Diâmetro de poro na constante de velocidade.

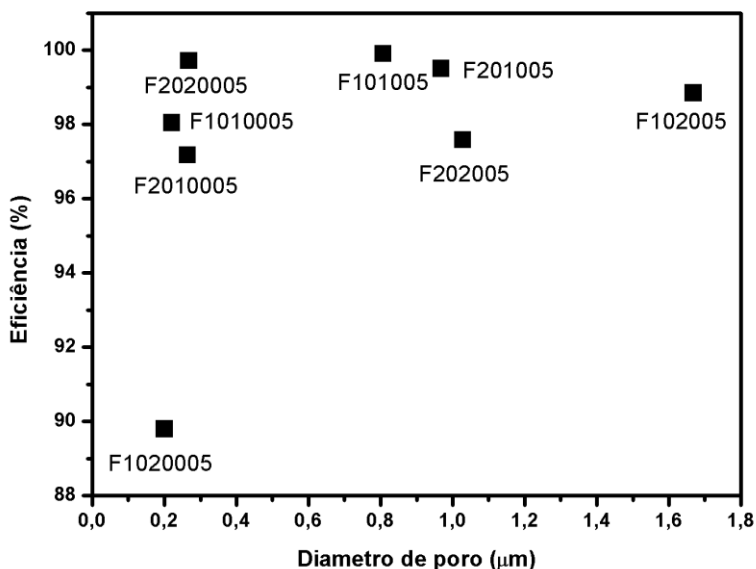


Figura 15 - Influência do diâmetro de poro na fotoatividade dos filmes sintetizados.

Analisando a Figura 14, onde é apresentada a relação do diâmetro de poro *versus* a constante de velocidade da reação, pode-se observar que não houve uma tendência nos resultados, pois os valores de R^2 encontrados em cada curva não possuem linearidade, porém, em se tratando de degradação de microrganismos esses resultados apresentam-se satisfatórios.

A análise da Figura 15 mostra que há um comportamento característico da eficiência de inativação do microrganismo em função do diâmetro de poro. A amostra que apresentou o menor diâmetro de poro (0,2 µm), foi também a qual apresentou a menor eficiência do processo, apresentado na Figura 15. Apesar de filmes com baixos valores de diâmetro de poro apresentarem alta área superficial ativa para a fotocatalise, como o tamanho das bactérias pode variar de 0,2 a 1,0 micrômetros (MADIGAN et

al., 2006), as bactérias não conseguem penetrar nos poros, sub-utilizando a parte ativa do filme. Já os filmes que com diâmetro de poro maior, permitiram a entrada da bactéria no interior dos poros, apresentando melhor taxa de inativação das bactérias, uma vez que pôde-se utilizar uma parcela maior da área fotoativa dos filmes.

Os filmes também foram caracterizados por difração de raios-X e os resultados foram quantificados em relação ao tamanho de cristalito, de acordo com a Equação 6, derivada por Scherrer (SCHERRER, 1918).

$$\tau = \frac{0,9\lambda}{B \cdot \cos\theta} \quad (6)$$

Onde τ é o diâmetro do cristal, λ é o comprimento de onda do raio-X incidentes no qual foi utilizado 1,54Å; B é a largura do pico na meia altura e θ é o ângulo de Bragg dado em graus. Estes dados são extraídos do pico principal da fase anatase conforme mostrado na Figura 16. Os resultados desta análise quantitativa também são apresentados na Tabela 2.

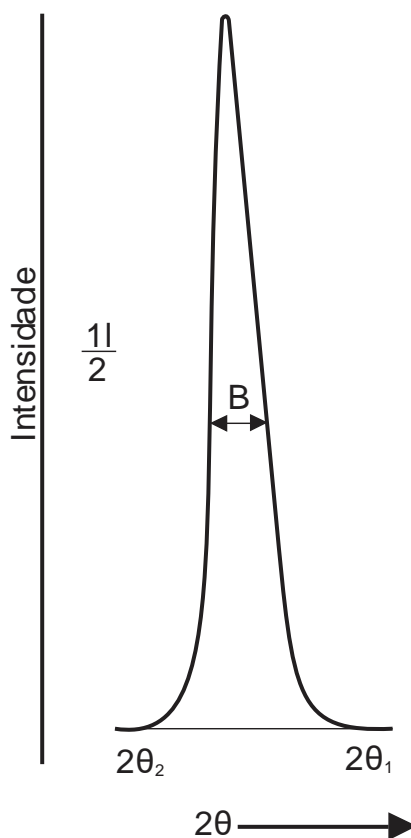


Figura 16 - Parâmetros do difratograma utilizados na equação de Scherrer e seu significado.

As constantes cinéticas e a eficiência do processo de inativação de *S. aureus* também podem ser analisados em função do tamanho de cristalito. Estes dados são apresentados na forma de gráficos paramétricos mostrados na Figura 17 e 18.

