**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS**

LIDIANE PATRICIA GONÇALVES

**Ormosils Fotoativos com Fosfotungstato dopados com nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$
e NP de Ag: avaliação fotocromica e potencial de inibição bacteriana frente às
bactérias *Staphylococcus aureus*
e *Pseudomona aeruginosa***

**São Carlos
2015**

LIDIANE PATRICIA GONÇALVES

**Ormosils Fotoativos com Fosfotungstato dopados com nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$
e NP de Ag: avaliação fotocrômica e potencial de inibição bacteriana frente às
bactérias *Staphylococcus aureus*
e *Pseudomona aeruginosa***

Versão Corrigida

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho

**São Carlos
2015**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

P635o Patricia Gonçalves, Lidianne
Ormosils Fotoativos com Fosfotungstato dopados com nanopartículas SiO₂@TiO₂ e NP de Ag: avaliação fotocromica e potencial de inibição bactericida frente às bactérias Staphylococcus aureus e Pseudomona aeruginosa / Lidianne Patricia Gonçalves; orientador Ubirajara Pereira Rodrigues Filho. São Carlos, 2015.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais e Área de Concentração em Desenvolvimento Caracterização e Aplicação de Materiais -- Escola de Engenharia de São Carlos; Instituto de Física de São Carlos; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2015.

1. ormosil. 2. fosfotungstato. 3. SiO₂@TiO₂. 4. nanopartículas de Ag. 5. Staphylococcus aureus. 6. Pseudomona aeruginosa. 7. fotocromismo. 1. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **LIDIANE PATRICIA GONÇALVES**.

Título da tese: "Ormosils fotoativos com fosfotungstato dopados com nanopartículas $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ e NP de Ag: avaliação fotocromica e potencial de inibição bactericida frente às bactérias staphylococcus aureus e pseudomona aeruginosa".

Data da defesa: 13/04/2015.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Ubirajara Pereira Rodrigues Filho**
(Orientador)
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Aprovada

Profª. Dra. **María Elena Vela**
(UNIFITA – La Plata/Argentina)

Aprovada

Prof. Dr. **Sidney Jose Lima Ribeiro**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP-
Araraquara)

Aprovada

Prof. Dr. **Roberto Tomasi**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Profª. Associada **Carla Cristina Schmitt Cavalheiro**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais:

Prof. Titular **Antonio José Felix de Carvalho**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Dedico este trabalho

À minha mãe, Fátima, por ser tudo o que eu preciso.
“Posso não ter nada, mas tendo você, eu tenho tudo.”
Te amo.

Ao meu pai, Carlos, por me incentivar a estudar e buscar o melhor para minha vida.

Ao meu irmão, Leandro, pelo apoio e auxílio nos momentos necessários.

A minha avó Anna, minha segunda mãe, por todo apoio e amor.
A minha tia “Marina” que, com a simplicidade e pureza de uma criança,
tenta sempre me animar.

Ao meu namorado e companheiro, Luiz Henrique, por estar presente, me apoiar e me amar
mesmos nos momentos mais estressantes. Você me faz ser melhor.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

“Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém. Ninguém e nada cresce sozinho; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor.” (Autor Desconhecido).

Primeiramente a Deus, pois sem Ele, eu nada seria.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização do curso de Doutorado, pela infraestrutura e formação acadêmica.

Ao meu orientador Ubirajara, pela orientação, pela amizade, paciência, dedicação, empenho e principalmente pela oportunidade concedida. Sempre disposto a me ajudar, me ensinar e não me deixar desistir. Meu muito obrigado! Se cheguei até aqui foi por sua orientação e ensinamentos.

À minha “co-orientadora” María Elena Vela por me receber de braços abertos no INIFTA e em seu grupo de pesquisa, me ensinando, me ajudando e sendo como uma mãe no estágio em La Plata. Muito obrigada.

“Uns são homens; Alguns são professores; Poucos são mestres. Aos primeiros, escuta-se; Aos segundos, respeita-se; Aos últimos, segue-se. Se hoje enxergo longe, é porque fui colocado em ombros de gigantes!” – Autor desconhecido.

A Prof.^a Dr.^a. Luralice de Campos F. Canale pela oportunidade de realizar o PAE e me ensinar um pouco do que ela sabe e da maneira de ensinar com amor.

Aos técnicos Wagner e Márcio pelas análises de microscopia e paciência com infinitas medidas realizadas. Ao “Tati” por me ensinar em La Plata a operar o AFM e ter toda a paciência em estar comigo nas suas férias realizando medidas.

Aos amigos que participaram de uma maneira ou de outra desse trabalho. Em especial

à: Ticiane, Aline, Lucíola, Noemi, Priscila, Renata e Marco que estão presentes há muito tempo em minha vida e sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins. Obrigada por estarem presentes e deixarem minha vida muito melhor.

“Há alguns amigos que são muito mais chegados que um irmão”.

Aos amigos de La Plata, ao grupo de trabalho, “el grupo del almuerzo” que fizeram meus almoços e dias mais gostosos. Que fizeram de La Plata uma segunda casa e um lugar que levarei para sempre em meu coração. Um agradecimento especial à Patricia Schilardi pela orientação e carinho, ao Alejandro por ser mais que um tutor e se tornar um amigo que quero muito bem e aos amigos-irmãos Julie e Diego, que me “cuidaram” e não me deixaram sozinha em nenhum momento. Eu amo vocês!

Ao meu grupo de pesquisa, Grupo de Química de Materiais Híbridos e Inorgânicos, que é mais que um grupo de pesquisa, somos amigos e companheiros. Ao Sajjad por todo apoio e ajuda, à amiga Luciana, à amiga Kelen que se fez presente aqui e quando eu estava em La Plata, ao colega Orlando pela ajuda nas medidas de XRF, ao “Gutito” por me ajudar em muitas coisas e principalmente ao Elias que além de amigo é uma pessoa que me ensina muito, me ajuda e foi fundamental para defesa dessa tese.

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra”! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” – Charles Chaplin

A Capes pela bolsa de Doutorado e ao CNPq por permitir meu estágio em La Plata.

“Cada escolha, uma oportunidade. Cada queda, um aprendizado. Cada atitude, uma consequência.”

Enfim, a todos que de uma forma ou outra estiveram envolvidos na realização desde trabalho e na participação desta etapa da minha vida, os meus sinceros agradecimentos.

“O mais importante para o homem é crer em si mesmo”. Sem esta confiança em seus recursos, em sua inteligência, em sua energia, ninguém alcança o triunfo a que aspira.”

(Thomas Wittlam Atkinson)

RESUMO

GONÇALVES, P. L. **ormosils Fotoativos com Fosfotungstato dopados com nanopartículas SiO₂@TiO₂ e NP de Ag : avaliação fotocrômica e potencial de inibição bactericida frente às bactérias *Staphylococcus Aureus* e *Pseudomona aeruginosa*. 149p. 2015. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.**

Neste trabalho foram preparados materiais híbridos do tipo silicatos organicamente modificados (Ormosils) contendo fosfotungstato, [PW₁₂O₄₀]⁻³ e dopados com nanopartículas sintetizadas core@shell SiO₂@TiO₂. Os objetivos a serem atingidos com estes materiais são obter filmes com alta sensibilidade à radiação UV e capazes de fotosintetizar nanopartículas de Ag no seu interior e superfície visando revestimentos antibacterianos.

O pigmento fotocrômico nos filmes é o fosfotungstato e o core@shell irá atuar como agente potencializador da resposta fotocrômica dele. Dessa maneira variou-se a quantidade de volume da suspensão das partículas core@shell tentando maximizar a resposta fotocrômica com a menor quantidade possível de partículas adicionadas. Observa-se uma resposta não-linear da sensibilidade ao UV observada pelo aumento no fotocromismo com a quantidade de suspensão de partículas adicionada.

Ormosils com nanopartículas de Ag fotossintetizadas foram preparados com intuito de verificar a inibição desses na formação de biofilmes de bactérias patogênicas, ou seja, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomona aeruginosa*.

Os materiais foram caracterizados por espectroscopias vibracionais, espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), Difração de Raios X (DRX), Fluorescência de Raios X, Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Nos testes de inibição da formação de biofilme notou-se uma maior inibição frente às bactérias *S. aureus* usando filmes de ormosils core@shell. Entretanto, para a inibição de *P. aeruginosa* a presença de core@shell não de maneira significativa. Na presença de NP de Ag ambas as bactérias foram inibidas totalmente. Os testes microbiológicos foram caracterizados através de contagem de placa, microscopia de Epifluorescência, teste de reaproveitamento, teste do halo de crescimento, Microscopia Eletrônica de Varredura e espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS).

Palavras chaves: Fosfotungstato. Ormosils. Nanopartículas de Ag. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

GONÇALVES, P. L. Photoactive Ormosil-phosphotungstate materials doped with $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ and Ag nanoparticles: Evaluation of their photochromic response and bacteria-inhibition activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomona aeruginosa*. 149p. 2015. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

In this project, hybrid materials based on organo modified silicates (Ormosils) containing phosphotungstic acid (HPW) and doped with $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ core@shell nanoparticles were prepared. The objectives of the project was to obtain films of these hybrid ormosil-HPW- $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ materials with high sensitivity to UV radiation and, which after coating with silver nanoparticles, could be used for antibacterial applications. The HPW in these films serves as the photochromic component while the role of $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ particles was to enhance the innate phototromic reponse of the HPW. The prepared hybrid materials and hybrid films were characterized by vibrational spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, X-ray diffraction analysis, X-ray fluorecence, atomic force microscopy and scanning electron microscopy. The effect of addition of $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ particles on the photochromic reponse was systematically studied in order to obtain films with maximum photochromic response. The UV sensitivity or the photochromic response showed a non-linear increase as function of the amount of $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ particles added. The hybrid ormosil-HPW- $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ films modified with silver nanoparticles were studied for their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* as model bacteria. The ormosil-HPW- $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ films showed a good degree of inhibition against *S. Aureus*, while the presence of $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ in the ormosil-HPW films had no significant effect on the inhibition ability of the hybrid films against *P. aeruginosa*. The ormosil-HPW- $\text{SiO}_2 @ \text{TiO}_2$ films modified with Ag totally inhibited the growth of both the model bacteria studied. These photochromic and antibacterial hybrid films can find useful applications in UV-sensing devices and antibacterial coatings.

Key words: *Phosphotungstate. Ormosils. Silver Nanoparticles. Staphylococcus aureus. Pseudomonas aeruginosa.*

LISTA DE FIGURAS

Lista de figuras

1. Introdução

Figura 1.1 - Ciclo fotocatalítico mostrando a atividade supressora de elétrons da banda de condução de NP de TiO_2 por polioxometalatos (POM) e a foto-oxidação de substratos orgânicos.....36

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 2.1 – Esquemas da fases orgânica e inorgânica42

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo de gelificação para sistemas a) coloidais e b) poliméricos43

Figura 2.2 – Mecanismo de hidrólise e condensação catalisada por ácidos.....44

Figura 2.4 - Estrutura tipo Keggin do heteropoliânion $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ 46

Figura 2.5 - (a) Representação esquemática de um heteropoliânion do tipo Keggin; (b) Representação esquemática da estrutura do polioxoânion a-PW mostrando a posição do íons W^{6+} (M) e dos óxidos em ponte (O_{2c1} e O_{2c2}) e dos íons óxido terminais (O_t); (c) representação esquemática do metal X e do O_{4c} 47

Figura 2.6 - Esquema da excitação do TiO_2 pela radiação ultravioleta50

Figura 2.7 - Representação esquemática das várias etapas de desenvolvimento de um biofilme. 1) adesão reversível, 2) adesão irreversível, 3) formação de microcolônias, 4) biofilme maduro, 5) destacamento 55

Figura 2.8 - Ilustração da parede celular de bactérias gram (+) e gram (-)57

3. MATERIAIS E MÉTODOS E CARACTERIZAÇÃO

Figura 3.1 - Esquema ilustrativo de adsorção de Ag nos filmes ormosils.....65

Figura 3.2 - Foto da irradiação das amostras dopadas com Ag, com a caneta UV.....66

Figura 3.3 - Espectro eletrônico ilustrativo das amostras SNP e CS100 dopadas com Ag após

10 minutos de irradiação com a caneta	66
Figura 3.4 - Interação cantiléver ponta-amostra a) modo contato, b) modo não contato, c) modo tapping.....	69
Figura 3.5 - Esquema mostrando as regiões de medidas para modo contato, não contato e tapping	69
Figura 3.6 - Microscópio AFM Multimode utilizado b) esquema de funcionamento	69
Figura 3.7 - Imagem do equipamento de XPS utilizado em La Plata	70
Figura 3.8 : Aparato de irradiação solar utilizado para os testes de fotocromismo.	71
Figura 3.9 - Esquema de esterilização dos filmes ormosis pré-ensaio. Filmes são colorados em quarto com Luz UV durante 24h para esterilização e posterior preparo do biofilme.....	72
Figura 3.10 - Esquema de formação de biofilme, desde a colonização até a diluição para plaqueamento (etapas resumidas).....	73
Figura 3.31 - Esquema ilustrativo de diluição e plaqueamento.....	74
Figura 3.42 - Exemplo de uma placa após 24 h para contagem de colônias.....	74

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Figura 4.1 - Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com detector de elétrons secundários do filme de partículas de SiO_2 sobre silício monocristalino.....	77
Figura 4.2 - Histograma das submicropartículas de sílica	78
Figura 4.3 - Microscopia das sínteses core@shell com a) 50m e b) 100mg c)220mg d)350mg.....	79
Figura 4.4 - Micrografia obtida por FEG-SEM de do filme de nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ obtidas pela adição de 200 μL e 350 μL de isopropóxido de titânio.....	80
Figura 4.5 - Micrografia obtida por FEG-SEM de do filme de nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ obtidas pela adição de 200 μL de Isopropóxido de Titânio mostrando a homegeneidade de tamanho e recobrimento das nanopartículas.....	81
Figura 4.6 - Micrografia obtida por FEG-SEM do filme de nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ obtidas pela adição de 350 μL de Isopropóxido de Titânio. A seta A marca um conjunto de nanopartículas sem revestimento de titânia e a seta B marca um conjunto $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$	82
Figura 4.7 - Espectro Raman de filem de partículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ usando $(\text{Ti}(\text{O}_i\text{Pr})_4)$. Espectro inferior é das amostras obtidas usando 200 μL de $(\text{Ti}(\text{O}_i\text{Pr})_4)$, enquanto o superior é das	

amostras obtidas usando-se 350 μ L de (Ti(O _i Pr) ₄	83
Figura 4.8 - Difrátograma obtido para amostra core@shell com precursor 200 μ L de isopropóxido de titânio, mostrando os picos característicos da anatase.....	84
Figura 4.9 - EDS da amostra de ormosil CS200 μ L de isopropóxido de titânio em pó.....	84
Figura 4.10 - Espectro Raman para o filme de ormosil não-dopado e dopado com o maior volume de core@shell SiO ₂ @TiO ₂	86
Figura 4.11 - Espectro de absorção na região do infravermelho dos filmes de ormosil não dopado e dopado contendo o maior teor de core@shell adicionado	86
Figura 4.12 - Espectro UV-vis após 5 minutos de exposição ao UV	88
Figura 4.13 - Gráfico de barras mostrando a resposta fotocrômica, medida pela absorbância integrada entre 400 e 800nm, normalizada pela massa dos filmes dopados com diferentes teores de partículas SiO ₂ @TiO ₂	88
Figura 4.14 - Gráfico de %Ag x Tempo de adsorção, variando de 1 minuto até 60 minutos de imersão em AgNO ₃ (3M).....	90
Figura 4.15 - Espectro eletrônico UV-vis em diferentes tempos de irradiação para o ormosil CS100	91
Figura 4.16 - Esquema ilustrativo da possível redução dos cátions Ag	92
Figura 4.17 - Esquema ilustrativo da interação do ormosil após adição de Ag e após irradiação com Luz UV	92
Figura 4.18 - Esquema redução da Ag	93
Figura 4.19 - Imagem ilustrativa para demonstrar a coloração apresentada após redução do HPW (azul) e Ag (amarelo).	94
Figura 4.20 - Micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de varredura dos filmes dopados com diferentes volumes de nanopartículas core@shell SiO ₂ @TiO ₂	95
Figura 4.21 – Imagem obtidas por FEG-SEM de conjunto de partículas core@shell de SiO ₂ @TiO ₂	95
Figura 4.22 - Imagens obtidas por FEG-SEM de conjunto de partículas core@shell de SiO ₂ @TiO ₂ . Line scan evidenciando a presença de TiO ₂ e Ag ao redor da sílica	96
Figura 4.23 - Comparação da amostra SNP em diferentes condições: a) Sem Ag (2d e 3d) b) Com Ag não irradiada (2d e 3d) c) Com Ag após irradiação (2d e 3d)	98
Figura 4.24 - Comparação da amostra CS20 em diferentes condições: a) Sem Ag b) Com Ag não irradiada c) Com Ag após irradiação.	99
Figura 4.25 - Comparação da amostra CS100 em diferentes condições: a) Sem Ag b) Com Ag	

não irradiada c) Com Ag após irradiação	100
Figura 4.26 - Comparação da amostra CS1000 em diferentes condições: a) sem Ag b) com Ag não irradiada com Ag após irradiação	101
Figura 4.27 - Perfil ilustrativo de altura de uma seção horizontal da superfície dos ormosils com Ag antes de irradiar e após irradiação	102
Figura 4.28 - Comparação amostras a) SNP, b) CS200, c)CS100, d) CS1000 sem Ag (lado esquerdo) e com Ag após irradiação (lado direito).	105
Figura 4.29: Espectro completo da análise de XPS para o filme ormosil, indicando os elementos presentes (N e Ag apresentam energias muito próximas)	106
Figura 4.30: Espectro de XPS para o elemento W4f para os ormosils SNP e CS1000 dopados com Ag, antes de irradiar (NI) e depois de irradiar (I).....	107
Figura 4.31: Espectro de XPS para o elementos Ag 3d para os ormosils SNP e CS1000 dopados com Ag, antes de irradiar (NI) e depois de irradiar (I).....	109
Figura 4.32 - Esquema ilustrativo do preparo da solução de bactérias	110
Figura 4.33 - Gráfico de barras com os dados coletados através de contagem em placas, mostrando o crescimento de colônias de <i>S Aureus</i> para o vidro com e sem revestimentos de Ormosils.....	111
Figura 4.34 - Micrografia MEV para o filme CS100 sem adição de Ag. Na imagem vemos as bactérias <i>S. Aureus</i>	112
Figura 4.35 - CS100 com Ag para <i>S.A</i>	113
Figura 4.36 - Micrografia de epifluorescência para CS100 com Ag (filtro verde).....	114
Figura 4.37 - Micrografia de Epifluorescencia para CS100 com Ag (filtro verde).....	114
Figura 4.38 - Micrografia de Epifluorescencia para CS100 com Ag.....	115
Figura 4.39 - Halo de crescimento comparativo para as amostras sem Ag e com Ag	115
Figura 4.40 - Gráfico de crescimento de colônia para os Ormosils com <i>P.A</i>	116
Figura 4.41 - CS100 sem Ag com biofilme de <i>Pseudomona aereginosa</i>	118
Figura 4.42 - CS100 com Ag irradiada para o biofilme de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	118
Figura 4.43 - Região para bactéria <i>P.A</i> em escala de 500µm	119
Figura 4.44 - Ampliação em 200um para amostra Cs100 com Ag para bactéria <i>P.A</i>	120
Figura 4.45 - Ampliação em 200um para amostra Cs100 com Ag para bactéria <i>P.A</i>	120
Figura 4.46 - Halo de crescimento comparativo para as amostras sem Ag e com Ag, para bactéria <i>Pseudomona aeruginosa</i>	121
Figura 4.47 - Esquema do teste de reaproveitamento	122

Figura 4.48 - Amostra após 3 uso (crescimento de bactérias no local mostrado pelas setas vermelhas)	124
Figura 4.49 - Comparação da coloração das amostras (primeiro teste está bem amarela (típica das NPs Ag) e após o terceiro teste vemos o filme tendendo ao incolor)	124
Figura 4.50 – Comparação da %Ag antes e após ser submetida a duas horas em meio de cultivo, seguindo o protocolo de formação de biofilme	127

