Universidade de São Paulo

Instituto de Química de São Carlos

**Filmes de Ormosils contendo Polioxometalatos dopados com
Nanopartículas de Titânia: Adsorção de Lipídeos e Formação de Biofilmes de
Escherichia coli.**

Doutoranda: Luciana Valgas de Souza

Orientador: Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos, abril de 2014

Luciana Valgas de Souza

Filmes de Ormosils contendo Polioxometalatos dopados com Nanopartículas de Titânia: Adsorção de Lipídeos e Formação de Biofilmes de *Escherichia Coli*.

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química

*Área de concentração: Físico-Química
Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho*

São Carlos

2014

Direito de Reprodução

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

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Salete Valgas pelo amor incondicional e pelo apoio, ao meu pai Lauro de Souza e meu avô Ernani Valgas por sempre acreditar no meu potencial. A minha irmã Juliana e meu cunhado Rafael pelo amor e carinho. Enfim aos meus familiares e amigos pelo amor e amizade.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo pela infraestrutura fornecida.

A CNPq pela bolsa concedida

A CAPES pela bolsa fornecida durante meu doutorado Sanduiche em Portugal.

Ao Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa por me acolher em seus laboratórios durante um ano na instituição.

Ao professor Luís Filipe Vieira Ferreira pela orientação na realização dos experimentos realizados no Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa.

À professora Ana Maria Botelho do Rego pela co-orientação e por todo o carinho durante minha estada em Lisboa, no Instituto Superior Técnico, e aos colegas Diana e David pelo auxílio e boa vontade durante a realização dos meus experimentos.

À professora Janice Perusi e aos colegas do Grupo de Fotossensibilizadores pela colaboração, orientação e acesso aos ensaios com E. Coli.

Ao Instituto de Física de São Carlos pelas medidas de AFM e ângulo de contato, especialmente ao técnico Marcelo.

Aos colegas do Grupo de Materiais Híbridos e Inorgânicos do Instituto de Química de São Carlos. Ao colega Orlando Ysnaga pelas medidas de Fluorescência de Raios X e Espectroscopia de Emissão Atômica (ICP-OES), Elias e Sajjad pelas discussões e ao Guto nosso técnico por toda a ajuda.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron pelo acesso à linha de Microfluorescência de Raios X.

Ao professor Hidetake Iamasato pelas discussões.

Ao meu orientador, professor Ubirajara que me proporcionou estudar na USP e me orientou durante os quatro anos de doutorado.

Aos meus amigos de Floripa Francielly, Melina, Tiago, Japa e Hugo pela amizade e por todo o apoio.

Aos meus amigos que fizeram a minha estadia mais alegre e me deram todo o apoio nestes 4 anos, Rafa, Lidy, Deh, Jéssica, Bela, Alana, Camila, Carol Chamas, Gui, Ursão, Paulinho, Luís, Manu, Linex e Rafael. As amigas da República Sedução que me hospedaram, assim como a minha amiga Mirella, que me acolheu com toda a amizade possível.

Enfim, meu muito obrigada a todos os que participaram da minha vida nestes 4 anos de doutorado.

“Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos ajudam muito.” (Chico Xavier)

RESUMO

Neste trabalho foram preparados materiais híbridos do tipo silicatos organicamente modificados (ormosils) contendo fosfotungstato, $[PW_{12}O_{40}]^{-3}$ e dopados com nanopartículas de TiO_2 . O objetivo é obter uma ação sinérgica destes dois fotocatalisadores na prevenção de formação de biofilmes e/ou na sua fotodegradação. O fotocatalisador principal no sistema é o fosfotungstato, sendo o co-adjuvante o TiO_2 . Sendo assim, procurou-se manter a concentração deste no menor nível possível. Os materiais foram caracterizados por espectroscopias vibracionais, espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), Fluorescência de Raios X, Microscopia de força atômica e Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os filmes não mostraram eficácia na fotodegradação de biomoléculas como fosfolipídios encontrados na membrana celular. Os ensaios de inibição de crescimento de biofilmes de *Escherichia coli* sobre os ormosils mostraram que a maior inibição de bactérias é do filme contendo maior teor de nanopartículas de titânia portanto, são bons candidatos para filmes e revestimentos bactericidas/bacteriostáticos a serem usados em máscaras respiratórias, revestimentos de superfícies em salas de cirurgia e em filtros de ar em sistemas fechados (sistemas de ar condicionado e ventilação em geral).

Abstract

This thesis deals with hybrid materials named organically modified silicates (Ormosils) with phosphotungstate, $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{-3}$, and doped with TiO_2 nanoparticles. The aim was to achieve a synergic action between both photocatalysts resulting on a more efficient coating for inhibition of the biofilm growing and/or its photodegradation. The photocatalyst in main system is the phosphotungstate, being the co-adjuvant the TiO_2 . Therefore, we tried to maintain the concentration of this at the lowest level possible. The materials were characterized by vibrational spectroscopies, X-Ray Photoelectron Spectroscopy, X-ray Fluorescence Spectroscopy, Atomic Force Microscopy and Scanning Electron Microscopy. The films were unable to photodegrade biomolecules films such as phospholipids as well as they display interesting inhibition capacity against formation of biofilm of *E. Coli* bacteria. The tests of inhibition of growth of *Escherichia coli* biofilms on the ormosils showed that a greater inhibition of bacterias exists in the film containing higher content of nanoparticles of titania. Therefore, they are good candidates for bactericidal films and coatings to be used in respirators, surface coatings in surgery rooms and air filters in closed systems (systems of air conditioning and ventilation in general).

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema ilustrativo de gelificação para sistemas a) coloidais e b) poliméricos.	20
Figura 2. Tetraetilortosilicato (TEOS) e outros monômeros usados na preparação de ormosils e a reação de formação do ormosil.	23
Figura 3. Moléculas orgânicas imobilizadas em uma rede inorgânica, preparadas via sol gel, a partir de precursores inorgânicos.	26
Figura 4. Monômeros orgânicos embebidos em uma matriz inorgânica seguida de polimerização, gerando o correspondente polímero.	26
Figura 5. Formação simultânea de duas redes a partir de monômeros orgânicos e inorgânicos. ...	27
Figura 6. Material híbrido orgânico-inorgânico com ligações covalentes entre as fases.	27
Figura 7. Material híbrido orgânico-inorgânico formado por ligações covalentes apresentando pontes de hidrogênio.	28
Figura 8. Reação de redução do poliânion.	30
Figura 9. (a) Representação esquemática de um heteropoliânion do tipo Keggin; (b) Representação esquemática da estrutura do polioxoânio α -PW mostrando a posição do íon W^{6+} (M) e dos óxidos em ponte (O_2C_1 e O_2C_2) e dos íons óxido terminais (O_t); (c) representação esquemática do metal X e do O_4c	31
Figura 10. Representações das estruturas cristalinas do TiO_2 nas formas alotrópicas rutila e anatase: a estrutura cristalina da rutila possui uma cela unitária de dimensões, $a = b = 4.587 \text{ \AA}$, $c = 2.953 \text{ \AA}$, e a fase anatase, $a = b = 3.782 \text{ \AA}$, $c = 9,502 \text{ \AA}$	34
Figura 11. Mecanismo simplificado para fotoativação de um semicondutor.	35
Figura 12. Modelo de desenvolvimento do biofilme. Micrografia com contraste de fase nos estágios com formação do biofilme. <i>Vibrio cholerae</i> é mostrado como modelo. Biofilmes foram crescidos em Luria-bertani 24 h sob condições estáticas. Passo 1. Fixação reversível das células sobre a superfície. Passo 2: Fixação irreversível e desenvolvimento da monocamada. Passo 3: Desenvolvimento de microcolônias. Passo 4: Maturação do biofilme. Passo 5: Dessorção das células a partir do biofilme. (magnificação 400 $\times$; Kierek-Pearson e Watnick).	39
Figura 13. Ilustração da estrutura morfológica das bactérias: (a) Gram-positivas e (b) Gram-negativas.	41
Figura 14. Ilustração da tensão superficial e de forças atrativas e repulsivas.	44
Figura 15. Ilustração dos três distintos graus de molhabilidade que podem ocorrer em uma superfície sólida.	44
Figura 16. Estrutura química da 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), anfifílico estrutural de lipossomas.	48