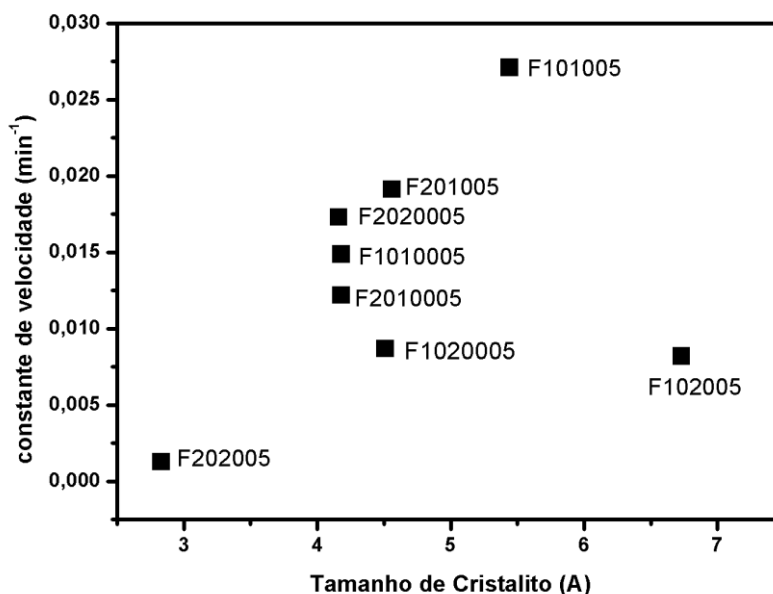


Figura 17 - Influência do Tamanho do Cristalito na constante de velocidade.

A Figura 17 representa a tendência encontrada pela constante de velocidade da reação em relação ao tamanho de cristalito. Entretanto, como o cálculo da constante de velocidade é derivado da linearização da curva de inativação em função do tempo e está apresentando valores baixos de R^2 , realizou-se o estudo dos parâmetros estruturais em função da eficiência do processo de inativação do microrganismo, como pode ser observado na Figura 18.

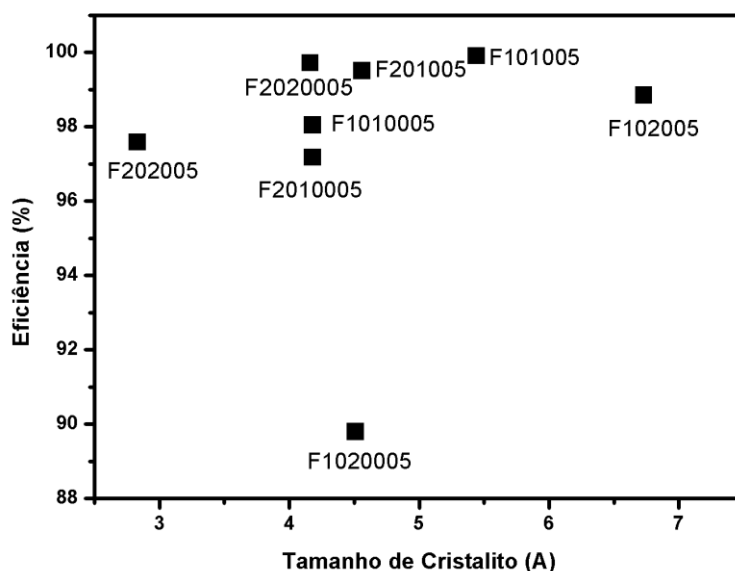


Figura 18 - Influência do tamanho do cristalito dos filmes sintetizados na eficiência do processo fotocatalítico de inativação de *S. aureus*.

A Figura 18 apresenta a influência do tamanho do cristalito em relação à eficiência do processo, onde os dados encontrados, conforme a Equação derivada por Scherrer, variaram entre 2,83 a 6,73 Å. Com exceção da amostra F1020005, que apresentou 89,80% de eficiência, as demais amostras apresentam uma tendência linear do aumento da eficiência em função do tamanho de cristalito.

A formação dos cristais de óxido ocorre pelo fenômeno de ruptura eletrolítica, gerando uma elevada energia que é liberada em forma de luz e calor (*sparks*). Conforme demonstrado por Parkhutik e seus colaboradores (1992), o aumento da concentração de eletrólito faz com que esse processo de ruptura se intensifique (PARKHUTIK; ALBELLA; MARTINEZ-DUART,

1992). Diante disso, percebeu-se que a maioria das amostras que continham maior concentração de H_3PO_4 , foram também as que apresentaram valor mais elevado para o tamanho de cristalito (Figura 8).

Este resultado mostra que existe um efeito misto entre o diâmetro de poro e o tamanho de cristalito do óxido no processo de inativação da bactéria *S. aureus*. Em trabalho publicado anteriormente por Sikora e colaboradores (SIKORA et al., 2011), os autores propuseram que a região de contorno de grão dos cristais de óxido atua como centro de recombinação de portadores e^-/h^+ (elétron/lacuna), diminuindo a eficiência do material. Sendo assim, quanto maior é o tamanho do cristal formado na síntese, menor vai ser a quantidade de centros de recombinação e maior a fotoatividade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que existe um efeito significativo da morfologia e da microestrutura na fotoatividade dos filmes de TiO₂.