LISTA DE TABELAS

TABELAS DO CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 - Parâmetros de deposição para todos os filmes preparados.....65**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3.2 - Composição dos ormosils com seus respectivos componentes.**Erro! Indicador não definido.**

TABELAS DO CAPÍTULO 4

Tabela 4.1 - Resultado de análise semi-quantitativa por EDS da amostra CS200 μ l. 87

Tabela 4.2 - Média dos resultados de Rq para amostras de 1 μ m. 99

Tabela 4.3 - Valores de tamanho: seção transversal das amostras: com Ag não irradiadas (NI) e após irradiação(I). **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4.4 - Valores de Rq (nm) para análise em 10 μ m. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 4.5 - Valores de Energia de Ligação (EL) obtidos por XPS para os picos de fotoemissão da W4f_{7/2} e W4f_{5/2} nos filmes de ormosils não irradiados (NI) e irradiados (I) com radiação UV **Erro! Indicador não definido.**109

Tabela 4.6 - Valores de Energia de Ligação (EL) obtidos por XPS para os picos de fotoemissão da Ag 3d nos filmes de ormosils não irradiados (NI) e irradiados (I) com radiação UV..... 110

Tabela 4.7 - Resultados de teste qualitativo de reaproveitamento dos filmes de Ormosil CS100 para inibição **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BuTS	4-Butironitrilatrietóxissilano
GLYMO	3-Glicidóxi-propil-trimetóxissilano
HPOM	Heteropolioxometalato
TEOS	Tetraetilortossilicato
HPW	Ácido 12-fosfotungstíco ou 12-tungstofosfórico
LMCT	Do inglês <i>Ligand-to-Metal Charge Transfer</i> , ou seja, Transições eletrônicas de transferência de carga do tipo Ligante para Metal
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital, ou seja, orbitais moleculares desocupados de menor energia
POM	Polioxometalato
EDXRF	Fluorescência de Raios X com detecção em modo dispersivo em energia
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X
BC	Banda de condução
BV	Banda de Valência
MEV	Microscopia eletrônica de Varredura
AFM	Microscopia de Força Atômica
DRX	Difração de raios- X
SNP	Ormosil sem nanopartículas core@shell
NI	Filme não irradiado
I	Filme irradiado
CS	Core@shell
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus (S.A)</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa (P.A)</i>
EDX	Detecção em modo de espectroscopia por dispersão em energia
DO	Densidade ótica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	37
1.1.OBJETIVOS.....	39
1.1.1. Objetivos gerais.....	39
1.1.2. Objetivos específicos.....	39
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	43
2.1.Materiais híbridos	43
2.2. Processo sol gel	47
2.3.Heteropoliânion de kegglin	47
2.4.Dióxido de titânio	50
2.5.Core @Shell – SiO ₂ @TiO ₂	52
2.6.Fotocromismo	53
2.7.Nanopartículas de Ag e capacidade microbica.	54
2.7.1. Interação de nanopartículas de Ag em bactérias lancetônicas.....	55
2.8.Biofilmes	58
2.8.1. Bactérias gram positivas (+) e gram negativas (-).....	59
2.8.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	60
2.8.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
3. MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1.Preparação dos filmes ormosils contendo HPW e nanopartículas core@shell SiO ₂ @TiO ₂	65
3.1.1. Ormosils	65
3.2.Síntese de SiO ₂	66
3.3.Síntese core@shell SiO ₂ @TiO ₂	66
3.4.Adsorção de Ag	67
CARACTERIZAÇÃO	
3.5.Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG)	69
3.6.Difração de Raio- x (método pó)	69
3.7.Espectroscopia Raman	69
3.8.Espectroscopia vibracional na região do Infra-vermelho(FTIR).....	70
3.9.Analise Semiquantitativa por espectroscopia de emissão de raio x com detector de modo de energia dispersiva (EDS)	70
3.10. Microscopia de Força Atômica (AFM)- Modo Tapping.....	71

3.11. Análise semiquantitativa por fluorescência de raio x no modo dispersivo em energia (EDXRF) – XRF	71
3.12. Espectroscopia de fotoelétrons de Raios X (XPS)	71
3.13. Avaliação da resposta fotocromica em filmes ormosils com NP core@shell em função da quantidade do volume de NP adicionado	72
3.14. Caracterização das amostras – ensaios biológicos.....	73
3.14.1 Esterilização dos materiais.....	73
3.14.2. Preparação do cultivo bacteriano.....	74
3.14.3. Preparo dos filmes para ensaio.....	74
3.14.4. Preparo do biofilme	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
4.1. Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG)	79
4.1.1. SiO ₂	79
4.1.2. SiO ₂ @TiO ₂	80
4.1.3. Espectroscopia Raman	85
4.1.4. Difração de Raio X	85
4.1.5. Análise de energia dispersiva	86
4.2. Ormosils dopados com fosfotungstato e diferentes volumes de core@shell.....	87
4.2.1. Espectroscopia Raman	87
4.2.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR).....	88
4.2.3. Resposta fotocromica	88
4.3. Ormosils core@shell dopados com Ag.....	91
4.3.1. Isoterma de Sorção Obtida por Fluorescência de raio X (XRF)	91
4.3.2. Espectroscopia Eletrônica ou UV-Vis.....	92
4.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura em Modo FEG	96
4.3.4. Microscopia de Força Atômica (AFM)	98
4.3.5. XPS – Espectroscopia de fotoelétrons	108
4.4. Estudo da adesão e viabilidade das bactérias aderidas nos substratos ormosils...	112
4.4.1. Ensaio com <i>Staphylococcus aureus</i>	113
4.4.2 Ensaio com <i>Staphylococcus aureus</i> dopado com Ag.....	114
4.5. Ensaio com <i>Pseudomona aeruginosa</i>	118
4.5.1. Ensaio com <i>Pseudomona aeruginosa</i> com Ag	119
5. CONCLUSÃO	131

6. SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO	135
7. REFERÊNCIAS	141
8. Apendice – Operação do AFM	141

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Sistemas nanoestruturados apresentam uma grande diversidade de estruturas permitindo o controle das propriedades eletrônicas, mecânicas, químicas e ópticas (LAHMANI, DUPAS e HOUDY, 2006). O controle em escala nanométrica destas propriedades permite que por meio da composição química e das interações químicas e físicas entre os diversos componentes se alcance melhoras significativas nas propriedades, tornando a Química uma ciência central dentro da Nanociência e no desenvolvimento de dispositivos nanotecnológicos (YANG, 2011); (OZIN, ARSENAULT e CADEMARTIRI, 2009); (STEED e ATWOOD, 2013). Dentro deste contexto, esta proposta visa dar continuidade a um estudo sistemático da relação estrutura-propriedade em duas classes de materiais estruturados baseado na rica química dos polioxometalatos e do dióxido de titânio. Os sistemas nanoestruturados escolhidos são filmes de silicatos orgânicos, ormosils. Os ormosils são materiais híbridos que permitem ocluir (hospedar) espécies reativas, no nosso caso o fosfotungstato e o dióxido de titânio. Estas matrizes ou hospedeiros permitem variar o ambiente químico onde se encontra a espécie reativa e assim ajustar a sua estabilidade e reatividade numa abordagem típica de química supramolecular (Lehn, 1996). Paralelamente, os sistemas nanoestruturados escolhidos permitem ajustar as propriedades químicas e físicas através da mudança da formulação, modo de interação entre os componentes e morfologia (Ariga e Kunitake, 2006); (Gogotsi, 2006).

Neste projeto de doutorado estudou-se o efeito da dopagem destes ormosils contendo fosfotungstato com nanopartículas core@shell $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ preparadas em nosso laboratório. Espera-se estabilizar nanopartículas de anatase na superfície da sílica sub-micrométrica e assim obter anatase que apresenta maior potencial de oxidação para o buraco gerado após absorção de fótons que emitem UV. Paralelamente, a maior área superficial proporcionada pelos filmes mesoporosos de anatase sobre sílica aumentam a área de contato entre o fosfotungstato e a titânia. Ambos os aspectos levam ao ganho e maior reprodutibilidade da resposta fotocromica. A transferência eletrônica fotoinduzida, ou a capacidade de receber elétrons da banda de condução do TiO_2 , foi estudada por Ozer e Ferry (Ozer e Ferry, 2001). Eles estudaram a atividade fotocatalítica de polioxometalatos ($\text{W}_{10}\text{O}_{40}^{4-}$, $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ e $\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}^{4-}$) adsorvidos sobre nanopartículas de TiO_2 (mistura anatase:rutila 80:20, diâmetro médio de partículas de 30 nm) na fotodegradação de 1,2- diclorobenzeno (DCB observando o efeito

benéfico da interação entre polioxometalato e TiO_2 .

Figura 1.1 - Ciclo fotocatalítico mostrando a atividade supressora de elétrons da banda de condução de NP de TiO_2 por polioxometalatos (POM) e a foto-oxidação de substratos orgânicos
Fonte – Ozer (2001)

A Figura 1.1 ilustra não só a formação de heteropolyblue pela transferência de elétrons fotoinduzida da banda de condução do TiO_2 para o LUMO do fosfotungstato, mas também a formação de diversas espécies com alto potencial de oxidação capazes não apenas de oxidar poluentes, mas também oxidar biomoléculas na parede celular de bactérias e/ou causar danos em biomoléculas no interior das bactérias. Com a finalidade de aplicar os filmes de Ormosils dopados com $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ como revestimentos híbridos antibacterianos. Os filmes foram testados na inibição de formação de biofilmes de bactérias. Estudar filmes de materiais similares, dopados com nanopartículas de 50-60nm de titânia, neste aspecto foi assunto de tese recentemente no nosso grupo (Souza,2014). Seguindo esta linha de trabalho procuramos ampliar a atividade antibacteriana pela fotossíntese de nanopartículas de Ag nos filmes de ormosils previamente submetidos ao processo de têmpera química (troca-iônica) com cátions Ag^+ . A síntese fotoquímica das nanopartículas pode ser iniciada pela transferência de elétrons na banda de condução do TiO_2 ou pelos *heteropolyblues*. Este mecanismo de formação permite que as partículas se formem apenas em pontos na superfície ou interior dos filmes híbridos contendo o semiconductor ou o polioxometalato. As nanopartículas de Ag formadas podem apresentar alto potencial antibacteriano. Desta forma, os filmes de Ormosils foram testados para atividade antibacteriana frente à bactéria Gram(+) e Gram(-), *Staphylococcus aureus* e *Pseudomona aeruginosa*, respectivamente. Estas bactérias foram escolhidas devido à ampla distribuição no ambiente e grande colonização na cavidade nasal causando infecção hospitalar. Dessa maneira pretende-se estudar a capacidade inibitória de Ormosils dopados com core@shell e Ormosils dopados com core@shell + Ag para uso externo, como em máscaras e revestimentos hospitalares.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Desenvolver filmes de Ormosil com melhor atividade fotocromica e antibacteriana baseados no processo Sol-Gel e dopagem com nanopartículas core@shell de $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ com e sem nanopartículas de Ag.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Síntese de SiO_2 pelo método de Stöber;
- 2) Obter partículas core@shell $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ usando método desenvolvido no grupo (Ullah, 2014);
- 3) Desenvolver método de dopagem dos Ormosils com $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$;
- 4) Avaliar a resposta fotocromica dos Ormosils dopados com nanopartículas core@shell;
- 5) Realizar a dopagem destes Ormosils com cátions Ag^+ via adsorção;
- 6) Realizar a síntese fotoquímica das nanopartículas de Ag a partir dos Ormosils com cátions Ag^+ ;
- 7) Avaliação da atividade antibacteriana dos filmes com nanopartículas core@shell e core@shell com nanopartículas de Ag.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Materiais híbridos

A busca de materiais de alta eficiência quer física ou química é uma constante numa sociedade tecnológica como a que vivemos atualmente. Dentre as várias estratégias possíveis de aumento de eficiência estão os compósitos, nanocompósitos e os materiais híbridos onde se procura combinar e amplificar de maneira sinérgica as características (propriedades) de diversos materiais, muitas vezes de classes diferentes. Nosso grupo de pesquisa optou pelo estudo de materiais nanocompósitos e híbridos. Um material híbrido de maneira geral é um material que possui uma parte orgânica e uma parte inorgânica, estas frações são formadas *in situ* a partir de seus precursores moleculares, já os nanocompósitos têm como característica o fato de que ao menos um dos materiais já está previamente preparado e tem ao menos uma dimensão entre 1 e 100nm. Estes materiais têm fases nanométricas, portanto, uma grande área de interface, maximizando assim a interação entre elas o que deve levar a melhoria das propriedades mecânicas, térmicas, e ópticas (JOSÉ E PRADO, 2005).

Os materiais híbridos são classificados em 3 classes, sendo:

- a) Classe I: a interface dos componentes orgânicos e inorgânicos se dá por pontes de hidrogênio, força de van der Waals ou ligações iônicas;
- b) Classe II: os componentes orgânicos e inorgânicos estão ligados de forma covalente ou iônico-covalente;
- c) Classe III: onde ocorre interação interfacial típicas da classe I e II paralelamente, ou seja, há interações mais fracas do tipo força de van der Waals, ligações e hidrogênio ou ligações iônicas com ligações mais fortes, do tipo ligações covalentes ou iônico-covalentes.

A figura 2.1 mostra a interação dos híbridos da classe I e classe II. A classe de interesse em nosso trabalho é a classe II.

Figura 2.5 – Esquemas da fases orgânica e inorgânica
 Fonte – (Ferreira Neto, 2013)

Nos últimos 25 anos os híbridos baseados em redes de inorgânicas de sesquisiloxanos do tipo silicatos vem ganhando o nome de ORMOSILS (acrônimo de silicatos organicamente modificados em Inglês) (TRAN *et al.*, 2011). Os ormosils são originados a partir da hidrólise controlada de alcóxidos de silício e são materiais extremamente resistentes cineticamente e termodinamicamente, tanto em meio ácido, como em meio básico. Podemos preparar esses materiais através da incorporação de polímeros orgânicos a redes de sílica geradas através do processo sol-gel (MACKENZIE, HUANG e IWAMOTO, 1996).

Também se pode obter ormosils utilizando-se alguns organoalcóxidos do tipo $\text{RSi}(\text{OEt})_3$

com $R = -CH_3$; $-C_2H_5$, C_8H_{17} , $CH=CH_2$ ou $-C_6H_5$ onde R pode influenciar em relação a porosidade do material formado (TAGLIETTI *et al.*, 2012).

A forma geral dos alcoxisilanos é $Si(OR)_4$ e o processo de hidrólise dos alcóxidos tem fundamental dependência com o tamanho das suas cadeias, determinada pelo grupo R isso quer dizer que quanto maior for a cadeia, mais lenta é a reação de hidrólise e isso influencia em propriedades como tamanho de grão e porosidade dos híbridos formados (BRINKER e SCHERER, 2013).

2.2 Processo sol-gel

O termo sol-gel é utilizado para descrever uma preparação de materiais cerâmicos por um processo que envolve a preparação de um *sol* e sua posterior gelificação. O termo *sol* é definido como sendo uma dispersão de partículas coloidais (com tamanho entre 1-100nm) estável em um fluido, enquanto que o termo *gel* é definido por um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios.

Somente pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão ocorre processo de gelificação, já os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias, ilustrado na figura 2.2a. Se os géis forem preparados por reações de polimerização, a gelificação ocorrerá pela interação entre as longas cadeias poliméricas (Fig.2.2b).

Figura 2.2 – Esquema ilustrativo de gelificação para sistemas a) coloidais e b) poliméricos
Fonte – HIRATSUKA *et al.* (1995)

O processo sol-gel é baseado na hidrólise e condensação dos precursores moleculares numa abordagem do tipo *bottom-up*. Dentre os precursores, destacam-se os alcóxidos dos elementos silício, alumínio, zircônio e titânio.

O interesse em nosso trabalho são os alcóxidos, que são compostos metalorgânicos

formados por um grupo (RO- onde R pode ser uma alquila ou uma arila). Alcóxidos de metais são precursores versáteis na síntese de pós-cerâmicos e materiais híbridos e no caso da sílica o alcóxido mais usado é o tetraetilortosilicato (TEOS). O papel do alcóxido no processo sol-gel é a hidrólise ilustrada na figura 2.3 abaixo:

Figura 2.6 – Mecanismo de hidrólise e condensação catalisada por ácidos
Fonte – (FERREIRA NETO,2013)

As reações envolvidas no processo sol-gel são de hidrólise e condensação de precursores e o TEOS, tetraetilortosilicato, foi um dos primeiros alcoxissilanos estudados. A reação com a água é chamada de hidrólise e ocorre a ligação de um íon hidroxila ao átomo de silício, como podemos ver na equação 1 :

Em pH em meio ácido, a taxa de polimerização é proporcional à concentração de H^+ . A reação ocorre quando um grupo alcóxido é protonado, ocasionando a queda da densidade

eletrônica do silício e deixando-o assim mais eletrófilo o que facilita o ataque nucleofílico. O ataque é realizado pela água via mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (ALFAYA e KUBOTA, 2002) e ocorre eliminação de um álcool.

A segunda etapa é a condensação, figura 2.3, a qual ocorre reação do grupo silanol com o alcóxissilano (heterocondensação) ou então ocorre reação com outro grupo silanol, mas protonado (homocondensação) tornando o silício mais eletrofilico. O átomo de silício pode reagir simultaneamente em outras três direções (em um alcóxissilano, por exemplo) (HENCH e WEST, 1990).

Em condições ácidas, a taxa de hidrólise é relativamente mais rápida que a taxa de condensação, formando redes poliméricas pouco ramificadas. As etapas de hidrólise e condensação podem ser catalisadas por ácido ou por base, sendo que a cinética de condensação é fortemente dependente do pH, desta forma influenciando a morfologia final do material.

2.3 Heteropoliânion tipo Keggin

Heteropoliácidos (HPAs) são poliânions formados pela junção de metais de transição do início da série de Transição na Tabela periódica em alto estado de oxidação ligado entre si por pontes oxo (O^{2-}) ou sulfeto (S^{2-}). Neste trabalho nosso interesse está voltado aos polioxometalatos (POMs) de heteropoliácidos do tipo Keggin. Estes compostos constituem uma classe de compostos que podem ser considerados como oxonanocluster, ou seja, moléculas de alta nucleariedade com dimensões entre 1 e 50nm. Esses compostos são de grande interesse em diversas áreas, tais como: eletrônica molecular, dispositivo eletro-óptico, catálise e química medicinal (KATSOULIS, 1998).

Nos compostos do tipo Keggin, a estrutura mais comum tem simetria global T_d com 12 octaedros MO_6 arranjados ao redor de um tetraedro central XO_4 , estes isômeros são chamados de isômeros α . Esses octaedros se arranjam em quatro grupos de três octaedros, e constituem dessa maneira quatro grupos M_3O_{13} chamados de tríades. Essas tríades compartilham vértices entre si e com o tetraedro central. Há uma tríade na parte superior da estrutura e uma na parte inferior, enquanto o equador é ocupado com duas tríades unidas entre si e com as tríades superiores e inferiores via pontes $\alpha-O^{2-}$. Analisando a estrutura da Figura 2.4 podemos ver que existem quatro tipos de íons óxido e na figura 2.5 podemos verificar a estrutura completa.

- a) O_a que faz a ponte entre o heteropolielemento X e os octaedros,
- b) O_t que está no ápice externo dos octaedros da superfície do heteropolioxoânion e cuja distância de ligação com M é mais curta,
- c) O_{2c1} que faz a ponte entre dois centros M na mesma tríade,
- d) O_{2c2} que faz a ponte entre dois centros M de tríades distintas.

Figura 2.4: Estrutura tipo Keggin do heteropoliânion $[PW_{12}O_{40}]^{3-}$ -
Fonte: GIORGI FILHO, 2014).