Figura 17. Ilustração esquemática da formação das bicamadas fosfolipídicas sustentadas via método de fusão de vesícula. (a) o lipossomo interage com a superfície. (b) o lipossomo se rompe. (c) os fosfolipídios se reorganizam nas bordas para minimizar as interações hidrofóbicas resultando na formação da bicamada.	50
Figura 18. Ilustração contendo amostras em placas com poços sob radiação UV.	62
Figura 19. Espectro de infravermelho para os componentes do ormosil: (-) GLYMO, (-) BUTS, (-) TEOS.	68
Figura 20. Espectro de absorção na região do infravermelho médio para os filmes de (-) ormosil A8+fosfolipídeo, (-) ormosil A8 e (-) fosfolipídeo sobre wafer de	69
Figura 21. Espectro na região do infravermelho médio para amostras sobre silício contendo ormosil A8, fosfolipídeo e ormosil A8 com fosfolipídeo depositado.	70
Figura 22. Espectro Raman para os filmes ormosils: SNP (cor preta), A2-20 μL TiO_2 (cor vermelho), A6-60 μL TiO_2 (cor azul), A7-1000 μL TiO_2 (cor verde), A8-2000 μL TiO_2 (cor rosa).	73
Figura 23. Micrografia do ormosil SNP na escala 500x500 nm. A escala de cor ao lado da imagem indica a profundidade (eixo Z).	76
Figura 24. Micrografia do ormosil A2 na escala de 500x500 nm. A escala de cor ao lado da imagem indica a profundidade (eixo Z).	77
Figura 25. Micrografia do ormosil A8 na escala de 500x500 nm. A escala de cor ao lado da imagem indica a profundidade (eixo Z).	77
Figura 26. Micrografias de AFM do ormosil SNP contendo fosfolipídeo DMPC, vesículas destacadas a imagem com ampliação de 1,0x1,0 μm (a) imagem topográfica (b) imagem em fase.	79
Figura 27. Micrografias de AFM do ormosil SNP contendo fosfolipídeo DMPC, vesículas destacadas a imagem com ampliação de 20x20 μm . (a) imagem topográfica (b) imagem em fase.	80
Figura 28. Micrografias de AFM do ormosil A8 contendo fosfolipídeo DMPC, com ampliação de 4.0x4.0 μm , (a) imagem topográfica (b) imagem em fase.	81
Figura 29. Micrografias de AFM do ormosil A8 contendo fosfolipídeo DMPC, vesículas destacadas a imagem com ampliação de 20.0x20 μm . (a) imagem topográfica (b) imagem em fase.	81
Figura 30. Micrografia da superfície do filme SNP, com barra de escala de 3 μm e magnificação de 8.0x.	82
Figura 31. Micrografia da superfície do filme A2 (20 μL de TiO_2) e filme A6 (200 μL de NP de TiO_2), respectivamente, barra de escala de 1 μm e magnificação de 8.0x.	83
Figura 32. Micrografia da superfície do filme A7 (1000 μL de NP de TiO_2) e do filme A8 (2000 μL de NP de TiO_2) barra de escala de 1 μm e magnificação de 8.0x.	84
Figura 33. Gráfico contendo em (a) % da contagem total de bactérias dos filmes ormosils versus a absorbância encontrada no método colorimétrico.	89

Figura 34. Gráfico relacionando o índice de sobrevivência versus a % de átomos de W obtido pela técnica de EDFRX	89
Figura 35. Ilustração esquemática do processo bactericida em um filme contendo bactéria <i>E.coli</i> sobre o ormosil contendo fosfotungstato e TiO_2 . (a) ilustração da célula de <i>E.coli</i> (b)-(c) ilustração da atividade do radical hidroxila e o rompimento da membrana plasmática.....	90
Figura 36. Espectro completo da análise de XPS para o filme ormosil, com os principais elementos analisados, como N, C, O, Si e W.....	91
Figura 37. Espectro de XPS na região do N 1s para os filmes sobre vidro SNP, A2 e A8 e para o xerogel A8 gel, compreendendo 419-390eV.....	92
Figura 38 - Espectro de XPS para o elemento N1s com uma componente para os ormosils: (a) SNP e (b) A2.....	93
Figura 39 - Espectro de XPS para o elemento N1s com duas componentes para os ormosils: (a) A8 e (b) A8 gel (xerogel).	94
Figura 40. Espectro de XPS para o elemento W nos filmes ormosils analisados: SNP (36), A2, A8 e A8 gel (xerogel).....	95
Figura 41. Espectro de XPS para o elemento W nos filmes ormosils SNP, A2, A8 e no xerogel (A8 gel).	96
Figura 42. Espectro de de fotoemissão do N 1s para os filmes: fosfolipídeo sobre vidro (fosfo), A8/fosfolipídeo sobre vidro (A8+fosfo) e sem NP/fosfolipídeo sobre vidro (sem NP+fosfo).	99
Figura 43. Espectro de XPS para região de W4f para os filmes SNP e A8 contendo fosfolipídeo.	102
Figura 44. Espectro eletrônico de absorção para o CV (cristal violeta) depositado sobre o filme ormosil A8, antes e após irradiação com luz U.V durante 10 min.	106
Figura 45. Comparação da porcentagem de fotodegradação do cristal violeta na fotólise direta (vidro) e sobre os filmes ormosils.	107
Figura 46. Espectro de infravermelho em modo transmissão para amostra sobre wafer de silício contendo ormosil A8 e fosfolipídeo em diferentes tempo de exposição a irradiação. Região analisada de $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$	108
Figura 47. Espectro de infravermelho em modo transmissão para amostra sobre wafer de silício contendo ormosil A8 e fosfolipídeo para diferentes tempos de exposição a irradiação, compreendendo a região ampliada de $3500\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$	109
Figura 48. Espectro de infravermelho em modo transmissão para amostra sobre wafer de silício contendo ormosil A8 e fosfolipídeo para diferentes tempos de exposição a irradiação, compreendendo a região ampliada de $1600\text{-}500\text{ cm}^{-1}$	110
Figura 49. Espectro de infravermelho em modo transmissão para wafer de silício contendo fosfolipídeo DMPC irradiada com vários tempos, compreendendo a região $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$	111