A capacidade de inativação fotoquímica está relacionada à tamanho do diâmetro de poro capaz de permitir a entrada dos microrganismos no interior da estrutura porosa dos filmes, portanto, os filmes que apresentaram um diâmetro de poro inferior tiveram sua área ativa sub-utilizada, diminuindo então a eficiência do processo.

A análise da eficiência em função do tamanho de cristalito mostrou que há um aumento na fotoatividade dos filmes em função do aumento do tamanho de cristalito, pois há uma diminuição na densidade de regiões de contorno de grão e portanto, um decréscimo nos centros de recombinação de pares e⁻/h⁺, aumentando sua efetividade no processo de inativação de *S. aureus*.

Sendo assim os filmes que apresentaram os melhores resultados para o processo fotocatalíticos, F1010005, F2020005, F101005, F201005, F102005, foram quais apresentaram um diâmetro de poro de tamanho suficiente para que a bactéria conseguisse entrar e não sub-utilizar a parte ativa do material, e foram sintetizados em concentrações maiores, por aumentando essa concentração de eletrólito fez com que aumentasse o tamanho do cristal e diminuísse o processo de recombinação de pares e⁻/h⁺.

REFERÊNCIAS

CARP, O.; HUISMAN, C. L.; RELLER, A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. v. 32, p. 33–177, 2004.

CORDEIRO, A. C. D. S.; LEITE, S. G. F.; DEZOTTI, M. Inativação por Oxidação Fotocatalítica de Escheria coli e Pseudomonas sp. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 689–694, 2004.

CRUVINEL, A. R.; SILVEIRA, A. R.; SOARES, J. S. Perfil antimicrobiano de Staphylococcus aureus isolado de pacientes hospitalizados em uti no Distrito Federal. **Cenarium Farmacêutico**, v. 4, p. 1–11, 2011.

FUJISHIMA, A.; HONDA, K. Photolysis-decomposition of water at the surface of an irradiated semiconductor. **Nature**, v. 238, n. 5385, p. 37–38, 1972.

IRELAND, J. C. et al. Inactivation of Escherichia coli by titanium dioxide photocatalytic oxidation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 5, p. 1668–1670, 1993.

LOPES, I.; DANIEL, L. A. **Heterogeneous Photocatalysis in Secondary**. v. 9, p. 335–342, 2004.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock Biology of Microorganisms**. 12. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2006.

NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. F. a Fotocatálise Heterogênea E Sua Aplicação Ambiental. **Química Nova**, v. 2, n. 1, p. 69–72, 1998.

PARKHUTIK, V. P.; ALBELLA, J. M.; MARTINEZ-DUART, J. M. Electric

breakdown in anodic oxide films. **Modern aspects of electrochemistry**, v. 23, p. 330, 1992.

PODPORSKA-CARROLL, J. et al. Antimicrobial Properties of Highly Efficient Photocatalytic TiO₂ Nanotubes. **Elsevier B.V.**, v. 176-177, p. 70–75, 2015.

ROGUSKA, A. et al. Synthesis and characterization of ZnO and Ag nanoparticle-loaded TiO₂ nanotube composite layers intended for antibacterial coatings. **Thin Solid Films**, v. 553, p. 173–178, 2014.

SCHERRER, P. Determination of the size and internal structure of colloidal particles using X-rays. **Math-Phys Klasse**, v. 2, p. 98–100, 1918.

SIKORA, M. D. S. Universidade Federal de São Carlos - UFSCar Centro de Ciências Exatas e Tecnologia Departamento de Química Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ **Investigação do mecanismo de formação de filmes porosos de TiO₂** obtidos por anodização galvanostática. 2011.

SIKORA, M. DE S. et al. Influence of the morphology and microstructure on the photocatalytic properties of titanium oxide films obtained by sparking anodization in H₃PO₄. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 9, p. 3122–3127, 2011.

SIKORA, M. S. et al. Theoretical Calculation of the Local Heating Effect on the Crystallization of TiO₂ Prepared by Sparking Anodization. **Current Nanoscience**, v. 11, n. 3, p. 263–270, 2015.

SILVA, R. D. C. A. DA; ARAÚJO, T. M. DE. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 8, n. 4, p. 1019–1028, 2003.

ŠTENGL, V. et al. Preparation, characterization and photocatalytic activity of optically transparent titanium dioxide particles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 105, n. 1, p. 38–46, 2007.

TAVARES, W. Bacterias gram-positivas problemas: Resistencia do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281–301, 2000.

TEIXEIRA, C. PO. DE A. B.; JARDIM, W. F. **Caderno Temático**. v. 03, 2004.

VALÉRIA, F.; YOKOYAMA, L. Remoção de cor em soluções de corantes reativos por Oxidação com H₂ O₂ /UV. v. 29, n. 1, p. 11–14, 2006.
VAN VLACK, L. H. **No Title princípios de ciências dos materiais**. 12. ed. [s.l: s.n.].

YU, C.-K. et al. Photocatalytic effect of anodic titanium oxide nanotubes on various cell culture media. **Applied Physics A**, v. 102, n. 2, p. 271–274, 2011.