Figura 2.5 - (a) Representação esquemática de um heteropoliânion do tipo Keggin; (b) Representação esquemática da estrutura do polioxoânio α -PW mostrando a posição do íons W^{6+} (M) e dos óxidos em ponte (O_{2c1} e O_{2c2}) e dos íons óxido terminais (O_t); (c) representação esquemática do metal X e do O_{4c}
 Fonte – BROWN et al. (1977)

O HPW pode ser encontrado em quatro tipos de graus de hidratação e em todas elas os polioxoânions estão interligados entre si por uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo íons $[H_5O_2^+]$, H_3O^+ , H_2O , H^+ e $H^+(H_2O)_n$ (só no hexa-hidrato são apenas dioxônios, nos outros hidratos aparecem diferentes espécies de hidratação) (MIOC *et al.*, 1991). Estes íons interagem através de moléculas de água com os íons óxido terminais dos polioxometalatos usando via ligações de hidrogênio. Nas ligações de hidrogênio, os polioxoânions atuam como doadores de densidade eletrônica, portanto, há um fluxo de densidade eletrônica do polioxoânion para os íons $[H_5O_2^+]$.

Este trabalho baseia-se no dodecatungstato ou fosfotungstato, $[PW_{12}O_{40}]^{3-}$. Duas propriedades importantes desse polioxoânion para este trabalho são seu fotocromismo e seu eletrocromismo reversível, ou seja, a capacidade de receber um determinado número de elétrons sem haver decomposição da integridade do fosfotungstato. As espécies reduzidas reversíveis quimicamente possuem coloração azul, enquanto as irreversíveis são marrom.

O fosfotungstato ao ser irradiado com luz ultravioleta em torno de 260nm é levado a um estado eletrônico excitado em função de uma transição eletrônica de transferência de carga

O(2p)→W(5d). Este estado excitado do tipo LMCT possui alto potencial de redução, portanto, é um excelente agente oxidante podendo facilmente oxidar substratos orgânicos (ZHANG et al.; 2003). O fosfotungstato reduzido apresenta cor azulada, sendo chamado de heteropoliazul. O espectro eletrônico deste composto apresenta duas bandas distintas, sendo uma em torno de 450-500nm que se trata de uma banda d-d de baixa intensidade e a outra que varia de 620-750nm. Essa última banda, mais visível em nosso trabalho, se trata de uma banda de transferência de carga de intervalência (IVCT do inglês *Intervalence charge transfer*) $M^{5+} \rightarrow M^{6+}$, na região do infravermelho próximo (POPE, 1983). Quando ocorre a redução com dois elétrons à banda mais intensa fica na região entre 450 e 550nm.

Outro mecanismo para explicar a cor azulada é o mecanismo proposto de Yamase (YAMASE, 1998). Nesta proposta, ele descreve que na etapa imediatamente anterior a oxidação do substrato orgânico pelo estado excitado do fosfotungstato há a formação de um complexo ativado de transferência de carga entre os íons alquilamônio e o fosfotungstato no estado excitado. Este complexo envolve a transferência de prótons entre o alquilamônio e o fosfotungstato. Segundo este autor, a presença deste complexo de transferência de carga é que leva a um fotocromismo reversível para o sistema (Equação 2), como a oxidação do *heteropoly blue* (Equação 3).

Equação 2

Equação 3

Esse mecanismo proposto por Yamase (YAMASE, 1998) é aplicável para heteropolianions do tipo Keggin, e o processo de branqueamento ocorre pela reação inversa, iniciando-se pela transferência de um elétron do átomo M^V para a molécula de oxigênio.

2.4 Dióxido de titânio (TiO₂)

O TiO₂ é um material cerâmico do tipo óxido binário semicondutor utilizado em diferentes áreas, em função das suas propriedades químicas, elétricas, ópticas e fotoquímicas. É encontrado na natureza em diferentes fases cristalinas, são elas: a) anatase de estrutura cristalina tetragonal pertencente à classe de simetria espacial I41/amd com 2 fórmulas por

célula unitária, b) rutila de estrutura igualmente tetragonal e pertencente à classe espacial $P4_2mm$ com 2 fórmulas por célula unitária, c) brucita com estrutura ortorrômbica e pertencente ao grupo espacial de simetria $Pcab$ com 8 fórmulas por células unitárias (BERSANI, LOTTICI e DING, 1998).

Entre essas três formas, a rutila é a fase termodinamicamente mais estável, sendo aplicada em tintas, cosméticos, fotocatalise e suporte em sistema catálise heterogênea (CAO *et al.*, 1997). Já a anatase por possuir dureza superior ao vidro e índice de refração elevado (CUSANOVICH, 1980); (SCHUBERT, HUESING e LORENZ, 1995) é preferida para aplicações eletroquímicas e fotoquímicas (BRAGG, 1937). A anatase e a brucita são fases metaestáveis em qualquer temperatura, sendo que a rutila é a única fase estável do TiO_2 e dependendo da forma que o TiO_2 apresenta suas propriedades físicas mudam (LINSEBIGLER, LU e YATES Jr, 1995). Desta maneira, na maioria dos sistemas envolvendo reações fotocatalíticas a fase anatase apresenta uma maior atividade catalítica que a fase rutila (BUSCA *et. al*, 1994). Apesar desta maior atividade catalítica da fase anatase, há exemplos de que misturas físicas das fases apresentam melhor comportamento frente a substratos específicos.

A transformação da anatase para a rutila é irreversível, visto ser uma transformação de uma fase termodinamicamente metaestável para uma fase estável. Dois processos competitivos podem ser considerados no aquecimento em altas temperaturas do pó do TiO_2 anatase nanométrica: o crescimento do cristalito e a transformação da anatase para rutila (DING e LIU, 1998).

A energia da banda proibida da anatase, *band gap*, está em torno de 3,2 eV, enquanto a da rutila se situa em torno de 3,0 eV. Uma energia da banda proibida tão alta torna as excitações de transições eletrônicas interbandas acessíveis apenas com fótons de alta energia, ou seja, na região do ultravioleta. Como o uso de um fotocatalisador do tipo semiconductor extrínseco é dependente da excitação destas transições interbandas, é desejável que esses sejam realizados no sentido de expandir a região de absorção do TiO_2 , de maneira que se possa aproveitar a região visível do espectro solar para fotocatalise. Esforços são realizados no sentido de: a) trabalhar com nanoestruturas, b) usar fotossensibilizadores e c) introduzir dopantes na estrutura do TiO_2 .

Para alterar a estrutura de bandas são adicionados dopantes e defeitos na rede cristalina, eles introduzem estados eletrônicos na banda proibida, como mudanças na estrutura eletrônica do material acabam introduzindo novas transições eletrônicas, portanto, bandas no

espectro eletrônico que podem ser irradiadas e cujos estados excitados podem ser utilizados para fotocatalise (RIEGEL e BOLTON, 1995).

Essa atividade do TiO_2 em qualquer das suas formas alotrópicas ocorre em função da absorção de radiação UV pelo TiO_2 , como é mostrado na figura 2.6. Esta absorção de radiação UV leva a uma transição eletrônica interbandas, consequentemente se forma um par elétron-lacuna (par $e^- h^+$). O elétron na banda de condução tem potencial de redução suficientemente positivo para reduzir O_2 a H_2O_2 ou $\text{H}^+(\text{aq})$ a H_2 (CHEN *et al.*, 2004). Ao passo que a h^+ na banda de condução possui potencial de oxidação suficientemente positivo para transformar H_2O em radical $\cdot\text{OH}$ (YAN *et al.*, 2004), como também pode oxidar a matéria orgânica que porventura esteja adsorvida na superfície da titânia.

Figura 2.6 - Esquema da excitação do TiO_2 pela radiação ultravioleta
Fonte – Ullah (2014)

Quando temos o HPW com o dióxido de titânio ocorre um aumento da eficiência fotocromica do sistema ormosil, pois o HPW atua como receptor de elétrons fotoexcitados do TiO_2 inibindo, assim, a recombinação do par elétron-buraco gerado na fotoexcitação com radiação ultravioleta do TiO_2 (Ozer e Ferry, 2001), conforme ilustrado na Figura 2.6. As reações que representam a figura 2.6 estão esquematizadas em seguida:

2.5. Core@Shell – SiO₂@TiO₂

A síntese das partículas core@shell foi realizada segundo (ULLAH, 2014). O interesse em utilizar partículas do tipo core@shell está em melhorar utilizar as características do titânio e ainda melhorar a estabilidade térmica e química pelo núcleo de SiO₂ e aumentar a dispersão de partículas e superfície de contato para que haja maior interação com o ácido fosfotúngstico. Essa configuração core@shell permite controle da casca (OHNO, T. 2009.), melhora a estabilidade térmica e dispersibilidade do material de suporte (Li, A, 2013; Li, G, 2010.) e também é possível controlar o tamanho do núcleo do material a ser utilizado. Outra vantagem é que essa imobilização do TiO₂ em SiO₂ aumenta a estabilidade térmica e com isso evita a transformação da fase anatase para a rutila (Li, A, 2013). Dessa maneira, pretende-se com esse material melhorar a resposta fotocromica do híbrido, combinando a partícula core@shell com HPW e evitando dessa maneira a recombinação do par e⁻-h⁺.

2.6. Fotocromismo

O fenômeno característico de mudança de coloração de um material quando exposto à radiação eletromagnética é chamado de Fotocromismo. Esse pode ser irreversível ou reversível, quando retorna a cor original na presença de oxigênio. Materiais fotocromicos são em sua grande maioria da classe orgânica, entretanto, compostos inorgânicos tem sido estudado (HIRATSUKA,1995; RAMAHAM,2003).

Deb (YAO 1992, HIGHFIELD 1988) iniciou trabalho de fotocromismo envolvendo polioxometalatos e metais de transição, MoO₃ e WO₃ e nas últimas décadas houve um aumento em estudar compósitos híbridos com essa aplicação. Nosso material é um híbrido orgânico inorgânico que apresenta o HPW, um ácido com a capacidade de receber elétron e mudar de coloração. O HPW é um poliânion do tipo Keggin e possui essa capacidade de oxido-redução devido a sua estrutura complexa. Com isso apresenta a propriedade de se reduzir e mudar de coloração, no caso azul, apresentando fotocromismo reversível (PAPACONSTANTINO,1989).

2.7. Nanopartículas de Ag e a capacidade microbicida

As NPs são definidas como materiais que possuam uma das dimensões entre 1e 100nm e que uma das propriedades físicas ou químicas possui um comportamento correlacionado à sua dimensão nanométrica na faixa descrita. As nanopartículas (NPs) metálicas de Ag são muito estudadas devido ao efeito inibitório em uma ampla variedade de microrganismos, entre eles: fungos, vírus e bactérias (Seil e Webster, 2012). Essa capacidade microbicida das NPs depende da natureza do material (tamanho e forma de NP, composição química, concentração de NP usada) e da característica do microrganismo, como por exemplo, relação entre área e volume que nos permite um maior contato e interação com os microrganismos. O mecanismo de atuação das NPs ainda é objeto de estudo, mas entre as diversas possibilidades de atuação estão:

- a) Alteração na função da membrana celular (modificando a permeabilidade e respiração celular)
- b) Alteração na função das proteínas e DNA.

Em nosso trabalho utilizamos as NP de Ag devido a sua atividade inibitória sobre diversos microrganismos e à baixa resistência por parte dos microrganismos comparada aos antibióticos.

Nesse trabalho formaram-se nanopartículas no interior e na superfície dos filmes de ormosils por meio fotoquímico com intuito de obter um revestimento controlado das nanopartículas. Uma vez formadas estas partículas de Ag na superfície devem inibir a formação de biofilme bacteriano. Uma preocupação quando se desenvolvem materiais é a sua ecotoxicidade (toxicidade no meio ambiente). Em relação à ecotoxicidade das Nps é sugerido em alguns estudos que devido ao seu tamanho e propriedades microbicidas as NPs de Ag podem se acumular no meio ambiente, gerando assim, problemas ambientais (BRAYDICH-STOLLE *et al.*, 2005). Outra preocupação é a ingestão destas nanopartículas por seres humanos, ou seja, o comportamento toxicológico destas partículas. Nesta direção as NPs de Ag envolvem células eucarióticas tais como células hepáticas humanas (KIM *et al.*, 2009), fibroblastos. (ARORA *et al.*, 2009), considerando dessa maneira que as Nps são tóxicas provocando danos na respiração celular e nos ciclos de divisão celular (ASHARANI *et al.*, 2008). Entretanto nosso trabalho visa uso externo para as NPs e dessa maneira estudos sobre concentração e quantidade nociva ao corpo humano não serão necessários.

2.7.1. Interação de nanopartículas de Ag em bactérias planctônicas

Os mecanismos de ação bactericida das NPs de Ag não estão completamente dilucidados. Enquanto alguns falam da interação direta das NPs com as bactérias, outros envolvem somente aos íons Ag (I) liberados por elas. No caso de Nps fortemente adsorvidas em substratos é pouco provável que estas possam se desprender e se internalizar pelas células.

Alguns mecanismos propostos são:

a) Interação com parede celular bacteriana: esse é o primeiro ponto de ataque das NPs de Ag, que vão reagir com a parede bacteriana podendo internalizar as Nps de Ag e com isso causar um estresse oxidativo ao reagir com as proteínas e DNA bacteriano além de poder ocorrer acumulação de Ag no interior da célula, causando efeitos na permeabilidade celular e conduzindo a bactéria a morte celular (Marambio-Jones e Hoek, 2010). Estudos mostram que os íons Ag (I) causam mudanças morfológicas na parede celular e isso ocasiona a separação da membrana plasmática tanto em bactérias Gram (+) como Gram (-) (Morones *et al.*, 2005).

Através da técnica de TEM foi observado que ocorre perda da integridade da membrana e lise das bactérias na presença de NPs de Ag, contudo esse efeito é menos presente em bactérias Gram (+) e isso pode ser devido à camada de peptidoglicano ser mais espessa em bactérias Gram (+) do que em Gram (-) impedindo dessa maneira que ocorra uma forte interação com a membrana (Kim *et al.*, 2007; Taglietti *et al.*, 2012). Esse efeito também foi observado ao realizar tratamentos com íons Ag (I) (Feng *et al.*, 2001).

(b) Interação com DNA, enzimas e proteínas citoplasmáticas: Uma vez que há contato de NPs com a célula pode ocorrer interação com DNA, proteínas e enzimas. Sabe-se que o DNA bacteriano se encontra condensado formando o nucleóide e para que ocorra a divisão celular é necessário que ocorra o relaxamento do mesmo. Contudo na presença de NPs o DNA se protege dobrando-se sobre si mesmo, não permitindo sua replicação e posterior divisão celular (FENG *et al.*, 2001; (CHOI *et al.*, 2008). Há também evidências da interação de íons Ag que causa alteração na conformação de hélice (JOHANNSEN, 2010) e interação com as bases adenina e guanina (ARAKAWA, NEAULT e TAJMIR-RIABI, 2001).

c) Interações provocando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS): As ROS são produtos gerados durante o processo de respiração celular, incluindo O₂, H₂O₂, radicais superóxidos e hidroxilas. Nas células há um mecanismo denominado defesa antioxidante, o

qual controla as espécies ROS. Quando há uma situação de estresse a concentração de ROS aumenta rapidamente e causa danos a lipídeos e DNA.

2.8. Biofilmes

Um grande problema de saúde pública é o crescimento da resistência bacteriana e atinge principalmente nos países de terceiro mundo e dentre as espécies mais resistentes a *Staphylococcus aureus* se destaca (MIRANDA *et al.*, 2008). Um dos motivos desse aumento de resistência das bactérias é o uso inadequado de antibiótico e que promove uma disseminação de infecções, principalmente nos hospitais. Sendo assim estão sendo desenvolvidas novas drogas para inibir a disseminação desses microrganismos. Dois pontos são importantes 1) as novas drogas geralmente são prejudiciais às células dos hospedeiros e também 2) as bactérias apresentam diferentes mecanismos de resistência, podendo-se destacar a formação de biofilme bacteriano (DOHMEN, 2008).

Há um grande interesse em estudar biofilmes, devido a preferência de bactérias em se organizar em biofilmes, se aderindo e formando biofilmes em sua grande maioria em superfícies bióticas e abióticas, resultando em diversos problemas na indústria médica já que alguns tipos de biofilmes de bactérias se colonizam frequentemente em dispositivos médicos. Cerca de 80% das infecções no corpo são causadas por biofilmes (De MELO *et al.*, 2013).

Biofilme é definido como o aglomerado de substâncias poliméricas extracelulares (EPS do inglês Extracellular Polymeric Substances) que rodeia a comunidade de microrganismos aderidos à superfície, sendo que uma das funções mais importantes da matriz é garantir a coesão da estrutura do biofilme.

A adesão de biofilmes é um fenômeno que ocorre naturalmente em meios aquosos e depende das propriedades superficiais dos suportes de adesão (como carga superficial, hidrofobicidade, tensão superficial) das propriedades dos microrganismos envolvidos na adesão e também das propriedades do meio aquoso (presença de substâncias que podem condicionar as superfícies, pH e força iônica do meio). A etapa de adesão é considerada a primeira etapa de formação do biofilme, sendo que esse passo inicial da colonização microbiana pode ocorrer em superfícies abióticas (materiais médicos, por exemplo) como em superfícies bióticas (células do hospedeiro) (AZEVEDO; CERCA, 2012).

É vantajoso, para a bactéria, sobreviver em um biofilme, pois essa matriz fornece uma

barreira de proteção contra forças físicas e ataques químicos (ELKINS *et al.*, 1999). Quando em biofilmes as bactérias são resistentes à maioria dos antibióticos e também escapam ao sistema imunitário, resistindo à fagocitose (MAH *et al.*, 2003).

Figura 2.7 - Representação esquemática das várias etapas de desenvolvimento de um biofilme. 1) adesão reversível, 2) adesão irreversível, 3) formação de microcolônias, 4) biofilme maduro, 5) destacamento.
Fonte – DAHLBERG *et al.* (1997)

A figura 2.7 representa as etapas de formação do biofilme, que é caracterizada por 5 etapas: 1 – etapa reversível, 2- adesão irreversível, 3- formação de micro colônias e maturação, 4- Biofilme maduro, 5- desadesão. Tendo o conhecimento dos processos nos ajuda a compreender os mecanismos de resistências dos biofilmes de modo a criamos estratégias para prevenção ou controle dessa comunidade microbiana.

Na primeira etapa, ou seja, a etapa reversível ocorre à aproximação entre a matriz extracelular dos microrganismos e as superfícies bióticas ou abióticas e essas interações de longo alcance envolvem forças de van der Waals e forças eletrostáticas (AZEVEDO; CERCA, 2012) e já as de curto alcance envolvem as ligações de hidrogênio e ligações covalentes (WIENCEK, 1995; RENDUELES, 2012). Essa etapa é dita reversível por pode ser facilmente “deslocada” com movimentos bruscos ou atrito mecânico.

Após essa primeira adesão existe a chamada adesão irreversível, no qual ocorre adesão irreversível dos microrganismos com a superfície juntamente com a secreção de EPS (extracellular polymeric substance). Nessa etapa a adesão ocorre geralmente através de cápsulas e fimbrias que atuam como adesinas ligando o microrganismo por meio de interações

eletrostáticas e/ou ligante-receptor (JASS, SURMAN e WALKER, 2003). Recordando ainda que as características da superfície influenciam muito na adesão microbiana, destacamos características como rugosidade, energia livre, composição química.

Na etapa de maturação ocorre o aumento da ECM que circunda as micro colônias devido a continua secreção de EPS, nessa etapa ocorre formação de micro colônias, formando o biofilme. Já na etapa quando o biofilme está maduro, observa-se canais aquosos, responsáveis pelo transporte de água e nutrientes, passagem de células planctônicas e também remoção de metabólitos potencialmente tóxicos.

A última etapa é quando começa a ocorrer morte celular, desprendimentos dos microrganismos, por falta de nutrientes, água ou dispersão nos canais. As fases principais são descritas com mais detalhes em seguida:

Fase 1 – Transporte até a superfície

Em fluídos quiescentes (fluidos em repouso) ou na camada viscosa do fluxo turbulento, o transporte de microrganismos até a superfície pode fazer-se por difusão à custa de movimentos específicos que são denominados movimentos Brownianos (os quais tem deslocamento médio de 40µm/h). Quando o transporte das células se faz num fluido em movimento, a aproximação dos microrganismos à superfície pode fazer-se por convecção.