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Identificação e composição dos filmes ormosils (unidade ppm).	533
Tabela 2 - Valores de tensão energia superficial (em mJ/m^2) e seus componentes para os líquidos utilizados para determinar o ângulo de contato.	655
Tabela 3- Resultados da quantificação em porcentagem de W nos filmes ormosils pela técnica EDXRF.	677
Tabela 4- Resultados da quantificação de Ti nos filmes ormosils pela técnica EDXRF.	67
Tabela 5 - Listagem das bandas presentes nos espectros das amostras de ormosils com suas atribuições de acordo com os grupos funcionais responsáveis pelas vibrações.....	71
Tabela 6 - Rugosidade média para os filmes ormosils para ampliação de $50 \times 50 \mu\text{m}$ e para $500 \times 500 \text{ nm}$	75
Tabela 7- Valores do numero de moles de água para as diferentes composições dos filmes ormosils.	75
Tabela 8-. Contagem de colônias bacterianas dos filmes ormosils, realizado em sextuplicata.	85
Tabela 9. Viabilidade das células, dados calculados a partir da tabela 8. Ошибка! Залкадка не определена.	
Tabela 10 - Contagem de células viáveis pelo método do cristal violeta, leituras da absorbância feitas na DO 560 nm.	87
Tabela 11 - Amostras irradiadas leitura de absorbância em 560 nm.	88
Tabela 12- Energias de ligação em eV ($\pm 0,2 \text{ eV}$) para para o elemento N nos filmes ormosils analisados.	95
Tabela 13 - Valores da energia de ligação para W 4f e 5p das amostras analisadas de filmes ormosils SNP, A2, A8 e do xerogel denminado, A8gel.....	97
Tabela 14 – Porcentagens atômicas dos elementos analisados por XPS.	98
Tabela 15 - Valores de energia de ligação na região do pico fotoelétrico do N1s obtidos por XPs para os filmes: a) Fosfolipídeo sobre vidro, b) A8+fosfo e c) sem NP+fosfo.....	100
Tabela 16 - Valores de energia de ligação na região do pico fotoelétrico do N1s obtidos por XPs para os filmes: a) Fosfolipídeo sobre vidro, b) A8+fosfo e c) SNP+fosfo.	100
Tabela 17 - Porcentagem atômicas dos elementos analisados por XPS para fosfolipídeo, A8+fosfo e SNP+fosfo.	101
Tabela 18. Energias de ligação para os filmes A8 e SNP contendo fosfolipídeo.	101
Tabela 19 - Valores para o ângulo de contato (θ) utilizando solvente polares e apolares, Os apresentdos são médias de sextuplicatas realizadas.....	103
Tabela 20 - Valores de energia superficial calculados para os ormosils e suas componentes ácida e básica, unidade em mJ/m^2	104
Tabela 21. Composições diversas para o ormosil A8.....	107

Lista de abreviaturas

BuTS :	4-Butironitrilatrietóxissilano
GLYMO:	3-Glicidóxi propiltrimetóxissilano
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:	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i> , ou seja, orbitais moleculares desocupados de menor energia.
POM:	Polioxometalato
DMPC:	1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina
LB	Meio de cultura de bactérias proposto por Luria Bertani
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
EDXRF	Fluorescência de Raios X com detecção em modo dispersivo em energia.
PBS	Solução tampão salina usando fosfato pH 7
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X
CV	Cristal Violeta
BC	Banda de condução
	Microscopia eletrônica de Varredura

Sumário

Abstract	8
Lista de Figuras.....	9
Índice de Tabelas	12
Lista de abreviaturas	13
Sumário	14
1 Introdução e Justificativa	18
2. Objetivos	19
3. Revisão Bibliográfica	20
3.1. Processo sol gel	20
3.2. Organossilanos e Ormosil	22
3.3. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos	24
3.4. Heteropolioxometalatos do tipo Keggin	28
3.5. Dióxido de Titânio.....	33
3.6. Biofilmes.....	37
3.7. Bactéria <i>Escherichia coli</i>	40
3.8. Energia superficial a partir do ângulo de contato	43
3.9. Fotodegradação	47
3.9.1. Fosfolípídeo - 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC)	48
4. Materiais e Métodos	51
4.1. Reagentes	51
4.2. Pré-Tratamento dos Substratos	51
4.2.1. Vidros	51

4.2.2. Discos de Silício	52
4.2.3. Esterilização dos substratos para preparo do biofilme	52
4.3. Procedimento Experimental	52
4.3.1. Formação de Filmes Ormosils.....	52
4.3.2. Preparação dos meios de cultura	54
4.3.3. Adsorção de Biomoléculas sobre os Filmes de Ormosil.....	54
4.3.3.1. Filmes com o fosfolípídeo dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC).....	54
4.3.4. Microorganismos	55
4.3.4.1. Preparo da Suspensão celular	55
4.3.4.2. Formação do biofilme sobre substrato de vidro.....	55
5. Caracterização e Procedimentos	57
5.1. Espectroscopia Vibracional	57
5.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)	57
5.1.2. Espectroscopia Raman	57
5.2. Microscopia de força atômica (AFM)	58
5.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	59
5.4. Método de placas para contagem de colônias bacterianas.....	59
5.5. Teste colorimétrico com cristal violeta para determinação total de bactérias no biofilme	60
5.6. Medidas de ângulo de contato	61
5.7. Cálculos da energia superficial dos filmes ormosils	61
5.8. Verificação da atividade fotocatalítica dos filmes ormosils contendo biofilme	61
5.9. Espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS).....	62
5.10. Ensaios de fotodegradação.....	63

5.10.1. Dessorção de fosfotungstato do ormosil	64
5.11. Análise Semi-Quantitativa por Fluorescência de Raios-X no Modo Dispersivo em Energia (EDXRF)	64
5.12. Determinação do ângulo de contato.....	64
6. Resultados e Discussões	66
6.1. Análise Quantitativa por Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF).....	66
6.2. Espectroscopia Vibracional	67
6.2.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho.....	67
6.2.2. Espectroscopia Raman	72
6.3. Microscopias ormosils e ormosils contendo fosfolipídeo	74
6.3.1. Microscopia de força atômica (AFM) para filmes ormosils	74
6.3.2. Microscopia de força atômica para ormosils recobertos com fosfolipídeo...	78
6.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para biofilmes ormosis contendo bactéria E.coli.....	82
6.4. Contagem de colônias bacterianas	85
6.4.1. Método de contagem por placas	85
6.4.2. Método colorimétrico para contagem de células	86
6.5. Atividade bactericida potencializada pela irradiação com U.V	88
6.6. Análises de superfície	91
6.6.1. Espectroscopia de fotoelétrons de raios X	91
6.6.2. Ângulo de contato e energia superficial.....	103
6.7. Fotogração	105
6.7.1. Atividade Fotocatalítica: Avaliação pela Fotodegração de sobrecamadas de cristal violeta (CV)	105