Fase 2- Adesão inicial

Na vizinhança da superfície (50nm) as células e a superfície podem interatuar por forças de curto e longo alcance e isso conduz a adesão. Nessa fase a adesão pode ser reversível ou irreversível. É dita reversível quando o microrganismo, após estar fixo à superfície continua exibir movimentos Brownianos e pode ser removido por ação de forças de corte, ou pelo movimento ativo próprio da célula. Quando a célula se fixa irreversivelmente não pode ser removida facilmente da superfície e também não exibe movimentos Brownianos.

Fase 3 – Fixação à superfície

Após ocorrer a adesão inicial pode estabelecer-se uma ancoragem firme entre a célula microbiana e o suporte a partir de ligações físico-químicas específicas (ligações covalentes,

iônicas e pontes de hidrogênio) ou através de pontes estabelecidas por estruturas extracelulares específicas produzidas pelos microrganismos. Estas estruturas podem ser apêndices celulares filamentosos ou polímeros extracelulares. As ligações são normalmente com compostos extracelulares específicos do microrganismo (adesinas) e receptores complementares localizados na superfície.

2.8.1. Bactérias Gram positivas (+) e Gram negativas (-)

As bactérias possuem uma parede celular que é composta de peptidoglicanos que resulta em rigidez das bactérias. As bactérias se dividem de acordo com sua resposta com o método de coloração de Gram que caracteriza a bactéria em Gram (+) ou Gram (-) dependendo da sua estrutura da parede celular.

Figura 2.8 - Ilustração da parede celular de bactérias gram (+) e gram (-)
Fonte – Tortora (2010)

A diferença entre as paredes é que a estrutura da parede celular das bactérias Gram (+) é composta por uma região de um só tipo de moléculas, denominadas peptidoglicanos com ácidos teóicos intercalados. Já a bactérias Gram (-) são compostas por uma região de peptidoglicano e membranas celulares internas e externas, tendo então uma parede celular mais complexa que as Gram (+) como podemos verificar na figura 2.8.

2.8.2. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* é constituído por 45 espécies (entre as quais temos a *Staphylococcus aureus*), pertence à família dos Micrococcaceae. São células esféricas Gram positivas com diâmetro entre 0,5-1,5µm e apresentam-se geralmente em forma de cachos irregulares. As colônias formadas apresentam-se arredondadas, lisas, elevadas, brilhantes e opacas e sua cor varia de branco à amarelo dourado ou alaranjado (AZEVEDO, 2012).

São bactérias do tipo cocos, aeróbios facultativos e são Gram (+), capaz de formar biofilme sobre distintas superfícies e isso é impactado em diversas áreas, tais como a medicina, indústria e meio ambiente (PATRICK et al, 2006; MADIGAN et al, 2003).

É uma bactéria encontrada com relativa frequência no corpo humano, estão presentes na flora do trato respiratório e pele (GONZALES *et al.*, 2005) e algumas são capazes de sintetizar EPS e com isso permite a adesão e formação do biofilme sobre uma superfície. (GÖTZ, 2002). Podem ser patogênicos causando uma variedade de síndromes. É um patógeno oportunista que possui pigmentação amarela e está associada a patologias como pneumonite, meningite (MADIGAN, 2003) e as infecções hospitalares causadas por essa bactéria afetam a corrente sanguínea, o trato respiratório inferior, pele e tecidos moles, bem como podem estar associadas ao cateter venoso central levando a uma bacteremia (SCHITO, 2006).

2.8. 3. *Pseudomona aeruginosa*

As *Pseudomonas* são microrganismos do tipo Gram negativo, apresentam formato de bacilos retos ou curvados e um tamanho de 0,5 a 4µm. Apresentam mobilidade por conterem flagelos que facilitam seu deslocamento em diferentes meios ou suportes. Apresentam coloração amarelo esverdeado, fluorescentes e são solúveis em água (fluoresceína, no caso da *Pseudomonas fluorescens*) (MADIGAN, 2003).

É um dos microrganismos responsáveis pela degradação de vários compostos solúveis que são provenientes de plantas e animais e se encontram presentes em água e solos e por esse motivo são de grande importância ecológica (ASHISH *et al.*, 2013); (XIN e HE, 2013); (PATEL et al, 2013).

Outra característica importante é que podem sintetizar uma camada de exopolissacarídeos (EPS) que permite a adesão celular e favorece, dessa maneira, a formação de biofilme. Essa camada de EPS protege a bactéria de agente antimicrobiano ou de

fagocitose, aumentando a patogenicidade da bactéria (GELLATLY e HANCOCK, 2013) e sendo assim pode-se dizer que os biofilmes de *Pseudomonas* são mais resistentes que as bactérias em estado planctônico.

É um patógeno oportunista e afeta a pacientes que estão com o sistema imune comprometido. Associa-se com infecções do trato urinário e respiratório do homem (LYCZAK, CANNON e PIER, 2000) e pode infectar facilmente pacientes que recebem tratamento por queimaduras, infecções pulmonares entre outras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Antes da adsorção dos filmes, os substratos de vidro foram limpos com água deionizada e detergente e, posteriormente, submetidos ao tratamento conhecido como RCA que consiste em uma solução 5:1:1 de $\text{H}_2\text{O}:\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ durante 30 minutos à 80°C (CHARACKLIS; WILDERER, 1989).

3.1. Preparação dos Filmes de Ormosil contendo HPW e nanopartículas core@shell $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$

3.1.1. Ormosils

Utilizou-se a rota sol-gel para preparação dos filmes. Inicialmente adicionou-se em um béquer o TEOS e a BuTS, seguidos de metade do volume do solvente, tudo sob agitação magnética constante e então adicionou-se o HPW (0,75mmol) dissolvido na outra metade do volume de solvente, deixando-se agitar por 5 minutos. Decorridos esses 5 minutos adicionou-se a água, o GLYMO e deixou-se agitando por mais 5 minutos. Na sequência, adicionou-se a quantidade escolhida das nanopartículas core@shell, conforme mostra a tabela 3.2, e deixou-se agitando por 10 minutos. Posteriormente, realizou-se a preparação dos filmes em substrato de vidro pela técnica *dip-coating*. O aparelho utilizado para a deposição foi um Elevador de disco Marconi MA-765. Após a finalização do processo, as amostras são colocadas em frascos porta-amostra, fechadas e armazenadas.

Tabela 3.1 - Parâmetros de deposição para todos os filmes preparados.

Velocidade (mm/s)	Número de Imersões	Tempo de repouso após imersão (s)	Tempo de Repouso para secagem
150 mm/s	20	0 s	10 s

Obs.: A velocidade de imersão e emersão é a mesma.

Tabela 3.2 - Composição dos ormosils com seus respectivos componentes.

Nome da amostra	TEOS (mmol)	BUTS (mmol)	HPW (mmol)	H ₂ O (mmol)	GLYMO (mmol)	V _{NP} (µL)
SNP	9,0	1,5	0,75	45	6,8	-
CS200_20 µL	9,0	1,5	0,75	45	6,8	20
CS200_100 µL	9,0	1,5	0,75	45	6,8	100
CS200_500 µL	9,0	1,5	0,75	45	6,8	500
CS200_1000 µL	9,0	1,5	0,75	45	6,8	1000

3.2 Síntese SiO₂

A síntese da sílica foi adaptada do método de Stöeber (STÖBER; FINK; BOHN, 1968) e obteve-se tamanho médio de 250nm. A síntese foi preparada pela hidrólise em meio básico em temperatura ambiente. Adicionou-se inicialmente 100 ml de etanol em um reator de teflon, seguidos de 15 ml de água e 4 ml de NH₄OH(28%) deixando-se em agitação magnética durante 20 minutos e então adiciona-se 3mL de TEOS e deixa-se agitando durante 1 hora. Após esse tempo neutraliza-se a solução com HCl e em seguida centrifuga-se a amostra a 3500rpm durante 10minutos, descartando-se o sobrenadante. Ressuspende-se o corpo de fundo com água centrifugando novamente na mesma velocidade e descarta-se o sobrenadante, esse procedimento é repetido durante 3x. Após essa “lavagem” deixa-se a amostra secar em uma temperatura de 75° C durante 24h.

3.3. Síntese Core@shell SiO₂@TiO₂

Realizaram-se dois procedimentos usando diferentes precursores:

- Sulfato de Titanila
- Isopropóxido de titânio.

Precursor Sulfato de Titanila: Inicialmente utilizou-se a técnica de DLS para saber o tamanho da sílica obtida. Para a síntese core@shell adicionou-se a sílica com diâmetro médio de partícula de (250 ± 20) nm em 30mL de etanol e o precursor em 20mL de água, deixando

ambos em ultrassom por 1 hora, para sílica e a 1h30min para o precursor, para melhor dispersão da amostra. Em um reator de teflon adicionou-se inicialmente a quantidade de sílica e adicionou-se mais 20 ml de etanol. Passados 30 minutos de agitação constante adicionou-se a solução com o precursor e deixou-se agitando durante 1 hora. Posteriormente, centrifugou-se a amostra durante 10 minutos a 3500 rpm, descartando o sobrenadante. O precipitado obtido foi resuspenso em água e centrifugado nas mesmas condições, esse procedimento de lavagem ocorreu 3x. Após isso adicionou-se 50mL de água no precipitado e agitou-se para dispersão e tratou-se hidrotermicamente em reator de teflon durante 24h à 105° C.

Precursor Isopropóxido de Titânio: Inicialmente deixou-se a sílica com diâmetro médio de partícula de (250 ± 20) nm em 30mL de isopropanol em ultrassom durante uma hora. Adiciona-se 50mL de isopropanol em tubo falcon e transfere-se a solução para um reator de teflon, deixando agitar durante 5 minutos. Em outro tubo falcon, adiciona-se 3mL de água, 6mL de isopropanol e a quantidade de precursor escolhida e essa solução é adicionada gota-a- gota no reator de teflon, fechando-o rapidamente após a adição da solução com o precursor. Deixou-se a solução agitando durante 20h. Decorrido esse tempo centrifugou-se a amostra e resuspende-se a mesma em 50mL de água, deixando em tratamento hidrotérmico a 105° C em reator de teflon durante 24h.

3.4. Adsorção de Ag

A adsorção de Ag baseou-se em colocar os filmes ormosils em solução de Nitrato de Ag (3M) em diferentes tempos, figura 3.1. Analisou-se a melhor % adsorvida no menor tempo para continuação do experimento.

Figura 3.1 - Esquema ilustrativo de adsorção de Ag nos filmes ormosils.

Para a irradiação com luz UV utilizou-se uma caneta de emissão de luz UV conforme mostra a figura 3.2 e a figura 3.3 refere-se ao espectro eletrônico obtido com a caneta após 10 minutos de irradiação. A caneta é uma lâmpada de Hg da marca Oriel, modelo 6048.

Figura 3.2 - Foto da irradiação das amostras dopadas com Ag, com a caneta UV.

Figura 3.3 – Espectro eletrônico ilustrativo das amostras SNP e CS100 dopadas com Ag após 10 minutos de irradiação com a caneta.

3.5. Microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG)

Tanto para sílica quanto para as nanopartículas core@shell $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ a morfologia foi estudada por microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo. O equipamento utilizado foi o Inspect F50, no Laboratório de Caracterização Microestrutural da Escola de Engenharia de São Carlos e do Instituto de Física de São Carlos. Este equipamento possui detector de elétrons secundários (SE) tradicional (Everhart-Thornley Detector) e um detector de elétrons retroespalhados (BSE) de alto contraste e baixa voltagem (vCD). As imagens com SE foram obtidas com 10kV e distância detetor-amostra de 2,9 mm e 3,2 mm. Para os estudos depositou-se 10 μL de uma suspensão aquosa (pH 5) das nanopartículas sobre uma placa de sílcio monocristalino de dimensões aproximadas de 1x1cm, previamente limpa. As amostras não foram metalizadas para análise.

3.6. Difração de Raios x (método do pó)

Para análise de fase e cristalinidade do recobrimento da nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ realizaram-se experimentos de difração de raios x, método do pó, em uma faixa de ângulo de Bragg entre 20 e 80° (2 θ), a uma velocidade de varredura de 0,03° / minuto, em um equipamento marca Bruker, modelo D8 Advance, operando a 40kV no modo step can e tempo de irradiação de 0,4s. Utilizaram-se amostras na forma de filme do pó de baixa granulometria. A preparação do filme seguiu o seguinte protocolo: uma pequena quantidade de amostra é espalhada sobre uma lâmina de vidro, utiliza-se uma leve prensagem vertical com outra lâmina para espalhamento do pó da amostra. O espalhamento por prensagem vertical é importante para evitar efeito de textura na amostra e com isto alterar o padrão de difração de raios X.

3.7. Espectroscopia Raman

A fase cristalina da titânia na partícula core@shell foi preliminarmente caracterizada por Espectroscopia Raman. O espectrômetro utilizado para a medida foi o RP-785 da LambdaSolutions, Inc., EUA. O espectrômetro estava acoplado via fibra óptica a uma plataforma de aquisição que simula um microscópio óptico dotada de lentes Nikon- L-150 A e usa uma fonte de radiação eletromagnética na forma de um Laser de diodo com diâmetro do feixe de 0,2mm. O comprimento de onda de emissão do laser é 785nm e a potência do laser

foi ajustada para 80mW. Cada espectro é o resultado da média de 105 espectros obtidos com tempo de aquisição de 30s. As amostras em forma de pó foram colocadas num porta amostra de alumínio e antes da análise ajustou-se o foco do equipamento para a análise.

3.8. Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

Utilizou-se para as análises de Espectroscopia Vibracional na região de Infra Vermelho um Infravermelho interferométrico (FTIR), modelo MB-102 (Bomem, Canadá), da Central de Análises Químicas do IQSC/USP. As pastilhas foram preparadas a partir de misturas de 2% das amostras na forma de ormosil em 100 mg de KBr (grau espectroscópico), previamente seco em estufa a 100°C durante 30 minutos. Os espectros foram obtidos com 64 varreduras acumuladas. A resolução usada foi de 4cm^{-1} na faixa de número de onda entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} .

3.9. Análise Semiquantitativa por Espectroscopia de Emissão de Raios X com detetor em modo de Energia Dispersiva (EDS)

Análise de Energia Dispersiva (EDS) foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQI/IQSC/USP) em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 200), com detetor de Si(Li) Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133eV à 5,9keV e área de 10mm^2 quadrado, acoplado a um Microscópio Eletrônico ZEISS LEO 440 (Cambridge, England). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, dead time de 30%, corrente de 3,09A e I probe de 3,5nA. A área da amostra analisada foi de $320 \times 320 \mu\text{m}$.

3.10. Microscopia de Força Atômica – Modo Tapping

Foi utilizado um microscópio AFM multimode, pontas do tipo: RTESP com cantiléver de 3.5-4.5 micras e frequência de ressonância entre 370 e 310 Khz, $K = 20\text{-}80\text{ N/M}$, Veeco. O programa de tratamento de imagens utilizado foi o Nanoscope Analysis.

Figura 3.6 - Microscópio AFM Multimode utilizado b) esquema de funcionamento
Fonte – (KELLY, 2006)

3.11. Análise Semi-Quantitativa por Fluorescência de Raios-X no Modo Dispersivo em Energia (EDXRF) - XRF

Para essas medidas utilizamos o Espectrômetro de Bancada Minipal 4 da Panalytical, tubo de emissor de raios X feito de Ródio(Rh) e a potência usada foi de 9W, com porta-amostra preenchido com gás hélio. As análises dos filmes foram depositados por *dip-coating* sobre silício (como descrito no procedimento experimental) para a análise de W, Ti e Ag. Essas medidas foram realizadas na Central analítica no Instituto de Química de São Carlos da USP.

3.12. Espectroscopia de Fotoelétrons de raios x (XPS)

As medidas de XPS no trabalho foram realizadas Laboratório de Físico-Nanoscópias y de Superfícies (INIFTA) Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina – pelos Drs. Aldo A. Rubert y Guillermo A. Benitez.

Os espectros de XPS dos filmes foram coletados usando uma fonte de $AlK\alpha$ não-monocromática (XR50, SPECS GmbH) e um analisador hemisférico de energia de elétrons (Phoibos 100, SPECS GmbH) operando a uma energia de passagem de 40 eV para os espectros completos (survey spectra) ou 20 eV para varreduras em alta resolução para os fotoelétrons provenientes de camadas mais internas (core-regions).

A correção da energia de ligação devido ao carregamento das amostras foi realizada usando

referência interna em todos os espectros usou-se o pico fotoelétrico do Si2p3/2 em 103,2 eV (Saliman, 1991), os fatores de correção ficaram entre -4,2 e -5,2 eV para todos os filmes. A posição dos picos, a largura-a-meia altura e a separação de energia entre os componentes de dupletos foi obtido usando-se dados publicados no banco de dados NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database [Alexander 2012; < <http://srdata.nist.gov/xps/Default.aspx> > acessado em 2 de março de 2015.) e o software de ajuste de curvas Winspec [gentilmente cedido pelo professor Jean-Jacques Pireaux do Departamento de Física da University of Namur, Namur, Bélgica]. O ajuste de curva seguiu os procedimentos recomendados por Leclerc e Pireaux (Gervais, 1995)

Figura 3.7- Imagem do equipamento de XPS utilizado em La Plata
Fonte – MILLONE (2011)

3.13. Avaliação da Resposta Fotocrômica dos filmes Ormosils com NP core@shell em função da quantidade do volume de NP core@shell adicionado.

As propriedades fotocrômicas dos filmes foram estudadas utilizando-se um sistema simulador da luz solar baseado em uma lâmpada de arco de Xe de 150 W, diâmetro de feixe

de 50 mm na distância de 30 cm do orifício de saída do feixe, faixa de comprimento de onda de emissão entre 290-400 nm, irradiância máxima de 750 W.m^{-2} (modelo 16S-150W, fabricado pela Solar Light Company, Inc., Filadélfia, EUA), figura 3.8. Os filmes dos ormosils foram preparados sobre vidro e depositado via técnica de *dip-coating*. As amostras foram irradiadas durante 5 minutos, o equivalente a $2,100 \text{ mJ/cm}^2$ de UV total (ou 100 MED - do inglês *Minimum Erythemat Dose*). Avaliou-se somente a quantidade de UVB em função da absorbância. A dose de radiação foi monitorada com um radiômetro TMA 2100. A distância entre a amostra e a saída da lâmpada foi fixada em 8 cm. A radiação térmica da lâmpada foi filtrada com filtro dicroico.

Figura 3.8: Aparato de irradiação solar utilizado para os testes de fotocromismo. (FERREIRA NETO, 2014)

3.2. CARACATERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS – ENSAIOS BIOLÓGICOS

Optou-se por separar as caracterizações por se tratar de um ensaio biológico. Todos realizados de microbiologia e medidas de AFM e XPS foram realizadas no estágio no INIFTA, La Plata, Argentina.

3.2.1. Esterilização dos materiais

Todos os materiais que são usados no ensaio são esterilizados em auto-clave a 1 atm de pressão. Deixa-se tempo suficiente para alcançar a temperatura de 121 °C e deixa-se esterilizando por 20 minutos.

3.2.2. Preparação do cultivo bacteriano

Nesse trabalho empregou-se microrganismo de relevância clínica, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Em ambos os casos, os microrganismos cresceram em ágar nutritivo (Merck, Darmstadt, Germany) durante 18 h a 37 °C. A preparação dos cultivos bacterianos líquidos consistiu em inocular uma alça do microrganismo (cultivado previamente em ágar nutritivo) em 200mL de caldo nutritivo, incubando 28 – 30°C por 18 h com agitação mecânica. (250 rpm). Finalmente as suspensões bacterianas empregadas no ensaio se ajustaram até alcançar uma absorbância de 0,5 a 580nm no espectrofotômetro Perkin Elmer.

3.2.3. Preparo dos filmes para ensaio

Para o preparo dos biofilmes inicialmente esteriliza-se o material que vai ser utilizado. Para manter a esterilidade de todo o material deixa-se os materiais (ormosil sobre vidro com e sem Ag) em luz UV (Philip TUV 30W – Ultra Violet UV-C/ 4k) durante 24 h para que ao filme esteja isento de contaminação externa. A distância entre a lâmpada e as amostras é próxima de 1,5m.