6.7.2. Fotodegradação do fosfolípídeo DMPC.....	108
6.7.2.1. Fotodegradação do fosfolípídeo com amostras de filmes ormosils com outras formulações.....	112
6.8. Dessorção do fosfotungstato.....	112
7. Conclusões.....	113
APÊNDICE A.....	114
8. Referências Bibliográficas.....	116

1 Introdução e Justificativa

O ar atmosférico contém microorganismos em suspensão como fungos, bactérias, micotoxinas (produzidas por fungos) e vírus (apesar de não serem considerados células vivas)¹ formando bio-aerossóis. Nesta condição estes microorganismos podem sobreviver por longos períodos. Na forma de bio-aerossóis, estes microorganismos, podem ser inalados e podem agir como vetores de doenças contagiosas como a tuberculose, o hantavírus² (doença hantavirose), o antraz³, a gripe aviária (A/H5N1) e gripe suína (A/H1N1). Se o ar que respiramos nas ruas e bosques pode conter bioaerossóis, o que dizer dos sistemas de ventilação e condicionamento de ar? Estes circuitos fechados de ar são potenciais fontes de proliferação de patógenos. Visando melhorar a qualidade de ar em sistemas fechados e prevenir a contaminação por bio-aerossóis em locais abertos é desejável o desenvolvimento de revestimentos capazes de prevenir a formação de biofilmes em filtros de ar condicionado, bem como em filtros pessoais quer por mecanismos passivos, quer por mecanismos ativos. Dentre os possíveis filmes de prevenção de formação de biofilme temos o uso de filmes com nanopartículas fotoativas, semicondutores fotocatalisadores. O TiO_2 é um bom candidato para combater bioaerossóis como é documentado pela patente coreana KR2006079388-A⁴; na patente internacional WO2007034586-A1⁵ é reportado o uso de NP de TiO_2 modificadas superficialmente como agente citotóxico contra células cancerígenas. Moraes, Donaire e Durán⁶ reportaram a eficiência fotocatalítica do dióxido de titânio na desinfecção de água de reservatório mostrando que um tempo de 7 h de tratamento era eficiente para destruir as bactérias *E.Coli*. Recentemente, nanopartículas de dióxido de titânio decoradas com nanopartículas de prata foram usadas para destruição fotocatalítica de agentes patogênicos em máscaras hospitalares⁷. Nesta mesma linha de sistemas fotoativos temos o ácido fosfotungstico, HPW, cujo comportamento fotoquímico se assemelha àquele apresentado pelo TiO_2 . Também é reportado que o uso dos dois sistemas, ou seja, nanopartículas de TiO_2 recobertas com fosfotungstato pode levar a uma

ampliação da atividade fotocatalítica do TiO_2 e um aumento na atividade citotóxica, em especial em máscaras respiratórias e em filtros de ar em sistemas fechados (sistemas de ar condicionado e ventilação de granjas). Os polioxometalatos são compostos moleculares do tipo polioxoânions com atividade fotocatalítica similar ao TiO_2 , porém como são moléculas apresentam grande solubilidade em diversas matrizes sendo facilmente dispersos nestas, o que nem sempre acontece com a titânia e outros fotocalisadores semicondutores. Desta forma, foi usado o fosfotungstato como fotocalisador nestes compósitos.

No intuito de ampliar a atividade fotoinibidora/fotocatalítica do fosfotungstato usando a dopagem do material híbrido (matriz) contendo este fotocalisador com nanopartículas de dióxido de titânio, testes de fotodegradação de filmes de biomoléculas envolvidos no processo de adesão, como fosfolipídeos, serão realizados para verificar a possível fotoatividade destes filmes na prevenção de formação de biofilme. Juntos, a matriz híbrida com fosfotungstato e a titânia terão o papel de atuar na inibição da adesão celular de maneira passiva, quer por questões de carga superficial, rugosidade ou energia superficial..

2. Objetivos

Desenvolver filmes híbridos do tipo Silicatos Organicamente Modificados (Ormosils) contendo ácido fosfotúngstico e sua modificação pela dopagem com nanopartículas de TiO_2 para a fotodegradação de biomoléculas da membrana celular (lipídeos) e na sequência testar estes filmes como inibidores passivos ou ativos de formação de biofilmes de *E.Coli*

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Processo sol gel

O termo sol-gel é utilizado para descrever uma preparação de materiais poliméricos ou cerâmicos por um processo que envolve a preparação de um *sol* e sua posterior gelificação⁸. O termo *sol* é definido como sendo uma dispersão de partículas coloidais (com tamanho entre 1 e 100 nm) 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 interstícios⁹. A secagem do gel leva ao aerogel ou xerogel dependendo se ocorre a prevenção do colapso dos poros durante a secagem ou não, respectivamente. Nesta tese iremos nos concentrar nos xerogéis.

A Figura 1 ilustra o processo de gelificação. Ocorrendo somente pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão, os géis coloidais resultam da agregação de partículas primárias, como mostrado na figura 1a. Quando os géis são preparados por reações de polimerização, a gelificação ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas (Fig.1b).¹⁰

Figura 1. Esquema ilustrativo de gelificação para sistemas a) coloidais e b) poliméricos.

Fonte: Adaptação de Souza (2014) a partir de HIRATSUKA, R.S., 1995, p.171¹⁰.

A química do processo sol-gel é baseada 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. Os alcóxidos de silício são os mais estudados e empregados, sendo de grande interesse neste trabalho.

Devido à alta eletronegatividade do grupo alcóxido (OR) o átomo central torna-se susceptível à ataques nucleofílicos. Como é de se esperar, em princípio, qualquer elemento metálico ou semi-metálico pode formar um alcóxido que, devido ao forte efeito de polarização da ligação oxigênio-elemento sofre facilmente a interação com a molécula de água, numa clássica reação de hidrólise, a qual gera um grupo hidroxílico M-OH (Metal-OH) característica de uma reação de substituição nucleofílica do tipo S_N2 . Nesta reação o grupo OH, irá aproximar-se primeiramente do metal, para que então o ligante (grupo OR) possa abandonar a molécula precursora. A hidrólise pode ser realizada em meio ácido ou básico.

Na hidrólise ácida ocorre a protonação da molécula precursora com a aproximação do grupo H_3O^+ liberando água (nucleófilo) enquanto na básica o grupo OH^- (nucleófilo) ataca diretamente o precursor formando um complexo ativado pentacoordenado que irá perder um grupo alcóxido que hidrolisa a água para formar um álcool.¹¹

Na síntese de sílica pelo processo sol-gel a condensação pode ocorrer com a liberação de água ou álcool, dependendo da natureza do precursor de silício e do tipo de grupo que se condensa. Caso ocorra entre grupos silanóis, libera-se água, caso ocorra entre um alcóxido e um grupo silanol, via reação de condensação via oxalação ou olação. Na oxalação reagem duas espécies hidrolisadas do alcóxido metálico, dando origem a ligacoes “oxo” M-O-M, libertando-se moléculas de água ou de álcool (reação 1 e 2), enquanto, na olação uma dessas espécies esta protonada, gerando uma ponte μ -OH, ou seja, ligações M-OH-M:

Reação 1. Reação de condensação do tipo oxalação liberando água.

Reação 2 - Reação de condensação do tipo oxalação liberando álcool.

Reação 3. Reação de olação gerando ligações M-OH-M:

No processo sol-gel a hidrólise e a condensação ocorrem simultaneamente, e a velocidade de reação relativa entre esses processos é um dos fatores que determinam a estrutura do sol. Em meio ácido, a velocidade de reação de hidrólise é mais rápida do que a velocidade de reação de condensação, formando redes poliméricas fracamente ramificadas. Isto ocorre, porque a velocidade de reação de condensação diminui com o aumento de ligações Si-O ao redor do átomo central de silício.

Em condições básicas, ocorre o contrário, formando redes poliméricas ramificadas e entrecruzadas apresentando anéis de sesquisiloxanos, gerando polímeros mais ramificados¹². Estes polímeros formados em meio básico possuem um grande número de ligações entrecruzadas formando polímeros em rede.

Nesta tese, o interesse nesse processo é sua utilização para a formação de redes tridimensionais de silicatos envolvendo organossilanos nitrogenados e tetraetilortossilicato, ou seja, silicatos organicamente modificados (ormosils) que possam atuar como sistema do tipo hospedeiro (matriz) para fosfotungstatos e nanopartículas de titânia.

3.2. Organossilanos e Ormosil

Organossilanos são compostos onde há uma ligação de um átomo de silício a um grupo funcional orgânico. Estes compostos podem formar moléculas simples ou macromoléculas. O átomo de silício normalmente adota geometrias

tetraédricas, e mais raramente octaédricas e bipirâmides trigonais. O silício, em contraste ao carbono, é mais volumoso e sua eletronegatividade é menor.

Interessam-nos especialmente, neste trabalho, os compostos de baixa massa molar bifuncionais. Dentre as funções de nosso interesse estão grupos de saída eficientes como alcóxidos e halogênios. Esta classe de compostos organossilanos são usados amplamente como agentes promotores de adesão, entre polímeros orgânicos e substratos metálicos ou vítreos, agentes de controle de energia superficial, agentes de compatibilização em compósitos polímero-cerâmica ou polímero-metal, e também como agentes modificadores de superfícies¹³

A estrutura química dessa classe de compostos tem a seguinte fórmula geral:

X- Grupo Hidrolisável

Y- Grupo Organofuncional

R- Cadeia Alquílica

Os precursores mais amplamente utilizados para a fabricação de materiais baseados em sílica (sol-gel) são o tetrametoxisilano (TMOS) e o tetraetilortosilicato (TEOS). Se a hidrólise com tetra alcóxissilanos leva à sílica, dita gel, a co-hidrólise destes na presença de organossilanos leva aos materiais híbridos chamados de silicatos organicamente modificados, ormosils.¹⁴

Figura 2. Tetraetilortosilicato (TEOS) e outros monômeros usados na preparação de ormosils e a reação de formação do ormosil.

Fonte:TRIPATHI, V.S.; KANDIMALLA, V.B.; JU, H.,2005, p.1073.

A modificação orgânica é principalmente empregada para reduzir a porcentagem de ligação entrecruzada, assim como, melhorar a adesão do filme no suporte, reduzir a concentração de grupos silanóis na superfície, a capacidade de troca iônica, alterar o coeficiente de partição ou introduzir grupos funcionais reativos.

As propriedades mecânicas e óticas do material vítreo, preparados pelo processo sol-gel, podem ser melhoradas utilizando precursores alcóxidos modificados $\text{RSi}(\text{OEt})_3$ para formar matrizes de sistemas híbridos orgânico-inorgânicos. Os grupos orgânicos não só atuam modulando as propriedades mecânicas do Ormosil, mas também modulando o transporte de massa através dos filmes de ormosils, a energia superficial dos ormosils, e a fotoreatividade do fosfotungstato e das nanopartículas de titânia.

3.3. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos

O constante avanço tecnológico está intimamente relacionado com a pesquisa de novos materiais cujas propriedades específicas permitam aplicações inovadoras e o aprimoramento de tecnologias já existentes. Neste contexto, híbridos orgânico-inorgânicos são cada vez mais estudados, por conta de se tratar de novos materiais multifuncionais que oferecem a possibilidade de ajustar suas propriedades pelo controle da morfologia dos seus componentes, da proporção

entre os materiais inorgânicos e orgânicos, bem como da natureza química dos seus componentes.¹⁵

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos são constituídos pela combinação dos componentes orgânicos e inorgânicos que, normalmente, apresentam propriedades complementares, dando origem a um único material com propriedades diferenciadas daqueles que lhe deram origem.¹⁶ Esses materiais são homogêneos, devido à mistura dos componentes ao nível molecular, usualmente em escala de nanômetro a sub-micrômetro. Embora tais materiais sejam macroscopicamente homogêneos, suas propriedades refletem a natureza química dos blocos pelos quais foram formados^{17,18}. Desta forma os materiais híbridos são compósitos em escala molecular (nanométrica ou sub-nanométrica), portanto, são legítimos nanocompósitos.

O material híbrido caracteriza-se como tendo a soma das contribuições individuais dos seus constituintes juntamente com as características morfológicas dos seus domínios. A influência da interface é muito significativa, e a natureza desta vem sendo utilizada para classificar os híbridos em diferentes classes. São representados em 3 classes distintas:

Classe I: interação por ligações de hidrogênio, forças de van der Waals ou ligações iônicas. Podem ser preparados por diferentes rotas sintéticas usando-se da química supra macromolecular.

Compostos orgânicos como corantes ou catalisadores podem ser imobilizados em uma rede inorgânica pelo processo da policondensação, assim ficam aprisionados na matriz inorgânica após a evaporação do solvente²¹, ilustrado na figura 3.

Figura 3. Moléculas orgânicas imobilizadas em uma rede inorgânica, preparadas via sol gel, a partir de precursores inorgânicos.

Fonte: JOSÉ, N.M.; PRADO, L.A.S.A.; 2005, p.282¹⁶.

- a) Polimerização por radiação ultra-violeta a partir de monômeros orgânicos que estão acondicionados nos poros da matriz inorgânica. O resultado é o polímero entrelaçado na matriz inorgânica formando uma rede polimérica, ilustrado na figura 4.

Figura 4. Monômeros orgânicos embebidos em uma matriz inorgânica seguida de polimerização, gerando o correspondente polímero.

Fonte: JOSÉ, N.M.; PRADO, L.A.S.A.; 2005, p.282¹⁶.

- b) Sem haver ligação química entre as fases, conforme mostrado na figura 5 há formação simultânea de duas redes independentes partindo dos precursores orgânico-inorgânico. O produto torna-se uma rede polimérica interpenetrante (IPN).

Figura 5. Formação simultânea de duas redes a partir de monômeros orgânicos e inorgânicos.

Fonte: JOSÉ, N.M.; PRADO, L.A.S.A.; 2005, p.282.

Classe II: Materiais híbridos orgânico-inorgânicos que são constituídos por estruturas nas quais os componentes orgânicos e inorgânicos estão ligados de forma covalente ou iônico-covalente, conforme esquematizado na Figura 6.

Figura 6. Material híbrido orgânico-inorgânico com ligações covalentes entre as fases.

Fonte: JOSÉ, N.M.; PRADO, L.A.S.A.; 2005, p.282¹⁶.