Figura 3.9 - Esquema de esterilização dos filmes ormosil pré-ensaio. Filmes são colorados em quarto com Luz UV durante 24h para esterilização e posterior preparo do biofilme.

3.2.4. Preparo de biofilme

Para preparo do biofilme, deixam-se as placas de vidro com as amostras em um becker com a solução contendo bactérias (DO= 0,5) (ver 3.10) durante 2 h. Após isso se retiram as placas lavando-as com água. Com o propósito de separar as bactérias do substrato para posterior contagem em placa, as amostras são colocadas em tubos de ensaio contendo 2mL de água estéril e os tubos são sornicados em um sonicador Testlab (Testlab SRL, Bernal Oeste, Buenos Aires, Argentina) durante 20 minutos. Nestas condições as bactérias passam para a solução sem perder sua viabilidade.

Figura 3.10 - Esquema de formação de biofilme, desde a colonização até a diluição para plaqueamento (etapas resumidas).

Após isso se realiza a diluição seriada (1:10) da solução para realizar a contagem de bactérias. A diluição seriada é feita retirando-se alíquotas de 100µL da solução contida no tubo de ensaio e transfere-se para um eppendorf com 900µL de água. As diluições sucessivas são realizadas retirando-se alíquotas de 100µL do eppendorf e transferindo-se para o eppendorf seguinte, que já contem 900µL de água.

Dilui-se com intuito de realizar melhor contagem de bactérias, sendo que o valor ótimo para esse ensaio deve ser em 30 e 300 colônias formadas na placa. O esquema ilustrativo de diluição é mostrado na figura 3.11.

Figura 3.71 - Esquema ilustrativo de diluição e plaqueamento.

Goteja-se na placa contendo ágar 100µL da solução contida no eppendorf e espalha-se com alça Drigalski de vidro. A placa é deixada em quarto estufa até que seja possível a contagem de bactérias, em torno de 24 h representada na figura 3.12.

Figura 3.82 - Exemplo de uma placa após 24 h para contagem de colônias (30 à 300 colônias), utilizada no trabalho.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (FEG)

4.1.1 SiO₂

Analisando a figura 4.1 pode-se notar o panorama geral das partículas de SiO₂. Na imagem 4.1 verificam-se partículas esféricas, com tamanho médio em torno de 260 ± 20 nm, portanto, submicro-partículas de sílica.

Figura 4.1 - Imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Varredura com detector de elétrons secundários do filme de partículas de SiO₂ sobre silício monocristalino.

As partículas foram analisadas, montando o histograma apresentado na figura 4.2. As

partículas menores apresentam tamanho de 80nm e as maiores em torno de 400nm, porém a grande maioria apresenta tamanho médio de 260nm com desvio médio de 20nm.

Figura 4.2 - Histograma das submicropartículas de sílica

4.1.2 SiO₂@TiO₂

Realizou-se várias tentativas de recobrimento com o precursor sulfato de titanila em solução aquosa a pH 5 e T= 25°C, A concentração molar de precursor foi variada entre **3,13 x10⁻⁴ mols** e **2,19 x10⁻³ mols** de precursor. Notou-se que mesmo com uma quantidade alta de precursores não houve um bom recobrimento, ocorre formação de aglomerados de dióxido de titânio na Figura 4.3 mostram as morfologias obtidas para as nanopartículas SiO₂@TiO₂. A figura 4.3 mostra setas vermelhas mostrando regiões de SiO₂ não recobertas com TiO₂, enquanto a seta azul mostra uma região com aglomerado de TiO₂.

Figura 4.3: Microscopia eletrônica das sínteses core@shell com a) 50m e b) 100mg c)220mg d)350mg. As setas vermelhas indicam as regiões não recobertas com TiO_2 , enquanto a seta azul mostra um aglomerado de TiO_2 .

Na imagem temos diversos volumes adicionados nos core@shell. As setas vermelhas indicam regiões que não houve recobrimento de partícula, ou seja, regiões somente com partículas de sílica, enquanto a seta azul evidencia um aglomerado de titânio. Em todas as imagens conclui-se que esse método não resulta em um recobrimento core@shell efetivo.

A partir deste resultado negativo com o sulfato de titanila, realizaram-se novamente a síntese, entretanto trocando-o pelo precursor isopropóxido de titânio, $[\text{Ti}(\text{O}_i\text{Pr})_4]$ onde $i\text{Pr}$ = isopropila. As imagens são mostradas na Figura 4.4.

Figura 4.4 - Micrografia obtida por FEG-SEM de do filme de nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ obtidas pela adição de 200 μL e 350 μL de isopropóxido de titânio

O resultado com $[\text{Ti}(\text{O}_i\text{Pr})_4]$ se mostrou superior àquele obtido com TiOSO_4 como mostra a figura 4.4. Pode-se verificar um recobrimento das amostras de uma maneira geral e formação de uma película rugosa. Nota-se uma maior homogeneidade no recobrimento de titânia das nanopartículas de sílica quando comparamos àquela obtido pelo procedimento anterior. Uma micrografia de uma região mais ampliada pode confirmar esse recobrimento, apresentada na figura 4.5. As partículas apresentam tamanho médio próximo de 260nm e 280nm com 200 μL e 350 μL de isopropóxido de titânio, respectivamente na figura 4.6.

Figura 4.5 - Micrografia obtida por FEG-SEM de do filme de nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ obtidas pela adição de 200 μ L de Isopropóxido de Titânio mostrando a homogeneidade de tamanho e recobrimento das nanopartículas.

Figura 4.6 - Micrografia obtida por FEG-SEM do filme de nanopartículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ obtidas pela adição de 350 μL de Isopropóxido de Titânio. A seta A marca um conjunto de nanopartículas sem revestimento de titânia e a seta B marca um conjunto $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$.

Comparando-se as imagens nas figuras 4.5 e 4.6 fica claro que as NPs $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ obtidas com menor quantidade de precursor são mais homogêneas, pois, na figura 4.6 observam-se nanopartículas de SiO_2 com algum recobrimento, flecha A (vermelha), e regiões sem recobrimento, flecha B (verde).

Observando os resultados de microscopia optou-se em trabalhar com a amostra obtida com Isopropóxido de titânio com 200 μL e 300 μL de precursor.

4.1.3. Espectroscopia Raman

Isopropóxido de titânio

Figura 4.7 - Espectro Raman de filmes de partículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ usando $(\text{Ti}(\text{O}_i\text{Pr})_4$. Espectro inferior é das amostras obtidas usando 200 μL de $(\text{Ti}(\text{O}_i\text{Pr})_4$, enquanto o superior é das amostras obtidas usando-se 350 μL de $(\text{Ti}(\text{O}_i\text{Pr})_4$

Analisando o espectro Raman da amostra, encontramos apenas os picos em 399, 513 e 637 cm^{-1} para ambas as amostras atribuídas à fase cristalina chamada de anatase. Confirma-se através dessa técnica, assim como a microscopia, o recobrimento das amostras com TiO_2 , mas sobretudo a obtenção seletiva da fase anatase, que possui maior atividade fotoquímica.

4.1.4. Difração de Raio X- Método do Pó

Os resultados de difração nos mostram os picos característicos da anatase sobreposto ao halo amorfo, característico da sílica. Esse resultado nos mostra a formação do core@shell

com a fase anatase, difratograma apresentado na figura 4.8.

Figura 4.8 - Difratograma obtido para amostra core@shell com precursor 200uL de isopropóxido de titânio, mostrando os picos característicos da anatase

4.1.5. Análise de EDS

Figura 4.9 - EDS da amostra de ormosil CS200μL de isopropóxido de titânio em pó

O resultado de EDS nos mostra as quantidades de Si e Ti na amostra. O resultado é mostrado na tabela 4.1:

Tabela 4.2 - Resultado de análise semi-quantitativa por EDS da amostra CS200 μ L.¹

Elemento	Element (%)	Atomic (%)
O	51,66	67,19
Si	38,53	28,55
Ti	9,81	4,26

4.2. Ormosil dopados com fosfotungstato e diferentes volumes de core@shell

O core@shell preparado e analisado foi adicionado em diferentes volumes nos ormosils dopados com fosfotungstato. Os mesmos foram utilizados para verificar a resposta fotocromica e também capacidade bactericida.

4.2.1. Espectroscopia Raman

O espectro Raman da figura 4.10 mostra o espectro para amostra não-dopada e dopada com 1000 μ L de core@shell. Não há uma diferença entre as bandas e nota-se ausência de bandas características das fases da titânia devido a baixa concentração utilizada no core@shell.

No espectro vemos as bandas em 1005 cm^{-1} e 987 cm^{-1} que podem ser atribuídas aos modos $\nu_{\text{sym}}(\text{W}-\text{O}_t)$ e $\nu_{\text{ass}}(\text{W}-\text{O}_t)$, ou seja, de estiramento simétrico e assimétrico da ligação tungstênio-oxigênio terminal, enquanto a banda em 516 cm^{-1} está associada as deformações angulares dos óxidos em ponte do tipo O_{2c1} e O_{2c2} , modos $\delta(\text{W}-\text{O}_{2c1}-\text{W})$ e $\delta(\text{W}-\text{O}_{2c2}-\text{W})$.

Devido à similaridade entre a posição das bandas no HPW hidratado e no fosfotungstato ocluso no filme de ormosil na presença e na ausência das partículas pode-se concluir que o ambiente químico em torno do fosfotungstato deve ser muito similar ao do fosfotungstato no cristal hidratado. Ou seja, dentro do ormosil o fosfotungstato deve estar solvatado por moléculas de água. Porém, o mais interessante é o que não se pode ver no espectro, não se vê as bandas da anatase. Isto porque a concentração que se usou é realmente muito baixa, por isto usamos o termo dopagem.

¹ Os resultados mostrados aqui não levam em consideração a percentagem de carbono, hidrogênio, nitrogênio e água.

Figura 4.10 - Espectro Raman para o filme de ormosil não-dopado e dopado com o maior volume de core@shell $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$

4.2.2. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (FTIR)

Figura 4.11 - Espectro de absorção na região do infravermelho dos filmes de ormosil não dopado e dopado contendo o maior teor de core@shell adicionado

A figura 4.11 nos mostra o espectro referente ao espectro infravermelho para o ormosil não-dopado e para o filme feito a partir da suspensão com o maior teor de core@shell

adicionado.

Nos espectros da Figura 4.11 podemos observar:

a) uma banda larga em torno de 3400cm^{-1} que é característica da deformação axial da ligação O-H, provenientes dos grupos silanóis Si-OH, de água presente na amostra ou de grupos $\text{CH}_2\text{-OH}$, originários da abertura do anel oxirana do silano GLYMO. (SILVERSTEIN, 1990).

b) bandas em 2976 cm^{-1} , 2937 cm^{-1} e 2879 cm^{-1} , deformações axiais das ligações C-H dos Grupos metila e metileno proveniente da estrutura dos organosilanos. (SILVERSTEIN, 1990).

c) banda fraca em 2255 cm^{-1} deformação axial da ligação CN do grupo Nitrila, proveniente da estrutura da 4-Butironitrilatrietóxissilano (BuTS), que é ampliada na imagem (BRIDGEMAN, 2003.)

d) banda na região de 1200-1020, estiramentos das ligações Si-O e Si-O-Si dos Grupos siloxanos mostrando a formação da rede tridimensional do xerogel de sílica, gerada pelas reações de hidrólise e condensação dos alcóxidos de silício. (NAKAMOTO, 1986.)

e) bandas na região de $980\text{-}820\text{ cm}^{-1}$, e deformação axial das ligações W=O e W-O-W indicando a presença do fosfotungstato aprisionado (BRIDGEMAN, 2003)

A região de ligações siloxanos (SOCRATES, 2011; NAKAMOTO, 2008.) Si-O e Si-O-Si apresenta-se sobreposta na região que compreende de 1020cm^{-1} a 1200cm^{-1} , região do HPW (NAKAMOTO, 2008). Os resultados de interação fosfotungstato com as nanopartículas core@shell estão de acordo com Sun, 2010.

4.2.3. Resposta fotocromica de filmes de Ormosils Dopadas com partículas core@shell

Analisando-se o espectro eletrônico na região de UV-Vis dos filmes após irradiação com UV nota-se um aumento de absorbância para todas as amostras. As sub-micropartículas de sílica decoradas com nanopartículas de TiO_2 formando o core@shell foram suspensas em etanol até obter uma suspensão de concentração de 0,1% (m/v). Foram preparados os filmes de ormosil sobre vidro contendo os seguintes volumes de suspensão 0,1 % de core@shell $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$: SNP, 20 μL , 50 μL , 100 μL , 500 μL e 1000 μL . A avaliação preliminar da resposta fotocromica se deu com o tempo de 5 minutos de irradiação UV, figura 4.12.

Figura 4.12 - Espectro UV-vis após 5 minutos de exposição ao UV

Esse mesmo dado foi colocado em forma de tabela para facilitar a visualização da resposta fotocromica. Os dados mostrados estão divididos pela massa dos filmes.

Figura 4.13 - Gráfico de barras mostrando a resposta fotocromica, medida pela absorbância integrada entre 400 e 800nm, normalizada pela massa dos filmes dopados com diferentes teores de partículas $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$

A Figura 4.12 mostra que para uma mesma dose de radiação há um comportamento não-

linear da absorbância da banda de transferência de carga do fosfotungstato fotoreduzido com o volume de suspensão de submicro-partículas, a figura 4.13 é um gráfico de barras para visualizar com maior clareza a diferença de resposta. É notável a melhor resposta para os ormosils CS50 e CS100.

A dopagem com TiO_2 ou $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ pode aumentar o fotocromismo do HPW pela transferência de elétrons da banda de condução do TiO_2 para o LUMO do HPW, formando o heteropolyblue. Entretanto, em excesso o TiO_2 pode atuar bloqueando a radiação que permite a foto-redução direta do HPW pela absorção de UV-B pela banda de transferência de carga ligante metal $\text{O} \rightarrow \text{W}$ do HPW por volta de 266-270 nm. Deve-se observar que o TiO_2 absorve radiação com comprimento de onda abaixo de 360 nm mais ou menos, por isso pode atuar como filtro da radiação.

4.3. Ormosils core@shell dopados com Ag

A figura 4.14 nos mostra o espectro obtido com XRF com diferentes tempos de imersão em AgNO_3 .

4.3.1. Isoterma de Sorção Obtida por Fluorescência de raio X (XRF)

No intuito de encontrar o melhor tempo de imersão dos filmes para adsorção de íons prata (Ag^+) de solução foram obtidas isotermas de adsorção. O experimento foi monitorado desde o primeiro minuto até 60 minutos, com tempo ótimo em 10 minutos apresentando em torno de 2% de Ag nos filmes. Dessa maneira todo estudo baseou-se nesse tempo de sorção.

Figura 4.14 - Gráfico de %Ag x Tempo de adsorção, variando de 1 minuto até 60 minutos de imersão em AgNO_3 (3M).

4.3.2. Caracterização dos Filmes ormosil core@shell dopados com Ag

4.3.2.1. Espectroscopia Eletrônica ou UV-Vis

O espectro UV, figura 4.15, mostra uma banda plasmônica centrada em torno de 420nm, que aumenta com o tempo de exposição de luz UV, o que era esperado devido à maior redução de íons Ag para Ag metálica. Também é possível verificar a mudança de coloração para amarelada após irradiação, característica de nanopartículas de Ag.

Figura 4.15 - Espectro eletrônico UV-vis em diferentes tempos de imersão para o ormosil CS100.

Uma característica importante de ressaltar na figura 4.15 é que com a amostra irradiada com apenas 1 minuto notamos uma banda larga e de menor intensidade em torno de 700nm que é característica da redução do HPW (PAPACONSTANTINO, 1989). Isso é de grande importância, pois o mesmo pode ser o agente redutor da Ag, assim como o core@shell, reduzindo os cátions Ag^+ e formando partículas metálicas. Essa posição de banda sugere partículas com tamanhos próximos de 30nm (AGNIHOTRI, 2014; SHANMUGAM, 2007). Observa-se também uma banda larga em torno de 700nm que é característica do fosfotungstato em seu estado heteropolyblue.

No material que trabalhamos podemos ter dois agentes redutores, a titânia e o HPW, como mostra a figura ilustrativa abaixo:

Figura 4.16 - Esquema ilustrativo da possível redução dos cátions Ag

Ainda nesse tópico podemos ter dois tipos de reações, como já foi dito, ou seja: redução através das partículas do core@shell ou redução através do HPW. A figura 4.17 nos mostra o possível mecanismo que ocorre nesse processo de redução da Ag pelo HPW.

Figura 4.17 - Esquema ilustrativo da interação do ormosil após adição de Ag e após irradiação com Luz UV

Sobre a foto-redução de Ag o processo é bem simples. O elétron no LUMO do fosfotungstato ou ele fotoreduzido possuem potencial de redução suficientemente positivo para promover a redução dos íons prata adsorvidos na superfície, formando nanopartículas metálicas de prata, como pode ser evidenciado pelo aparecimento da banda de ressonância de plasmons, mostrada na figura do espectro eletrônico UV-VIS na figura 4.15, que compreende a região de 350nm até 500nm.

Essa redução pode ocorrer de duas maneiras:

Figura 4.18 - Esquema redução da Ag.

Umas das propostas são:

- A) Ao irradiarmos a amostras ocorre redução do HPW que por sua vez transfere-se o elétron para o TiO_2 . Esse elétron é transferido para banda de condução e através de difusão e nucleação reduz a Ag.
- B) O HPW transfere o elétron do orbital LUMO para o íon Ag, reduzindo a Ag (+) para Ag metálica.

Ao irradiarmos a amostra temos uma mudança de coloração típica do material. Na figura 4.19 vemos 3 filmes, sendo o primeiro somente o Ormosil (a), (b) tem metade do filme com Ag adsorvida e (c) com Ag adsorvida em toda a superfície. A coloração correspondente a redução do HPW (azul) característica da Ag metálica (amarela) é verificada após irradiação.

Figura 4.19 - Imagem ilustrativa para demonstrar a coloração apresentada após redução do HPW (azul) e Ag (amarelo).

A figura 4.19 representa a diferença de coloração para o filme ormosil somente com HPW e quando o mesmo está dopado com Ag. O filme A é somente o ormosil fosfotungstato dopado com core@shell (coloração azulada), o B está parcialmente dopado com Ag e dessa maneira podemos ver a diferença da presença da Ag (região amarelada) e o C está totalmente dopado com core@shell e Ag. Esses filmes foram expostos durante 10 minutos em ambiente aberto, com luz natural do sol.

4.3.3. Microscopia Eletrônica de Varredura em Modo FEG

4.3.3.1. Medida da superfície dos ormosils

Através da Microscopia Eletrônica de varredura avaliou-se a superfície dos filmes de ormosil dopados com partículas core@shell, porém com crescente teor de partículas adicionadas na forma de suspensão. Observando as imagens na Figura 4.20 é possível verificar que com o aumento da quantidade de partículas core@shell adicionadas aumentam o número de protuberâncias sobre a superfície com uma mudança mais pronunciada do filme CS500 para CS1000. Neste filme ocorre uma texturização do filme com as protuberâncias se alinhando na diagonal do filme.

No intuito de conhecer mais detalhes sobre a topografia da superfície destes filmes de ormosil dopados usou-se a Microscopia de Força Atômica. As amostras selecionadas foram SNP, CS20, CS100 e CS1000 para análise com bactérias e adsorção de nitrato de Ag.

Figura 4.20 - Micrografias obtidas por Microscopia eletrônica de varredura dos filmes dopados com diferentes volumes de nanopartículas core@shell $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$

Outra evidência que nos mostra a formação e interação de NPs de Ag com o core@shell é através da microscopia eletrônica. As imagens mostradas na micrografia 4.21 mostram as partículas core@shell dopadas com titânio e com partículas de Ag. Para evidenciar e confirmar a presença do titânio e da Ag realizou-se o linescan da mesma.

Figura 4.21 – Imagem obtidas por FEG-SEM de conjunto de partículas core@shell de $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$

Verificando-se essa diferença de coloração se optou por realizar line scan e mapeamento para poder confirmar a presença de Ag e titânio, como mostram as próximas imagens. Na imagem vemos claramente o linescan que evidência as área referente ao titânio (linha azul) e a linha referente à Ag (linha laranja).