Classe III: Baseada na combinação dos dois tipos de interação descritos nas classes I e II. Um exemplo deste híbrido é o material obtido por um polímero orgânico contendo grupos alcoxissilanos, $(SiOR)_3$, hidrolisáveis, e grupos aceptores de hidrogênio (carbonila, amina, imida, etc.), conforme esquematizado na Figura 7.

Figura 7. Material híbrido orgânico-inorgânico formado por ligações covalentes apresentando pontes de hidrogênio.

Fonte: JOSÉ, N.M.; PRADO, L.A.S.A.; 2005, p.282¹⁶.

De interesse neste trabalho pelo processo sol-gel é a obtenção de um material híbrido de classe II utilizando precursores organossilanos $R'_xSi(OR)_{4-x}$. A introdução de um substituinte não hidrolisável no átomo de silício de um precursor alcóxido tem um efeito dramático no material obtido após a condensação dos monômeros hidrolisados⁵. Ormosils são materiais extremamente versáteis e estáveis cinética e termodinamicamente, podendo apresentar estabilidade frente a meios fortemente ácidos e relativamente básicos, além de possuírem a porosidade necessária para oclusão de enzimas, catalisadores, sondas fluorescentes, fármacos e compostos fotocromáticos¹⁹. Portanto, os ormosils são excelentes materiais para atuarem como hospedeiros (hosts) de diversas moléculas (hóspedes ou *guests*) em aplicações que vão da liberação controlada de drogas à fotônica passando pela proteção à corrosão e à odontologia.

3.4. Heteropolioxometalatos do tipo Keggin

Os polioxometalatos (POMs) ou polioxoânions constituem uma classe de nanoclusters formados por oxigênio e metais de transição cujas variedades em tamanho, composição e arquitetura molecular os têm destinados às mais variadas aplicações. As principais estão centradas em eletrônica molecular, dispositivos eletro-ópticos, ciência dos materiais e ciências biomédicas⁵. Os polioxometalatos são divididos em isopoliânions e heteropoliânions.

O primeiro poliânion foi reportado em 1826 por *Berzelius*, que descreveu o precipitado amarelo produzido pela reação de um molibdato com ácido fosfórico,

formando o heteropolioxometalato que hoje conhecemos como o fosfomolibdato²⁰ $[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$. A estrutura de um composto bem similar, isto é $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$, foi determinada aproximadamente 100 anos mais tarde através de difração de raios X, método de monocristal, por Keggin⁶. A complexidade e beleza desta nova estrutura fez com que fosse adotado o nome “Keggin” para esse politungstato e para as séries de poliânions com fórmula mínima $[\text{XM}_{12}\text{O}_{40}]^{n-}$. Na fórmula, X pode ser B, Si, Ge, P^{V} , As^{V} , enquanto que M pode ser tanto molibdênio quanto tungstênio^{28,21}.

Dentre as principais características dos heteropolioxometalatos de Keggin, destacam-se suas capacidades de aceitarem elétrons –sendo reduzidos – formando compostos de valência mista, os chamados heteropoliazuis (*heteropoly blue*). A alta afinidade eletrônica facilita a redução, enquanto, o caráter não-ligante do LUMO (combinação linear dos orbitais d_{xy} com alguma participação dos orbitais 2p dos íons O_t .) dos HPOMs, fazem com que eles possam receber elétrons sem ter sua estrutura significativamente perturbada²². Uma vez reduzidos, estes compostos passam a apresentar bandas de transferência de carga intervalência metal-metal $\text{M}^{5+} \rightarrow \text{M}^{6+}$, cuja energia é compatível com a energia da luz vermelha do espectro eletromagnético, portanto, conferindo a cor azul aos HPOMs reduzidos²⁵. Este processo de fotorredução resulta na formação dos heteropoliazuis, o que é a base do comportamento fotocromico destes compostos²⁵. Essa cor azulada na presença de oxigênio desaparece, sendo o tempo de descoloração dependente do tempo que a amostra foi irradiada, ou da composição/espessura do filme. Esse processo depende exclusivamente da presença do oxigênio e não de um mecanismo de auto-oxirredução e isso foi comprovado através do armazenamento do filme irradiado em atmosfera com baixa concentração de O_2 , no qual a descoloração ocorreu em tempo mais lento.²²

Sabe-se ainda, que heteropoliânions, em presença de determinados grupos orgânicos, podem ser fotorreduzidos de maneira mais eficiente após radiação com raios U.V. por meio da fotoexcitação das bandas LMCT ($\text{O}^{2-} \rightarrow \text{M}^{6+}$). O mecanismo proposto por Yamase²³ para explicar o fotocromismo dos sais de alquilamônios de

polioxometalatos, descreve que na etapa imediatamente anterior a oxidação do substrato orgânico pelo estado excitado do fosfotungstato há a formação de um intermediário de transferência de carga entre o íon alquilamônio e o fosfotungstato no estado excitado. Este complexo envolve a transferência de prótons do alquilamônio para o fosfotungstato. É a presença deste complexo de transferência de carga que leva a um fotocromismo reversível para o sistema, visto que possibilita tanto a redução do poliânion (Figura 8) assim como a oxidação do *heteropoly blue* (reação 4).

Figura 8. Reação de redução do poliânion.

Fonte: YAMASE, T.,1998, p.312²³.

Reação 4. Reação de oxidação.

Esse mecanismo proposto por Yamase²³ é aplicável para heteropoliânions do tipo Keggin, e o processo de branqueamento ocorre pela reação inversa, iniciando-se pela transferência de um elétron do átomo M para a molécula de oxigênio.

Os heteropoliânions do tipo Keggin apresentam vários isômeros, entretanto dois isômeros são mais estáveis. Estes isômeros de maior estabilidade são o isômero α e o isômero β , sendo que isomerismo foi reportado pela primeira vez em 1864 por Jean Charles Galissard e Marignac. 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 a estrutura de Keggin. Pode ser vista como o conjunto de

quatrogrupos de três octaedros M_3O_{13} chamados tríades.²⁴ Estes grupos compartilham vértices entre si e com o tetraedro central. Na parte superior da estrutura e na parte inferior existe uma tríade, enquanto o equador é ocupado com duas tríades unidas entre si e com as tríades na parte superior e inferior via pontes de O_2 .²⁵ Analisando a estrutura da Figura 9, podemos ver que existem quatro tipos de íons óxido, são eles:

- 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 9. (a) Representação esquemática de um heteropoliânion do tipo Keggin; (b) Representação esquemática da estrutura do polioxoânio a-PW mostrando a posição do íon 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, G. M. et al., 1977 p.1040²⁵.

O HPW pode ser encontrado em quatro tipos de graus de hidratação²⁶ e em todas elas os polioxoânions estão interligados entre si por uma rede de ligações de hidrogênio que é interligada via íons $[\text{H}_5\text{O}_2^+]$. Desta forma, estes íons interagem através de moléculas de água com os íons óxido da superfície dos polioxometalatos usando as 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 $[\text{H}_5\text{O}_2^+]$.

Os polioxometalatos encontram aplicações em eletrônica molecular, dispositivos eletro-ópticos, filmes auto-limpantes, fotodegradação de poluentes, processos de separação de proteínas, catálise heterogênea e dispositivos biomédicos²⁷. Os polioxometalatos são divididos em isopoliânions e heteropoliânions. Os íons metálicos majoritários são chamados de *addenda* e são normalmente íons de Mo, V, Nb e W em função da capacidade destes íons apresentarem estados de oxidação elevados e formarem estruturas poliédricas com os íons O^{2-} . Dentre estes, os compostos de Keggin²⁸, como o fosfotungstato, possuem fórmula mínima $[\text{XM}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$. O espectro eletrônico dos POM do tipo Keggin é dominado por transições eletrônicas do tipo transferência de carga Ligante-Metal (LMCT) $\text{O}_{2c1}(2p) \rightarrow \text{W}_{\text{triade}}(5d,6p)$ e íons O^{2-} delocalizados sobre o cluster $\text{W}_{12}\text{O}_{36}$ para orbitais 5d e 6p dos íons W^{6+} delocalizados no cluster $\text{W}_{12}\text{O}_{36}$ ²⁹.

A presença de bandas LMCT $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{M}$ de alta energia nos POM e de transições interbandas nos óxidos binários semicondutores permite estabelecer um paralelo entre a atividade fotocatalítica destes sistemas. No TiO_2 a absorção de radiação UV leva a uma transição interbandas, portanto forma-se um par elétron-buraco (par e^- - h^+). A reação entre o elétron na BC e o O_2 têm potencial de redução suficientemente positivo para formar H_2O_2 , assim, como, a reação com $\text{H}^+_{(\text{aq})}$ pode levar à formação de H_2 . Ao passo que a reação do h^+ na BC com H_2O possui potencial suficientemente positivo para formar hidroxila.

Langford e colaboradores³⁰ compararam a atividade fotocatalítica do ácido fosfotúngstico e da suspensão coloidal de fosfotungstato de cézio com uma

suspensão coloidal do dióxido de titânio para a foto-oxidação de N-metil-pirrolidona e atrazina. Nestes estudos eles verificaram que o POM apresentava um rendimento quântico menor que a titânia para os dois substratos, o que foi atribuído à baixa área superficial específica do fosfotungstato de cério. Farhadi e colaboradores³¹ mostraram que a imobilização de ácido fosfotúngstico em xerogéis de sílica é um método eficiente na foto-oxidação de álcoois benzílicos primários e secundários à cetonas e aldeídos com aumento de rendimento quântico após a imobilização, enquanto Li e colaboradores³² demonstraram que xerogéis de sílica dopados com HPOMs lacunares são fotocatalisadores eficientes na foto-oxidação de soluções aquosas de ácido fórmico.

3.5. Dióxido de Titânio

O dióxido de titânio puro (TiO_2) é um sólido cristalino incolor, estável, anfótero, apesar de apresentar características mais ácidas do que básicas, é também polimorfo, existindo em três formas cristalinas fundamentais: rutilo tetragonal, anatase e brookita ortorrômbica. Porém, as mais comuns são a anatase e o rutilo.

Dados cristalográficos mostram que em todas elas o átomo de titânio está coordenado por quatro O^{2-} equidistantes formando o plano equatorial e dois O^{2-} mais afastados com ligações Ti-O ditas axiais perpendiculares ao plano equatorial, veja figura 10 para valores de ângulos e distâncias de ligação numa simetria D_{4h} , e cada O^{2-} se coordena a três Ti^{4+} .

Figura 10. Representações das estruturas cristalinas do TiO_2 nas formas alotrópicas rutila e anatase: a estrutura cristalina da rutila possui uma cela unitária de dimensões, $a = b = 4.587 \text{ \AA}$, $c = 2.953 \text{ \AA}$, e a fase anatase, $a = b = 3.782 \text{ \AA}$, $c = 9,502 \text{ \AA}$.

Fonte: NIE, X., et al., 2009, p.396³³.

O alto índice de refração dos cristais de rutilo é responsável pelo seu maior poder opacificante (capacidade de bloquear a passagem da luz por espalhamento Rayleigh) e superior estabilidade térmica³⁴. É a principal razão para seu uso preferencial, em relação à anatase, em aplicações como esmaltes e materiais cerâmicos³⁵. A anatase é usada apenas em algumas aplicações específicas: possui atividade fotocatalítica superior quando comparada com a fase rutilo.^{36,37}

A titânia tem encontrada largas aplicações na catálise heterogênea e na fotocatalise, seja no campo de células solares (fotoeletrolise, convertendo energia solar em energia elétrica)³⁸, catalisador em sínteses orgânicas, purificação de água e ar³⁹ e materiais bactericidas e/ou autolimpantes^{40,41}. O estado excitado da titânia apresenta um buraco na banda de valência que possui alto potencial de

oxidação, razão pela qual atrai tanto interesse na fotodegradação oxidativa de poluentes e microorganismos. Além disto, a titânia não apresenta fotocorrosão e tem baixa toxicidade⁴².

Dentre as formas alotrópicas, a anatase apresenta maior fotoatividade, seguido da rutilo e da brookita. A eficiência da titânia depende fortemente de vários fatores incluindo pureza de fase, área superficial, tamanho do cristalito, natureza dos dopantes, método de preparação entre outros.⁴³.

A energia de “band gap” (E_g) da titânia é de 3,2 eV na anatase, sendo a energia mínima necessária para excitar o elétron e promovê-lo para a borda inferior da banda de condução (BC)⁴⁴. A representação esquemática da partícula do semiconductor na Figura 11 mostra a absorção de fótons com energia superior à energia de “band gap” resultando na promoção de um elétron da banda de valência para a banda de condução com geração concomitante de um buraco (h^+) na banda de valência⁴⁵. (reação 4). j

Reação 5:

Figura 11. Mecanismo simplificado para fotoativação de um semiconductor.

Fonte: NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM., 1998, p. 673⁴⁵.

Estes buracos mostram potenciais bastante positivos, na faixa de +2,0 a +3,5 V, suficientemente positivo para gerar radicais $\bullet\text{OH}$, a partir de íons hidroxila e/ou moléculas de água adsorvidas na superfície do semicondutor (Reações 6 e 7), os quais podem subsequente oxidar o contaminante orgânico.

aaga

A eficiência da fotocatalise depende da competição entre o processo em que o elétron é retirado da superfície do semicondutor e o processo de recombinação do par elétron/ buraco o qual resulta na liberação de calor (Reação 8).

O radical hidroxila, um agente oxidante forte apenas consegue atacar o contaminante adsorvido ou na dupla camada elétrica da superfície de TiO_2 devido ao seu tempo de vida curto, de acordo com as reações (9-11):

Estudos recentes têm elucidado que o mecanismo de degradação não se dá exclusivamente através do radical hidroxila, mas também através de outras espécies radicalares derivadas de oxigênio ($\text{O}_2^{\bullet-}$, $\text{HO}_2^\bullet$, etc.) formadas pela captura de elétrons fotogerados⁴⁶.