Figura 4.22 - Imagens obtidas por FEG-SEM de conjunto de partículas core@shell de $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ dopadas com Ag. Line scan evidenciando a presença de TiO_2 e Ag ao redor da sílica

4.3.4. Análise de Microscopia de Força Atômica (AFM)

Através da técnica de AFM investigou-se a superfície das amostras de Ormosil, Ormosil com Ag (não irradiada) e Ormosil com Ag após irradiação, com intuito de serem obtidas as rugosidades das superfícies, e também as mudanças de morfologia dos filmes após adição de Ag. Além da morfologia superficial avaliou-se o R_q das amostras em uma maior área, pois se sabe que a rugosidade é um parâmetro de grande importância para a formação de biofilmes. (MORGAN,2001).

Avaliou-se a rugosidade em dois tamanhos $1\mu\text{m}$ e $10\mu\text{m}$. A medida em $10\mu\text{m}$ é mais representativa da superfície, pois é uma região maior e conseqüentemente é possível ter um panorama mais completo da superfície da amostra. As rugosidades nas amostras de $1\mu\text{m}$ modificam-se muito devido a região analisada, presença de vales ou aglomerados que nesse tamanho de análise modificam muito o valor final.

As amostras analisadas foram às mesmas. Inicialmente analisou-se o ormosil sem Ag, depois realizamos o procedimento de adsorção de nitrato de Ag nas amostras e medimos e por

fim irradiamos a mesma durante 10 minutos com caneta UV.

Inicialmente abordam-se as rugosidades das amostras. Não é possível notar uma similaridade nos resultados e nem uma tendência em relação às amostras medidas com 1 μ m, entretanto para as medidas em 10 μ m o resultado das rugosidades para as amostras sem Ag e com Ag após irradiação, mostram um aumento da rugosidade com aumento de quantidade de core@shell adicionado, porém não há um padrão para as mesmas amostras após imersão em Ag.

Tabela 4.2 - Média dos resultados de Rq para amostra de 1 μ m².

Amostra	1μm			
	SNP	CS20	CS100	CS1000
Sem Ag	0,618	1,34	1,65	0,985
Com Ag não irradiado	0,984	1,75	0,668	2,24
Com Ag irradiado	2,21	0,735	0,313	0,726

Amostra SNP

Figura 4.23 - Comparação da amostra SNP em diferentes condições: **a)** Sem Ag (2d e 3d) **b)** Com Ag não irradiada (2d e 3d) **c)** Com Ag após irradiação (2d e 3d)

Amostra CS20

Figura 4.24 - Comparação da amostra CS20 em diferentes condições: **a)** Sem Ag **b)** Com Ag não irradiada **c)** Com Ag após irradiação.

Amostra CS100

Figura 4.25 - Comparação da amostra CS100 em diferentes condições: **a)** Sem Ag **b)** Com Ag não irradiada **c)** Com Ag após irradiação

CS1000

Figura 4.26 - Comparação da amostra CS1000 em diferentes condições: a) sem Ag b) com Ag não irradiada c) com Ag após irradiação

Na imagem 4.26 - C é importante ressaltar que foram colocadas duas imagens em 2d em diferentes ampliações. Ao analisarmos as imagens vemos uma tendência em relação às amostras com nanopartículas de Ag não irradiadas e irradiadas. É possível verificar algo nítido que é o aumento em quantidade de nanopartículas de Ag e também a diminuição de tamanho (comprimento) das mesmas. A altura das partículas não difere significativamente. Outra característica é que após irradiação notamos as partículas arredondadas, como na imagem mostrada na Figura 4.27, na qual é possível ver as partículas com perfil mais arredondado. A imagem 4.27 é uma figura ilustrativa para os ormosils com Ag sem irradiar e irradiados. Optou-se por colocar uma imagem ilustrativa, visto que o comportamento é o mesmo para todas as amostras. Na imagem notamos as colorações vermelha, azul e verde, que são as anotadas na tabela 4.3.

Cross section

Figura 4.27 - Perfil ilustrativo de altura de uma seção horizontal da superfície dos ormosils com Ag antes de irradiar e após irradiação

Nos ormosils sem Ag nota-se uma superfície mais homogênea com alguns aglomerados que podem ser provavelmente aglomerados de HPW que ficaram na superfície durante a preparação ou formados durante o processo de secagem que é ao ar natural do ambiente.

Nota-se uma diminuição no tamanho nas partículas de Ag, pois nas amostras sem irradiar apresentam tamanhos maior, em torno de 60nm e as partículas após irradiação chegam a apresentar tamanhos de até 20nm, com média em torno de 30nm.

A formação de NP de Ag também é comprovada pela coloração amarelada apresentada após irradiação das mesmas, além das análises de microscopia FEG e espectroscopia UV, apresentados nessa seção de resultados anteriormente.

Não é notado uma tendência linear em relação à rugosidade das amostras quando adicionamos Ag e irradiamos. Cada amostra apresenta um comportamento diferente. É importante ressaltar que a medida de rugosidade nas amostras de 1µm pode alterar-se muito devido a presença de vales ou aglomerados de amostras.

Tabela 4.3 - Valores de tamanho: seção transversal das amostras: com Ag não irradiadas (NI) e após irradiação(I).

Amostra	Azul (nm)	Vermelho (nm)	Verde (nm)	Média (nm)
SNP_Ag_NI	90	75	54	73
SNP_Ag_I	65	75	65	68
CS20_Ag_NI	145	100	-	122.5
CS20_Ag_I	53	51	51,5	52
CS100_Ag_NI	37	45	-	41
CS100_Ag_I	52	54	44	50
CS1000_Ag_I	32	34	37,5	34,5

Medindo-se a seção transversal verifica-se partículas menores nos filmes, porém as medidas são as que estão em evidência. Há vários tamanhos e alguns aglomerados. A tabela 4.3 mostra os valores das partículas medidas e as médias das mesmas.

Dessa maneira com a análise de AFM pode-se verificar a presença das nanopartículas de Ag e tamanho das mesmas. Também pode-se verificar em todas as amostras um aumento em quantidade de NPs de Ag após irradiação e uma diminuição da rugosidade para as amostras após adição de Ag e irradiação.

Tabela 4.4 - Valores de Rq (nm) para análise em 10µmx10µm.

Amostra	Sem Ag	Com Ag irradiada
SNP	3,46	1,76
CS20	10,7	5,47
Cs100	11,5	8,3
Cs1000	11,2	2,51

Analisando-se as rugosidades das amostras em 10µm notamos uma diminuição na rugosidade nas amostras com Ag após irradiação. Em todas as amostras utilizadas as rugosidades são menores nas amostras com Ag. As imagens obtidas nesta escala nem sempre permitem ver com clareza as nanopartículas de Ag nos filmes, como por exemplo, nas

imagens da amostra CS100.

Comparação amostras 10 μ m sem Ag e com Ag após irradiação

Analisaram-se também através de AFM as amostras no tamanho de 10 μ m, no intuito de verificar o comportamento da rugosidade dos filmes. Nota-se que há uma diminuição da rugosidade para as amostras com Ag após a irradiação, com exceção da amostra CS1000 que apresenta rugosidade próxima àquela observada para a amostra SNP.

Figura 4.28 - Comparação amostras a) SNP, b) CS200, c) CS100, d) CS1000 sem Ag (lado esquerdo) e com Ag após irradiação (lado direito).

4.3.5. XPS – Espectroscopia de fotoelétrons

Resultados de Ag para amostras SNP -

O espectro de fotoemissão XPS na região dos picos fotoelétrico para o $W4f_{7/2}$ e $W4f_{5/2}$ apresentam uma forma assimétrica. O pico assimétrico foi ajustado com uma função de linha base do tipo Shirley, dois dubletos de forma de linha pseudo-Voigt² para os picos $W4f_{7/2}$ e $W4f_{5/2}$ e duas funções pseudo-Voigt singleto para os picos fotoelétricos do $W 5p_{3/2}$ com auxílio da base de dados NIST (<http://srdata.nist.gov/xps/>) e com o programa *WinSpec*.

Figura 4.29: Espectro completo da análise de XPS para o filme ormosil, indicando os elementos presentes (N e Ag apresentam energias muito próximas) .

Os valores de energia de ligação (EL) para os dubletos do $W4_f$ são mostrados na tabela a seguir.

² As linhas do tipo Pseudo-Voigt usadas são combinações lineares entre funções Gaussianas e Lorentzianas (http://sasfit.ingobressler.net/manual/Gaussian-Lorentzian_Sum).

Tabela 4.5 -. Valores de Energia de Ligação (EL) obtidos por XPS para os picos de fotoemissão da $W4f_{7/2}$ e $W4f_{5/2}$ nos filmes de ormosils não irradiados (NI) e irradiados (I) com radiação UV.

	<u>SNP</u>		<u>SNP_Ag_NI</u>		<u>,SNP_Ag_I</u>	
	<u>EL</u>	<u>Área</u>			<u>EL</u>	<u>Área</u>
Dubleto 1	35,4	42,8%	35,2	40,4%	35	36,9%
Dubleto 2	36,9	43,6%	36,7	49.1%	36,4	57.3%

	<u>CS1000</u>		<u>CS1000 AG NI</u>		<u>CS1000 Ag I</u>	
	<u>EL</u>	<u>Área</u>			<u>EL</u>	<u>Área</u>
Dubleto 1	35	35.4%	35,2	48.6%	34,9	32.0
Dubleto 2	36,6	54.7%	36,6	42.3%	36,2	69.4

Figura 4.30: Espectro de XPS para os elementos W4f para os ormosils SNP e CS1000 dopados com Ag, antes de irradiar (NI) e depois de irradiar (I).

Os resultados da Tabela 4.5 mostram a presença de dois dubletos para os picos fotoelétricos do W4f caracterizando a presença do elemento W em dois estados de oxidação ou em dois ambientes químicos diferentes (FURLANI,1981; Michael W. 2011)..

Como não há evidência de decomposição da estrutura Keggin do fosfotungstato por medidas de Espectroscopia Raman ou Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho podemos inferir que a presença dos dubletos não se deve à decomposição dos polioxoânions. Oliveira e colaboradores estudaram nanocompósitos de polioxoânions e entre eles o fosfotungstato com acetato butirato de celulose (Oliveira2002). Nestes estudos eles observaram que o fosfotungstato disperso no éster de celulose apresenta o pico $W4f_{7/2}$ em 35,1 eV, ou seja, 1eV menor que no cristal de ácido fosfotungstato hidratado. Este deslocamento na EL $W4f_{7/2}$ foi atribuído à energia de relaxação intermolecular maior no nanocompósito. Portanto, similar efeito pode ser responsável pelos picos de $W4f_{7/2}$ em torno de 35 eV, contudo, outra hipótese pode refletir a presença de W^{5+} de heteropolyblues, $[PW^{5+}W_{11}^{6+}O_{40}]^{4-}$ formados no processo de foto-redução do fosfotungstato. Esta fotoredução ocorre com a oxidação da matéria orgânica do Ormosil pelo fosfotungstato no estado excitado 1MLCT (singleto *Metal-to-Ligand Charge Transfer*). O pico em torno de 36,1 eV foi atribuído por proximidade ao fosfotungstato em ambiente químico similar ao do cristal, ou seja, envolvido em extensa rede de ligações de H com $H_5O_2^+$ hidratado.

Tabela 4.6 - Valores de Energia de Ligação (EL) obtidos por XPS para os picos de fotoemissão da Ag 3d nos filmes de ormosils não irradiados (NI) e irradiados (I) com radiação UV.

Amostra	Dublete 1 (Ag 3d _{5/2})			Dublete 2 (Ag 3d _{5/2})		
	EL1 (eV)	Γ1 (eV)	A1 (%)	EL2 (eV)	Γ2 (eV)	A2 (%)
SNP_Ag_NI	368,9	1,24	76	369,0	1,24	24
SNP_Ag_I	368,3	1,20	92	369,5	1,20	8
CS1000_Ag_NI	368,2	1,20	72	368,7	1,20	28
CS1000_Ag_I	368,0	1,12	92	368,9	1,12	8

Figura 4.31: Espectro de XPS para o elementos Ag 3d para os ormosils SNP e CS1000 dopados com Ag, antes de irradiar (NI) e depois de irradiar (I).

Os valores de energia de ligação para a Ag obtidos a partir do ajuste de curvas dos espectros de XPS dos ormosils são mostrados na tabela 4.6. Todos os filmes mostram dois dubletes para a Ag 3d indicando duas espécies químicas de Ag presentes na amostra ou espécies submetidas a efeitos de estado final diferentes. Após a irradiação os dois dubletes permanecem presentes, entretanto o dublete com a linha Ag 3d_{5/2} apresenta um crescimento na área relativa (A1). O valores de energia de ligação do pico Ag 3d_{5/2} pra o primeiro dublete (EL1) podem, baseado nos dados da literatura, ser atribuídos à Ag metálica como ao cátion Ag⁺ em AgNO₃ ou Ag₂O, portanto, infelizmente não é possível através do XPS se certificar da natureza química exata da espécie de prata responsável por este dublete. Já o segundo dublete com pico Ag 3d_{5/2} acima de 369 pode segundo a literatura ser atribuída ao cátion Ag⁺ próximo dos sítios Si-O⁻¹ no silicato do ormosil (GRUNERT,1993).

4.4. Estudo da adesão e viabilidade das bactérias aderidas nos substratos Ormosils

Nessa seção serão descritos os ensaios realizados no intuito de avaliar a eficiência da ação antibacteriana dos revestimentos do tipo filme de Ormosils+core-shell e ormosil+core-shell+Ag na frente as bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Pseudomona aeruginosa* (*P. aeruginosa*), respectivamente classificadas como Gram(+) e Gram (-). Essa seção será subdividida em: a) contagem de placas, b) Microscopia eletrônica de Varredura, c) Microscopia de Epifluorescencia com Kit LIVE/DEAD, d) teste do halo de crescimento e e) teste de reaproveitamento. Os resultados aqui apresentados também serão separados por bactérias, para melhor compreensão dos resultados.

O fluxograma de preparo para as análises é mostrado abaixo. Todos os filmes testados passaram por esse procedimento. As amostras submetidas às análises b; c; d; e, foram somente lavadas com água, sem passar pelo procedimento de ultrassom (utilizado para retirar as bactérias do filme e passar para a solução).

Figura 4.32 - Esquema ilustrativo do preparo da solução de bactérias

Para esse capítulo de bactérias optou-se por fazer uma discussão geral no final do capítulo com ambas as bactérias para facilitar as comparações e resultados obtidos.

4.4.1. Ensaios com *Staphylococcus aureus*

A) Teste de Contagem de Colônia em Placa de Cultura

1. Filmes Ormosils e Ormosils dopados somente com Nanopartículas Core-shell

Assim como descrito no procedimento experimental foram realizados experimentos com o substrato de vidro como controle em comparação com o filme Ormosils em substrato de vidro. Avaliou-se a amostra SNP, CS20, CS100 e CS1000. Na figura 4.33 observa-se que tanto sobre vidro como sobre o vidro revestido com filme de ormosil com e sem partículas de core@shell há proliferação de colônias de *S. aureus*. Contudo todos os substratos com ormosil apresentam uma diminuição na adesão de bactérias quando comparadas com o vidro ($p > 0,05$). Portanto, podemos concluir que o revestimento de filme de ormosils possui uma pequena atividade que inibe a adesão no substrato, esta atividade é potencializada com a adição das partículas core@shell. Para verificar se o aumento da concentração de partículas produz algum efeito sobre a proliferação da bactéria foi realizado o teste estatístico com 95 % de confiança. Muito embora, visualmente pareça que os resultados são iguais, o teste mostra que há uma pequena diferença significativa entre os conjuntos de dados SNP e CS100, mas não é significativa entre as amostras SNP e CS20. Entretanto, esse efeito pelo aumento de 5x na concentração de partículas é pouco significativo do ponto de vista prático. Por tanto podemos considerar que SNP, CS20 e CS100 apresentam um efeito inibitório de adesão semelhante.

Figura 4.33 - Gráfico de barras com os dados coletados através de contagem em placas, mostrando o crescimento de colônias de *S. Aureus* para o vidro com e sem revestimentos de Ormosils

4.4.2. Filmes Ormosils dopados com Nanopartículas Core@shell com adsorção de Ag

Realizaram-se testes com os Ormosils dopados com Ag antes e após a irradiação durante 10 minutos com luz UV. Cinco ensaios independentes foram conduzidos, sendo que cada ensaio foi realizado em triplicata.

Para todos os ensaios e em ambos os casos, Ormosils antes e após irradiação, não houve crescimento de colônia nos substratos, ou seja, tanto os revestimentos contendo íons Ag^+ como as NP metálicas não permitiram crescimento algum de bactérias, ou seja, na contagem r pade placas não crescimento de nenhuma colônia. Como já foi discutido o mecanismo de efeito bactericida das NP de Ag não está totalmente dilucidado. Em alguns casos se atribui não somente aos íons Ag senão também a adesão de nanopartículas na parede das bactérias. Os resultados apresentados na tese se referem às amostras após irradiação de dez minutos.

B) Microscopia Eletrônica de Varredura

Os substratos analisados foram preparados como descrito no procedimento experimental. Formado o biofilme, lavou-se somente com água e esperou-se a secagem dos mesmos. Com a Microscopia eletrônica de Varredura pode-se confirmar a formação de biofilme em ambos os casos.

Dessa maneira somente realizou-se teste com a amostra Cs100 com e sem Ag irradiada. O ormosil CS100 sem Ag mostra uma superfície totalmente coberta com bactérias evidenciando a formação do biofilme e afinidade com a superfície, figura 4.34.

Figura 4.34 - Micrografia MEV para o filme CS100 sem adição de Ag. Na imagem vemos as bactérias *S. Aureus*

Quando analisamos a figura 4.35, representando o ormosil CS100 com Ag, vemos pequenos aglomerados de bactérias *S. aureus*, porém a superfície não mostrou uma quantidade significativa de microrganismos. Isso era esperado já que no resultado de contagem de placas não houve crescimento algum de colônia.

Figura 4.35 - CS100 com Ag para *S.A*

C) Teste de Epifluorescencia

Quando se analisa o caso da *S. aureus*, as imagens de microscopia de Epifluorescencia no substrato contendo Ag reduzida após irradiação luz UV mostra a colonização bacteriana, formando os biofilmes. Essa técnica foi utilizada para a amostra CS100 com Ag para verificar a eficiência da Ag e como seria o comportamento, já que não há crescimento algum com esse substrato. Através do método do reconto em placa e teste do halo foi verificado que não havia crescimento.

Figura 4.36 - Micrografia de epifluorescência para a amostra CS100 com Ag (filtro verde). As bactérias com coloração amarelada apresentam danos na parede celular ou estão mortas.

Também se fotografou em uma escala menor, para que seja possível uma melhor visualização das bactérias e da morfologia da mesma.

Figura 4.37 - Micrografia de Epifluorescencia para a amostra CS100 com Ag (filtro verde). As bactérias com coloração amarelada apresentam danos na parede celular ou estão mortas.

Figura 4.38 - Micrografia de Epifluorescência para a amostra CS100 com Ag.

D) Método do Halo de Crescimento

Neste ensaio analisou em forma qualitativa a viabilidade das bactérias aderidas sobre a superfície e para os Ormosils sem Ag e com Ag. Foi avaliada a capacidade de crescimento de colônias viáveis sobre ágar estéril ao redor da amostra. Dessa maneira é possível verificar se as bactérias foram ou não capazes de se duplicar, mover e colonizar ao redor do substrato.

Figura 4.39 - Halo de crescimento comparativo para as amostras sem Ag e com Ag

Os resultados nos mostram as fotografias das placas de Petris com as diferentes amostras. As amostras foram analisadas após 24h de incubação à 28°C. Podemos verificar que há crescimento de colônias para as amostras sem Ag e não há nenhuma formação de colônias nas amostras com Ag. Para todas as amostras testadas com *S. aureus* o comportamento foi o mesmo, ou seja, houve crescimento nas amostras sem Ag e nenhuma colônia cresceu nas amostras que tinham Ag, dessa maneira apenas uma imagem foi anexada nesse trabalho. Mediante o reconto de placa só podemos diferenciar bactérias viáveis das bactérias não viáveis, não há outra maneira de distinguir vivas (viáveis ou não) e mortas.

4.5. Ensaios com *Pseudomona aeruginosa*

a) Teste de Contagem de placa

Filmes Ormosils dopados somente com Nanopartículas Core@shell

A resposta para esse tipo de bactéria foi diferente das obtidas com *S.aureus*. No caso das bactérias gram-negativas não houve diferença significativa para nenhum ormosil, ou seja, a presença o ormosil ou ormosil +core@shell não afeta significativamente a colonização das bactérias. Realizou-se então teste com o ormosil que apresentava maior quantidade em volume de nanopartículas core@shell adicionados, a amostra CS1000, com 1000µL de nanopartículas core@shell, porém também não houve diferença de colonização significativa.

Figura 4.40 - Gráfico de crescimento de colônia para os Ormosils com P.A.

Essa resposta pode ser explicada pela diferença da parede das bactérias e sua interação com o ormosil. No caso das bactérias Gram (+) a parede é composta por uma camada espessa de moléculas denominada peptidoglicanos e as bactérias Gram (-) são compostas por uma camada composta de peptidoglicano e membranas celulares externa e interna, tornando-a uma parede mais complexa (MADIGAN, 2003).

Outra possível explicação é que a *P.A* possui flagelo e isso possivelmente facilitou a movimentação das bactérias e formação do biofilme.

4.5.1. Filmes Ormosils dopados com Nanopartículas Core-Shell com adsorção de Ag

Realizaram-se testes com os Ormosils dopados com Ag sem irradiá-los e após a irradiação durante 10 minutos com luz UV, a fim de reduzir os íons Ag à Ag metálica. Realizaram-se ensaios em triplicatas e repetidos durante 5 vezes para cálculo estatístico.

Para todos os ensaios e em ambos os casos (Ormosils com Ag sem irradiar e Ormosils com Ag irradiados) não houve crescimento de nenhuma colônia em nenhum dos substratos, ou seja, tanto os íons Ag como as Np metálicas não permitiram crescimento algum de bactérias, matando-as ou as deixando inviáveis para replicação.

b) Microscopia Eletrônica de Varredura

Os substratos analisados foram preparados como descrito no procedimento experimental. Formado o biofilme, lavou-se somente com água e esperou-se secar.

Ormosil Cs100 sem Ag

A figura 4.41 nos mostra imagem ilustrativa por microscopia eletrônica da superfície do ormosil CS100 recoberto com bactérias. Após a irradiação observa-se uma mudança da forma das bactérias e na sua densidade superficial, figura 4.42.

Figura 4.41 - CS100 sem Ag com biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

O biofilme formado apresenta uma camada distribuída de bactérias, sem aglomerados e com algumas regiões sem formação de biofilme.

Ormosil CS100 com Ag (irradiada)

Figura 4.42 - CS100 com Ag irradiada para o biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Quando se adiciona Ag ao substrato é possível verificar uma diminuição de colonização de bactéria. Notou-se também que há uma mudança na morfologia das bactérias, pois as mesmas se mostram mais arredondadas.

c) Teste de Epifluorescencia

Analizando o caso da *P. aeruginosa*, as imagens de microscopia de Epifluorescencia no substrato contendo Ag, mostra a colonização bacteriana, formando os biofilmes como mostra a figura 4.43. Essa técnica foi utilizada para a amostra CS100 com Ag para podermos verificar a eficiência da Ag e como seria o comportamento, já que não há crescimento algum com esse substrato como foi discutido no método de contagem de placas.

Analizando o caso da *P. aeruginosa* notou-se grandes aglomerados de bactérias e formação de biofilme em toda superfície.

Figura 4.43 – Imagem de microscopia de Epifluorescencia para bactéria *P.A* em escala de 500µm. As bactérias com coloração amarelada apresentam danos na parede celular ou estão mortas.

Ampliando-se um pouco a imagem, notam-se melhor os aglomerados.

Figura 4.44 - Ampliação em 200μm para amostra CS100 com Ag para bactéria *P.A*

Figura 4.45 - Ampliação em 200μm para amostra CS100 com Ag para bactéria *P.A*

Verifica-se que muitas bactérias apresentam danos em sua parede, porém, há ainda algumas sem dano. Nesse teste utilizam-se corantes que atuam quando há danos na parede celular, apresentando coloração amarelada ou alaranjada. Quando não há danos na parede às

bactérias apresentam coloração verde, figura 4.44. Essas bactérias que não apresentam danos não são bactérias viáveis, ou seja, não apresentam a capacidade de se reproduzir. A figura 4.45 mostra o filtro vermelho no qual as bactérias mortas apresentam-se avermelhadas e as vivas alaranjas. Os resultados de não viabilidade são confirmados com as análises de reconto em placa e teste do halo.

d) Método do Halo de Crescimento

Neste ensaio analisou em forma qualitativa a viabilidade das bactérias para os Ormosils sem Ag e com Ag. Foi avaliada a capacidade de crescimento de colônias viáveis sobre ágar estéril ao redor da amostra. Consequentemente é possível verificar se as bactérias foram ou não capazes de se duplicar, mover e colonizar ao redor do substrato.

Figura 4.46- Halo de crescimento comparativo para as amostras sem Ag e com Ag, para bactéria *Pseudomona aeruginosa*

As imagens das placas de Petri após 24h de incubação à 28°C com diferentes amostras são mostradas na Figura 4.46. Foi possível verificar crescimento de colônias para as amostras sem Ag e nenhum crescimento para as amostras com Ag, como era esperado. O comportamento repetiu-se para todas as amostras, ou seja, houve crescimento nas amostras sem Ag e nenhuma colônia cresceu nas amostras que tinham Ag.

Para os testes do halo e teste de reaproveitamento os resultados obtidos são iguais para as bactérias Gram (+) e Gram (-).

e) Teste de Reutilização dos Revestimentos de Ormosils com Ag

Realizou-se teste de reaproveitamento dos revestimentos com intenção de verificar o comportamento microbicida com a mesma amostra e quantas vezes poderia ser utilizada com alta eficiência. Para o teste realizou-se o protocolo de formação de biofilme conforme já descrito, lavou-se com água deionizada estéril e colocou-se a amostra como no teste do halo de crescimento. Após 24h, lavou-se com água estéril a mesma placa e reutilizou-se para formação do biofilme, até que houvesse crescimento de bactérias. Abaixo um esquema ilustrativo do procedimento.

Figura 4.47 - Esquema do teste de reaproveitamento

Foram utilizadas somente os filmes de Ormosils dopadas com Ag e a imagem representativa de um filme antes da imersão em cultura bacteriana são mostrados na Figura 4.49 esquerda. Esta imagem mostra o filme com sua coloração amarelada opaca típica da presença das nanopartículas de Ag. A imagem da direita na Figura 4.49 mostra o mesmo substrato com o mesmo filme após o terceiro ciclo de cultura bacteriana. Entre cada ciclo, é feita uma rinçagem com água para eliminar o excesso de biofilme. Observa-se que a coloração deste filme foi atenuada, apresentando-se quase incolor e transparente. Em todas as formulações de ormosils observa-se o mesmo comportamento. Os testes de crescimento de biofilme mostraram para todos os filmes de ormosils com diferentes formulações crescimento após o terceiro ciclo de reutilização.

Tabela 4.7 - Resultado de teste qualitativo de reaproveitamento dos filmes de Ormosil CS100³ para inibição de crescimento bacteriano (*S. Aureus* e *Pseudomonas A.*).

Amostra	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Teste 4
SNP com Ag	Não	Não	Sim	Sim
CS20 com Ag	Não	Não	Sim	Sim
CS100 com Ag	Não	Não	Sim	Sim

A Tabela 4.7 apresenta os resultados de inibição de crescimento dos biofilmes das duas bactérias estudadas nesta Tese, o resultado foi o mesmo para ambas as bactérias, em função do número de ciclos de reutilização (reaproveitamento). Houve crescimento de biofilme para ambas as bactérias apenas a partir da terceira reutilização com todas as formulações de filmes de Ormosil independente da quantidade de CS. Todos os filmes, independente da quantidade de CS e das bactérias testadas, também apresentaram uma tendência à descoloração. Possivelmente há perda de filme por lixiviamento ou perda de adesão dos filmes durante a manipulação e lavagem das placas. Nota-se nas bordas da placa após o terceiro ciclo que ainda há uma leve coloração amarelada, indicando que há um resíduo de Ag nos filmes. No interior da placa deve ter ocorrido uma falha adesiva mais importante com perda mais acentuada de material em função da ausência da coloração amarelada e do aumento da rugosidade aparente. Na Figura 4.49 observam-se duas placas de vidro recobertas com Ormosil CS100 após o terceiro ciclo de reuso em testes com bactéria *S. Aureus* (S.A.) e *Pseudomonas A* (P.A). Nota-se nas bordas colônias brancas de bactérias em ambas as fotos (ver setas vermelhas nas imagens da Figura 4.49). O aparecimento destas colônias indica a perda de atividade antibacteriana do filme após o terceiro ciclo de reuso. Entretanto, é importante frisar que este crescimento é qualitativamente bem inferior ao de um filme virgem de ormosil sem Ag, como mostra a imagem no canto superior direito das imagens da Figura 4.49.

³ Os resultados do Ormosil CS100 são representativos qualitativamente de todos os filmes de Ormosil independente do teor de partículas core@shell (CS).

Figura 4.48 - Amostra após 3 uso (crescimento de bactérias no local mostrado pelas setas vermelhas)

Figura 4.49 - Comparação da coloração das amostras (primeiro teste está bem amarela (típica das NPs Ag) e após o terceiro teste vemos o filme tendendo ao incolor)

Em primeiro lugar esses estudos utilizaram patógenos oportunistas de relevância clínica, *S. Aureus* (gram +) e *P. Aeruginosa* (gram -) como microrganismos modelos para os ensaios biológicos em diversos substratos com Ormosils.

No estudo de colonização bacteriana nos Ormosils sem Ag são mostrados diferentes resultados segundo o microrganismo ensaiado. Todos os Ormosils testados exibiram um efeito inibidor da adesão da *S. aureus* em 1 ordem comparado com um substrato habitual como o vidro. Este comportamento poderia ser devido às propriedades hidrofílicas dos substratos. Um trabalho recente de Page Et Al (PAGE, 2011) reporta que a adesão da *S. aureus* em diferentes substratos modificados de vidro depende da hidrofílicidade dos mesmos, sendo a adesão mais

forte nos substratos que são mais hidrofílicos. Nesse trabalho os resultados de *S. aureus* se aderem em menor proporção em substratos ormosils que são menos hidrofílicos que o vidro. Entretanto este efeito não foi evidenciado no caso das *Pseudomonas* (figura de barras e microscopia), todas as superfícies foram colonizadas de maneira semelhante. A diferença de *S. aureus* e *P. aeruginosa* é que a *P.A* possui apêndices celulares, pili e flagelos, os quais favorecem a adesão do microrganismo ao substrato. Um trabalho de Tran V e cols (TRAN V, 2011) reporta que a mobilidade por flagelo melhora a adesão a superfície de lentes de contato, assim como a presença de pilis. Dessa maneira a bactéria apresenta três pontos de contato na superfície (pili, flagelo e corpo bacteriano) e sendo assim autores recomendam que para evitar efetivamente a adesão bacteriana não seria conveniente só um dos fatores e sim os três.

Os ensaios biológicos realizados com substratos Ormosils dopados com Ag mostraram um efeito bactericida marcante, conseguindo que tanto as bactérias de *S. aureus* quanto as *P. aeruginosa* que chegaram à superfície dos filmes perdessem sua viabilidade. Uma das perguntas que formulamos era se estes substratos contendo Ag apresentariam propriedade inibitória da adesão bacteriana, ação bactericida ou ambos. Para isso empregou-se técnicas de microscopia, como Varredura e Epifluorescência, com objetivo de conhecer o grau de recobrimento, morfologia, integridade da membrana dos microrganismos como também sua viabilidade mediante a técnica de reconto em placa. No caso da *S. aureus* as imagens de varredura e imonofluorescência mostram uma diminuição da adesão na superfície comparado com o substrato não dopado, evidenciando-se pequenas acumulações de *S. aureus*. Mesmo assim mediante a microscopia de Epifluorescência utilizando o kit Live/ Dead pode-se observar a integridade da membrana das células aderidas, cuja perca está relacionada com a morte da célula bacteriana. A figura 4.38 mostra uma grande proporção de células mortas (células vermelhas) e em menor quantidade com a membrana íntegra (cor verde). É importante destacar que as bactérias com membrana íntegra pode-se considerar como “vivas”, mas não é possível garantir sua viabilidade. Por esse motivo realizou-se um ensaio de reconto bacteriano que permite determinar o número de bactérias viáveis para replicar-se. Dessa maneira pode-se confirmar que essas bactérias com parede íntegra não se encontram viáveis já que o reconto foi nulo. Estes substratos dopados exibiram o mesmo efeito bactericida frente a *P. aeruginosa*, alcançando o reconto nulo logo da exposição. As imagens obtidas por microscopia de Epifluorescência na *P. aeruginosa* mostram a formação de agregados bacterianos abundantes na superfície. Possivelmente as *Pseudomonas* que mostraram maior facilidade de colonização em substratos de Ormosils, conseguem formar estrutura dos

biofilmes nas etapas iniciais do biofilme, mas são rapidamente afetadas pela presença de Nps de Ag na superfície do substrato. A ação antimicrobiana da Ag é conhecida desde a antiguidade, em partículas dos íons Ag enquanto da atualidade ainda está sendo discutido os mecanismos de ação bactericida das Nps de Ag (TAGLIETTI, 2012).

Os íons Ag são bem conhecidos como agentes antibacterianos, a nível celular a Ag^+ apresentam diversos mecanismos de ação sendo os mais destacados:

- 1- Interação com a cisteína em regiões críticas de proteínas e outros constituintes celulares;
- 2- Causa a perda de K^+ da membrana, alterando o sistema de transporte celular.
- 3- Causa danos na respiração
- 4- Perturbação do crescimento celular
- 5- Interação com o DNA

É interessante destacar que os microrganismos bacterianos apresentam uma habilidade pobre para desenvolver resistência aos íons Ag, no qual se faz importante o emprego dessas superfícies.

No caso das NPs de Ag, alguns autores tem sugerido que os efeitos microbianos estariam relacionados à liberação dos íons Ag desde as superfícies das Nps, seguido da interação dos íons Ag com os brancos celulares descritos anteriormente. É lógico pensar que as Nps de Ag deveriam ser mais ativas que a mesma quantidade de prata bulk (bloque). Assim mesmo a facilidade das Nps de Ag de alcançar a proximidade celular e sua alta relação superfície/massa possibilitaria a liberação de uma alta concentração de íons Ag ao redor da célula bacteriana causando uma elevada ação microbicida. Há também evidência da ação tóxica das Nps de Ag que poderia ser de uma ação física direta causada por nano-objetos, como o dano da membrana celular e penetração das Nps no citoplasma, unindo-se ao DNA e interagindo com os ribossomos bacterianos. Esses mecanismos puderam ser observados principalmente em bactérias Gram negativas, dada a baixa resistência das membranas celulares comparadas com a rígida parede de peptidoglicano das bactérias gram positivas (+). No entanto recentemente há evidência de internalização de NPs Ag no citoplasma de *S. aureus*, mas essa investigação depende do tamanho e forma de NPs de Ag com gram (-). Da mesma maneira são investigadas a interação dependente do tamanho ou forma das Nps de Ag com gram (-) e a atividade biológica. Em virtude do que foi comentado, a ação bactericida das Nps de Ag poderia ser multifatorial, sem contar a excelente atividade microbiana dos substratos dopados com Ag em microrganismos com diferentes constituições da parede

celular poderíamos pensar que há uma forte contribuição dos íons Ag ligada a diminuição da viabilidade bacteriana. Os substratos Ormosils dopados com Ag mostraram uma forte ação bactericida a qual chegou a ser erradicante para os patógenos bacterianos estudados. Por isso foi interessante avaliar a reutilização do mesmo substrato sem afetar sua capacidade bactericida. Nesse sentido encontramos que para ambos os organismos se podem reutilizar os substratos até duas vezes, perdendo na terceira o efeito de inibição. Uma explicação para essa resposta é que possivelmente há uma adsorção do material com a placa de Petri e por esse motivo não pode ser utilizada mais que 3 vezes. Essa observação se dá ao fato da amostra que inicialmente é de cor amarelada apresentar coloração “tendendo ao incolor” após 3 usos, conforme imagem mostrada durante a discussão.

Realizou-se então uma medida de Fluorescência de Raios-X para verificar se havia ou não liberação de íons Ag no meio de cultivo. As amostras de ormosils com Ag após dez minutos de irradiação foram colocadas em meio de cultivo durante 2 horas, seguindo o protocolo de formação de biofilme. A figura 4.50 representa os filmes ormosils com Ag antes e após duas horas no meio de cultivo.

Figura 4.50 – Comparação da %Ag antes e após ser submetida a duas horas em meio de cultivo, seguindo o protocolo de formação de biofilme.

O resultado apresentado na figura 4.50 nos mostra que há perda de Ag nos filmes, ou seja, que há liberação de Ag na solução, sendo um indicativo de que os cátions Ag são os responsáveis pelo efeito bactericida nos nossos materiais.

5. CONCLUSÕES

Obteve-se com sucesso a síntese de SiO_2 pelo método de Stöber.

Síntese com isopropóxido de titânio como precursor resultou em um core@shell - $\text{SiO}_2@\text{TiO}_2$ com bom recobrimento e homogeneidade.

A adição de nanopartículas core@shell como atenuante nos filmes ormosils fosfotungstato apresentam uma melhora na resposta fotocromica, devido à inibição da recombinação do par elétron- buraco. Entretanto maiores estudos devem ser realizados, pois após uma quantidade (100 μL de CS em volume) ocorre uma diminuição dessa resposta, possivelmente por precipitação ou efeito filtro no filme.

Esse mesmo filme apresenta uma resposta eficiente, estatisticamente, para bactéria *Staphylococcus aureus*, mas para a *Pseudomona aeruginosa* a presença de core@shell não apresenta uma diferença de inibição significativa.

A estratégia de incorporação de Ag no filme mostra a eficiência da mesma, causando a morte ou não viabilidade de ambos os gêneros de bactérias testados. Tanto o filme irradiado como o não irradiado tiveram 100% de eficiência e não houve contagem de crescimento de colônia em nenhum teste.

Portanto o filme ormosil dopado com core@shell com Ag adsorvido seria um bom material para uso externo evitando assim a contaminação por esses dois tipos de bactérias em ambientes hospitalares.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

a) Estudo do processo de têmpera química com vistas a entender a relação entre formulação-processamento e constante de difusão dos íons Ag para criar gradientes de concentração de prata ao longo da espessura dos filmes, Parâmetros de formulação (teor de Glymo, teor de HPW, teor de BuTS), parâmetros de processo (velocidade emersão do vidro na suspensão, agitação da suspensão, temperatura da suspensão, umidade relativa durante a secagem dos filmes, temperatura durante a secagem dos filmes, efeito do tratamento térmico após secagem ao ar (tempo de tratamento, temperatura de tratamento);

b) Estudo da cinética do processo fotocromico em função da formulação, processamento e temperatura a qual o filme é submetido durante a irradiação, dependência do comprimento de onda da radiação UV,

c) Estudo da dependência do efeito bactericida em função função da formulação, processamento e temperatura durante a imersão no meio de cultura,

d) Estudo da dependência do efeito bactericida com bactérias patogênicas de linhagens resistentes encontradas em ambiente hospitalar,

e) Estudo do mecanismo de liberação de Ag⁺ no meio de cultura e absorção destes íons pelas bactérias.

f) Estudo da dependência do tamanho e distribuição das nanopartículas de Ag em função da formulação, processamento e temperatura durante irradiação dos filmes

g) Caracterizar melhor a Ag quanto ao seu estado de oxidação, distribuição de tamanho de partícula em função da formulação, processamento e temperatura durante irradiação dos filmes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS⁴

- ALFAYA, A. A.; KUBOTA, L. T. A Utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002. ISSN 0100-4042.
- ARAKAWA, H.; NEAULT, J.; TAJMIR-RIAH, H. Silver (I) complexes with DNA and RNA studied by Fourier transform infrared spectroscopy and capillary electrophoresis. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1580-1587, 2001. ISSN 0006-3495.
- ARIGA, K.; KUNITAKE, T. **Supramolecular chemistry-fundamentals and applications: advanced textbook**. Berlin: Springer Science & Business Media, 2006. ISBN 3540261850.
- ARORA, S. et al. Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 236, n. 3, p. 310-318, 2009. ISSN 0041-008X.
- ASHARANI, P. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 279-290, 2008. ISSN 1936-0851.
- ASHISH, A. et al. Halting the spread of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis centre: a prospective cohort study. **JRSM Short Reports**, v. 4, n. 1, p. 1, 2013. ISSN 2054-2704.
- BERSANI, D.; LOTTICI, P.; DING, X.-Z. Phonon confinement effects in the Raman scattering by TiO₂ nanocrystals. **Applied Physics Letters**, v. 72, n. 1, p. 73-75, 1998. ISSN 0003-6951.
- BRAGA, P. C.; RICCI, D. Differences in the susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to rokitamycin and erythromycin A revealed by morphostructural atomic force microscopy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 457-460, 2002. ISSN 0305-7453.
- BRAGG, W. L. **Atomic structure of minerals**. New York: Cornell University Press, 1937.
- BRAYDICH-STOLLE, L. et al. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. **Toxicological Sciences**, v. 88, n. 2, p. 412-419, 2005. ISSN 1096-6080.
- BRIDGEMAN, A. J. Density functional study of the vibrational frequencies of α -Keggin heteropolyanions. **Chemical Physics**, v. 287, n. 1, p. 55-69, 2003. ISSN 0301-0104.
- BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Sol-gel science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. New York: Academic Press, 2013. ISBN 0080571034.
- CAO, B. et al. Synthesis and hydrolysis of hybridized silicon alkoxide: Si (OEt) x (OBut) $4-x$. Part I: synthesis and identification of the Si (OEt) x (OBut) $4-x$. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 10, n. 3, p. 247-253, 1997. ISSN 0928-0707.

⁴ Referências elaboradas de acordo com a NBR6023/2002

CHARACKLIS, W. G.; WILDERER, P. A. Structure and function of biofilms. In: _____. (Ed.). **Structure and function of biofilms**. Chichester: John Wiley, 1989. Isbn 0 471 92480 6.

CHEN, C. et al. Photocatalysis by titanium dioxide and polyoxometalate/TiO₂ cocatalysts. Intermediates and mechanistic study. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 329-337, 2004. ISSN 0013-936X.

CHOI, O. et al. The Inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. **Water Research**, v. 42, n. 12, p. 3066-3074, 2008. ISSN 0043-1354.

CUSANOVICH, M. A. The Chemistry of Silica (Iler, Ralph K.). **Journal of Chemical Education**, v. 57, n. 11, p. A324, 1980. ISSN 0021-9584.

DE MELO, W. C. et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Review Anti Infective Therapy**, v.11, n.7, p.669-693, July 2013. ISSN 1478-7210.

DING, X.-Z.; LIU, X.-H. Correlation between anatase-to-rutile transformation and grain growth in nanocrystalline titania powders. **Journal of Materials Research**, v. 13, n. 9, p. 2556-2559, 1998. ISSN 2044-5326.

DOBLER, D.; OSWALD, S.; WETZIG, K. Calibration of XPS–energy scale for determination of the oxidation states of doping elements in SnO₂ powders. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, n. 4, p. 646-649, 2002. ISSN 1618-2642.

DOHMEN, P. Antibiotic resistance in common pathogens reinforces the need to minimise surgical site infections. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, p. 15-20, 2008. ISSN 0195-6701.

DOROBANTU, L. S.; GOSS, G. G.; BURRELL, R. E. Atomic force microscopy: a nanoscopic view of microbial cell surfaces. **Micron**, v. 43, n. 12, p. 1312-1322, 2012. ISSN 0968-4328.

EATON, P. et al. Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Ultramicroscopy**, v. 108, n. 10, p. 1128-1134, 2008. ISSN 0304-3991.

ELKINS, J. G. et al. Protective role of catalase in pseudomonas aeruginosa biofilm resistance to hydrogen peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 10, p. 4594-4600, 1999. ISSN 0099-2240.

FARIAS, M.A. **Nanocompósitos de nanotubos de carbono de paredes múltiplas com matrizes híbridas epóxido- copolissilsesquioxanos**. 2010. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Centro de Ciências Tecnológicas da UDESC, Joenville, 2010.

FENG, Q. et al. A Mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Journal of Biomedical Materials Research**, n. 52, p. 662-668, 2001. ISSN 0021-9304.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 137, 2006. ISSN 0100-4042.

FERREIRA NETO, E. P., **Filmes híbridos fotocromicos de Ormosils fosfotungstato dopados com os cátions divalentes Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+}** . 2013. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

FURLANI, C. et al. Relationship between XPS core binding energies and atomic charge in adducts of Sn IV derivatives with pyrazine, and comparison with mössbauer isomer shift data. **Inorganica Chimica Acta**, v. 52, p. 23-28, 1981. ISSN 0020-1693.

GABORIAUD, F.; DUFRÊNE, Y. F. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, n. 1, p. 10-19, 2007. ISSN 0927-7765.

GALLARDOÁAMORES, J. M.; SANCHEZÁESCRIBANO, V. FT Raman and FTIR studies of titanias and metatitanate powders. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions**, v. 90, n. 20, p. 3181-3190, 1994.

GAULTOIS, M. W.; GROSVENOR, A. P. XANES and XPS investigations of $(TiO_2)_x(SiO_2)_{1-x}$: the contribution of final-state relaxation to shifts in absorption and binding energies. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1829-1836, 2011.

GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, p. 159-173, 2013. ISSN 2049-632X.

GOGOTSI, Y. **Nanomaterials handbook**. New York: CRC press, 2006. ISBN 1420004018.

GONZALEZ, B. E. et al. Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired Staphylococcus aureus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 583-590, 2005. ISSN 1058-4838.

GRUENERT, W.; SCHLOEGL, R.; KARGE, H. G. Investigations of zeolites by photoelectron and ion scattering spectroscopy. 1. New applications of surface spectroscopic methods to zeolites by a high-temperature measurement technique. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 97, n. 33, p. 8638-8645, 1993. ISSN 0022-3654.

GÖTZ, F. Staphylococcus and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 1367-1378, 2002. ISSN 1365-2958.

HENCH, L. L.; WEST, J. K. The sol-gel process. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 1, p. 33-72, 1990. ISSN 0009-2665.

HIRATSUKA, R.; SANTILLI, C.; PULCINELLI, S. O Processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 171-180, 1995.

HÖRBER, J.; MILES, M. Scanning probe evolution in biology. **Science**, v. 302, n. 5647, p. 1002-1005, 2003. ISSN 0036-8075.

JASS, J.; SURMAN, S.; WALKER, J. **Medical biofilms, detection, prevention and control**. New York: John Wiley, 2003. ISBN 0471988677.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

KATSOULIS, D. E. A Survey of applications of polyoxometalates. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 1, p. 359-388, 1998. ISSN 0009-2665.

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine**, v. 3, n. 1, p. 95-101, 2007. ISSN 1549-9634.

KIM, S. et al. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1076-1084, 2009. ISSN 0887-2333.

LA STORIA, A. et al. Atomic force microscopy analysis shows surface structure changes in carvacrol-treated bacterial cells. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 164-172, 2011. ISSN 0923-2508.

LAHMANI, M.; DUPAS, C.; HOUDY, P. **Les Nanosciences**. Berlin: [s.n.], 2006. ISBN 2701143861.

LEHN, J. **Química supramolecular: conceitos e perspectivas**. Tradução de M. J. Calhorda et al. Lisboa: IST Press, 1996.

LINSEBIGLER, A. L.; LU, G.; YATES JR., J. T. Photocatalysis on TiO₂ surfaces: principles, mechanisms, and selected results. **Chemical Reviews**, v. 95, n. 3, p. 735-758, 1995. ISSN 0009-2665.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1051-1060, 2000. ISSN 1286-4579.

MACKENZIE, J. D.; HUANG, Q.; IWAMOTO, T. Mechanical properties of ormosils. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 7, n. 3, p. 151-161, 1996. ISSN 0928-0707.

MADIGAN, M. T. et al. **Brock biología de los microorganismos**. New York: Prentice Hall, 2004.

MAH, T.-F. et al. A Genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. **Nature**, v. 426, n. 6964, p. 306-310, 2003. ISSN 0028-0836.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. A Review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 5, p. 1531-1551, 2010. ISSN 1388-0764.

MARINELLO, F. et al. Geometrical modelling of scanning probe microscopes and characterization of errors. **Measurement Science and Technology**, v. 20, n. 8, p. 084013, 2009. ISSN 0957-0233.

MIOČ, U. et al. Equilibrium of the protonic species in hydrates of some heteropolyacids at elevated temperatures. **Solid State Ionics**, v. 46, n. 1, p. 103-109, 1991. ISSN 0167-2738.

MIRANDA, J. et al. Comparison of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* strains isolated from organic and conventional poultry meat. **Journal of Food Protection®**, v. 71, n. 12, p. 2537-2542, 2008. ISSN 0362-028X.

MORONES, J. R. et al. The Bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005. ISSN 0957-4484.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología médica**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2015. ISBN 8535279784.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**. New York: Wiley Online Library, 1986. ISBN 0470027320.

OLIVEIRA, F. D. C. et al. Micro-and nanocomposites of Keggin heteropolymetalates in cellulose esters. **Surface and Interface Analysis**, v. 34, n. 1, p. 580-582, 2002. ISSN 1096-9918.

OZER, R. R.; FERRY, J. L. Investigation of the photocatalytic activity of TiO₂-polyoxometalate systems. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 15, p. 3242-3246, 2001. ISSN 0013-936X.

OZIN, G. A.; ARSENAULT, A. C.; CADEMARTIRI, L. **Nanochemistry**: a chemical approach to nanomaterials. London: Royal Society of Chemistry, 2009. ISBN 184755895X.

PAGE, K. et al. Study of the adhesion of *Staphylococcus aureus* to coated glass substrates. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 19, p. 6355-6363, 2011. ISSN 0022-2461.

PATEL, S. K. et al. *Pseudomonas fluorescens*-like bacteria from the stomach: a microbiological and molecular study. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 7, p. 1056, 2013.

PILLET, F. et al. Atomic force microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology. **Biochimica et Biophysica Acta - general subjects**, v. 1840, n. 3, p. 1028-1050, 2014. ISSN 0304-4165.

RENDUELES, O.; GHIGO, J.-M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 972-989, 2012. ISSN 1574-6976.

RIEGEL, G.; BOLTON, J. R. Photocatalytic efficiency variability in TiO₂ particles. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 99, n. 12, p. 4215-4224, 1995. ISSN 0022-3654.

SCHITO, G. The Importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 3-8, 2006. ISSN 1469-0691.

SCHUBERT, U.; HUESING, N.; LORENZ, A. Hybrid inorganic-organic materials by sol-gel processing of organofunctional metal alkoxides. **Chemistry of Materials**, v. 7, n. 11, p. 2010-2027, 1995. ISSN 0897-4756.

SEIL, J. T.; WEBSTER, T. J. Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2767, 2012.

SOUZA, L. V. D. **Filmes de ormosils contendo polioxometalatos dopados com nanopartículas de titânia**: adsorção de lipídeos e formação de biofilmes de *Escherichia coli*. 2014. 128p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

STEED, J. W.; ATWOOD, J. L. **Supramolecular chemistry**. New York: John Wiley, 2013. ISBN 1118681509.

STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 62-69, 1968. ISSN 0021-9797.

TAGLIETTI, A. et al. Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. **Langmuir**, v. 28, n. 21, p. 8140-8148, 2012. ISSN 0743-7463.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Introducción a la microbiología**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2007. ISBN 9500607409.

TRAN, V. B. et al. Dynamics of flagellum-and pilus-mediated association of *Pseudomonas aeruginosa* with contact lens surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 11, p. 3644-3652, 2011. ISSN 0099-2240.

ULLAH, S. **Materiais nanoestruturados e filmes finos baseados em TiO₂ para aplicação em fotocatalise**. 2014. 139p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

WIENCEK, K. M.; FLETCHER, M. Bacterial adhesion to hydroxyl- and methyl-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 1959-1966, 1995. ISSN 0021-9193.

XIN, X.-F.; HE, S. Y. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000: a model pathogen for probing disease susceptibility and hormone signaling in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 51, p. 473-498, 2013. ISSN 0066-4286.

YAMASE, T. Photo- and electrochromism of polyoxometalates and related materials. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 1, p. 307-326, 1998. ISSN 0009-2665.

YANG, P. **The Chemistry of nanostructured materials**. Singapore: World Scientific, 2011. ISBN 9814313068.

ZHANG, T. R. et al. Preparation of photochromic sol–gel composite films containing dodecaphosphotungstic acid. **Materials Chemistry and Physics**, v. 78, n. 2, p. 380-384, 2003. ISSN 0254-0584.

ZHAO, L.; SCHAEFER, D.; MARTEN, M. R. Assessment of elasticity and topography of *Aspergillus nidulans* spores via atomic force microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 955-960, 2005. ISSN 0099-2240.

Microscopia de força atômica (AFM)

As microscopias por varrido de sonda, SPMs (Scanning Probe Microscopies) tem se convertido em ferramentas muito utilizadas na caracterização de superfícies solidas de materiais de diversas composições e em muitos casos é possível estudar o material a nível atômico ou molecular. Dentre as SPMs, uma que se destaca é a Microscopia de Força Atômica (AFM).

Abordando um pouco mais a microscopia de Força Atômica podemos dizer que é uma das poucas ferramentas que nos permite uma informação espacial da superfície em coordenadas X, Y e Z com suma precisão e em escala nanométrica.

Em razão de possuir um amplo escopo de aplicações e permitir o avanço do desenvolvimento em diversas áreas do conhecimento, estudos com fungos e bactérias tem despertado grande interesse no meio científico. Dois campos em evidência são a farmacologia e microbiologia (PILLET, 2014).

Historicamente, essa técnica surgiu a partir da invenção do Microscópio de Tunelamento (STM – Scanninig Teling Microscope)– (BINNIG, 1986), sendo amplamente utilizada para obter informações elétricas, magnéticas, topográficas, de espessura, largura e altura bacteriana, flagelos e pilis, detalhando os microorganismos (ZHAO, 2005). A técnica também permite realizar medidas sólidas ou em soluções aquosas, o que possibilita a investigação de amostras biológicas sobre condições fisiológicas, permitindo entender com mais detalhes os processos ocorridos, uma vez que simula o ambiente natural do microorganismo (HÖRBER, 2003; LA STORIA, 2011; DUFRÊNE, 2011). A AFM fornece ainda o mapeamento espacial da morfologia, permitindo a investigação quantitativa de superfície e rugosidade. (BRAGA, 2002; EATON, 2008; MARINELLO, 2009).

Dentre as diversas técnicas de avaliação de superfícies existentes, a microscopia de força atômica (AFM, Atomic Force Microscopy) apresenta diversas vantagens frente às demais: é uma técnica não destrutiva, de alta resolução e não exige a metalização de amostras, como ocorre em alguns casos de análise por microscopia eletrônica de varredura. Outro benefício decorre da possibilidade da medida ser realizada em temperatura ambiente, sem a necessidade de vácuo para a análise e sem necessidade de pré-tratamentos, tais como fixação química, desidratação, secura ou revestimento de metal, que poderiam resultar na mudança das propriedades (DOROBANTU, 2012; GABORIAUD, 2007).

3.10.1. Operação do AFM

O princípio básico dessa microscopia consiste em realizar a varredura controlada da superfície de um substrato com uma sonda, que pode estar em contato físico mediante um regime de forças intermoleculares controladas por um mecanismo de retroalimentação. As forças intermoleculares que atuam entre a ponta e a amostra são estudadas através do modelo de Lennard- Jones, em que um par de átomos ou moléculas estão sujeitos a dois tipos de força de interação distintas, que dependem da distância que se encontram. Se as distâncias forem grandes as forças que atuam são forças de atração (Van der Waals) e em pequenas distâncias as forças atuantes são forças repulsivas (repulsão de Pauli). Dessa maneira o modelo de Lennard-Jones propõe que a energia potencial de um par de átomos segue a seguinte equação:

$$V(r) = 4 \epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad \text{equação 1}$$

r : distância de separação entre átomo

E : mínima energia potencial

σ : diâmetro molecular efetivo

O termo $(\sigma/r)^{12}$ leva em conta a repulsão entre os átomos quando estes se aproximam (r tende a zero) e se baseia no modelo de repulsão de Pauli, que considera que quando um par de átomos se aproxima ocorre sobreposição das nuvens eletrônicas e isso aumenta exponencialmente a energia do sistema e as forças repulsivas do mesmo. Já o termo $(\sigma/r)^6$ representa as forças atrativas do tipo van der Waals, que são forças que predominam a distâncias mais longas. A figura 2 representa essa interação.

Figura 3.3 - Modelo de Lennard-Jones, mostrando a dependência das forças com as distâncias dos átomos.

O equipamento AFM apresenta 5 elementos principais: ponta, cantiléver, scanner, sistema de retroalimentação.

Ponta: É selecionada de acordo com o tipo de amostra e as propriedades que se deseja medir ao modo de operação do microscópio. Essas pontas apresentam um raio de curvatura característico e são escolhidas dependendo da amostra, já que a qualidade das imagens depende muito da geometria da ponta. Os materiais mais comuns de ponta são Si_3N_4 ou Si.

Cantiléver: É o local de suporte da ponta. O cantiléver se modifica segundo a topografia da amostra. É revestido de uma superfície refletora, podendo ser ouro ou alumínio que ao refletir a luz laser sonda permite a detecção dos movimentos ou deflexões da ponta no momento de varredura. A deflexão está relacionada com a constante elástica (k) do cantilever, que depende do tamanho e espessura do mesmo, fator esse de extrema importância.

Detector piezelétrico ou scanner (escâner): É o componente de controle de posicionamento preciso da amostra. Apresenta forma de tubo e é de um material cerâmico piezelétrico que modifica suas dimensões como resposta da voltagem aplicada. O scanner se caracteriza por apresentarem três graus de liberdade, se expandindo em uma direção e contraindo-se em outra como resultado da voltagem aplicada. O intervalo de operação do scanner pode alcançar 100µm lateral e cerca de 10µm na vertical, sendo necessário realizar a calibração do mesmo.

Princípio de funcionamento:

Microscópios de força atômica apresentam um sistema de detecção óptica no qual é utilizado um laser que reflete no cantiléver e é focado em um fotodetector. Nessa cabeça óptica há uma janela na parte superior, um diodo, espelhos e um laser que registra os movimentos de deflexão gerados pelo cantiléver.

Modo de operação:

Há três tipos de operação no AFM: Modo contato, modo não contato e modo contato intermitente (ou tapping). Esses modos de interação se definem pelo tipo de interação ponta-amostra, figura 3.4.

Figura 3.4 - Interação cantiléver ponta-amostra a) modo contato, b) modo não contato, c) modo tapping.

Fonte- Ferreira (2006)

O modo contato há contato físico com a amostra, se opera com interação repulsiva. No modo não contato as forças são atrativas, pois nesse modo a distância entre a ponta e a amostra é da ordem de dezenas ou centenas de angstroms. Nessa técnica o cantiléver vibra perto da superfície da amostra com uma frequência de ressonância entre 100 a 400kHz e o sistema detecta as mudanças de frequências da ressonância do cantiléver ou a amplitude da vibração.

O modo contato intermitente ou tapping é o modo no qual há oscilação da ponta com a amostra. Nesse modo a ponta oscilante deve estar suficientemente perto da superfície em um regime de forças atrativas, sem que se alcance as interações repulsivas.

Em modo tapping a ponta oscila entre E1 em um regime atrativo e repulsivo, como na figura 3.5

Figura 3.5 - Esquema mostrando as regiões de medidas para modo contato, não contato e tapping