Nos processos de fotocatalise, tem-se utilizado dois tipos de lâmpadas como fonte de radiação: as lâmpadas germicidas e as de luz negra. A primeira emite radiação na faixa de 254 nm e a segunda na faixa de 300 a 425 nm⁴³, com intensidade luminosa máxima de emissão em 365 nm. Estudos recentes utilizam LED para avaliar a atividade fotocatalítica de nanofibras de titânia dopadas com estanho como reporta Gosh J.P.⁴⁷

3.6. Biofilmes

Estima-se que o biofilme é responsável por cerca de 80% das infecções em diferentes partes do corpo como: infecções pulmonares de pacientes com fibrose cística, além da uretrite, conjuntivite, otite, infecções por cateteres, infecções do ouvido médio, gengivite, cárie, periodontite, implantes ortopédicos entre outras ⁴⁸. Pode-se destacar as infecções crônicas em feridas que geralmente têm sido associadas aos biofilmes uma vez que os microorganismos utilizam as condições da ferida para se aderir, colonizar e multiplicar. Acredita-se que de 65% a 80% dessas feridas devam a sua cronicidade e complicações infecciosas à formação de biofilmes⁴⁹. Esse fato foi evidenciado por James e colaboradores⁵⁰ que, após realizarem biópsias de feridas crônicas e as analisarem por microscopia eletrônica de varredura, puderam notar a presença de biofilmes.

Biofilmes têm despertado um grande interesse nas últimas duas décadas, pois tornou-se claro que a formação de biofilme pode ser o “estilo” preferido das bactérias na natureza⁵⁰. As bactérias rapidamente aderem e formam biofilmes na maioria em superfícies bióticas e abióticas, causando diversos problemas quando instalados em pacientes. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, frequentemente colonizam dispositivos médicos incluindo estimuladores cardíacos, cateteres venosos e urinários, articulações protéticas e as válvulas do coração, e causam infecções crônicas.

A formação do biofilme ocorre por meio das seguintes etapas:

Etapa 1- Transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida, e sua subsequente fixação;

Etapa 2- Crescimento e divisão de células fixas à custa de nutrientes provenientes do líquido circundante, conjuntamente com a produção e excreção de EPS;

Etapa 3- Fixação de células bacterianas flutuantes (e outras partículas), contribuindo para a acumulação do biofilme, formação de microcolônias;

Etapa 4- Maturação do filme⁵¹

Etapa 5- Libertação de material celular por vários tipos de mecanismos: (a) erosão superficial (perda de células individuais), (b) descolamento ("sloughing off"), (c), abrasão e (d) ataque por predadores.

A formação de biofilme não é um processo aleatório. Quando as bactérias encontram uma superfície, uma série de passos geneticamente determinados tornam-se inevitáveis. Quando as bactérias são transportadas para a superfície por sedimentação, fluxo de líquido, elas primeiro aderem fracamente. A fase seguinte, fixação irreversível, depende das propriedades superficiais de ambos: da superfície a ser colonizada e da superfície da célula bacteriana.

Se as condições físico-químicas (por ex., hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade das superfícies e da natureza das substâncias depositadas sobre o substrato) são favoráveis, a fixação reversível é seguida de fixação irreversível. Durante a fixação irreversível, uma monocamada de células únicas adere-se firmemente à superfície. Em seguida, microcolônias desenvolvem-se, formando, o biofilme maduro. Se as condições não são favoráveis, as células podem posteriormente desorver do biofilme e reverter a um estilo de vida planctônico (passo 5, figura 12⁴⁶).

Figura 12. Modelo de desenvolvimento do biofilme. Micrografia com contraste de fase nos estágios com formação do biofilme. *Vibrio cholerae* é mostrado como modelo. Biofilmes foram crescidos em Luria-bertani 24 h sob condições estáticas. Passo 1: Fixação reversível das células sobre a superfície. Passo 2: Fixação irreversível e desenvolvimento da monocamada. Passo 3: Desenvolvimento de microcolônias. Passo 4: Maturação do biofilme. Passo 5: Dessorção das células a partir do biofilme. (magnificação 400×; Kierck-Pearson e Watnick).

Fonte: Adaptada por Souza (2014) a partir de DAHLBERG, C., et al., 1997, p.4695⁵⁰.

O transporte de células livres do meio líquido para uma superfície sólida e a subsequente fixação é a base de todo o desenvolvimento de um biofilme. Esta fase ocorre em poucos minutos após o transporte e adsorção à superfície de substâncias orgânicas dissolvidas no meio aquoso (Etapa 1 e 2). A velocidade a que ocorre a formação inicial do biofilme depende da concentração de moléculas orgânicas no meio aquoso em contato com a superfície sólida, da afinidade das moléculas para com o suporte e das condições hidrodinâmicas do meio líquido⁵², sendo de capital importância para a adesão das moléculas orgânicas as características da superfície do suporte (carga superficial, energia livre de

superfície, rugosidade da superfície)⁵³. Após ter ocorrido a formação inicial do biofilme, ocorre o transporte de células microbianas desde o meio aquoso até à superfície sólida (Etapa 3). Esse transporte ocorre devido ao gradiente de concentrações de microorganismos entre o meio aquático e a superfície.

As moléculas existentes no desenvolvimento inicial do biofilme podem estabelecer ligações para uma adesão forte e estável através da formação de cadeias poliméricas com os microorganismos existentes à superfície, em consequência da motilidade que os microorganismos apresentam, devido à existência de apêndices externos filamentosos, tais como flagelo, pelos (*pili*)⁵³. Uma vez formada a primeira camada de microorganismos, a adesão de outros microorganismos é favorecida. O desenvolvimento e reprodução dos primeiros colonizadores pode também contribuir para a modificação das propriedades superficiais da superfície do suporte, tornando-a mais adequada para a colonização subsequente dos microorganismos secundários, favorecendo assim a acumulação de biofilme⁴⁹.

Há diversos fatores que afetam a formação do biofilme: pH, características do microorganismo utilizado, composição e rugosidade das superfícies, composição do fluido, temperatura, velocidade e turbulência do fluido, presença de partículas inorgânicas e tempo de formação do biofilme, entre outros.

3.7. Bactéria *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um microorganismo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, presente no trato gastrointestinal dos animais e do homem, fazendo parte da microbiota intestinal⁵⁴. São bastonetes Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, crescem bem em meio de cultura sintético, contendo nutrientes simples e fermentam açúcares. No entanto, algumas linhagens desse microorganismo podem ser patogênicas e causar doenças, recebendo a denominação genérica de *Escherichia coli* enterovirulenta (EEC). A adesão da bactéria à célula do hospedeiro é um pré-requisito para a colonização e infecção.

A parede celular dos diferentes grupos de microorganismos apresenta uma grande variabilidade na sua complexidade, arquitetura estrutural, permeabilidade e capacidade de associação com moléculas externas⁵⁵. As bactérias Gram-positivas, apresentam uma porção externa da parede celular (peptideoglicano e ácido lipoteicóico) relativamente mais porosa. (Figura 13.a)⁵⁶. Em contrapartida, as bactérias Gram-negativas, apresentam uma morfologia bem mais complexa que, além de peptideoglicano, possui uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos carregados negativamente, lipoproteínas e proteínas com função de porinas. Esta organização estrutural forma uma barreira física e funcional.

Figura 13. Ilustração da estrutura morfológica das bactérias: (a) Gram-positivas e (b) Gram-negativas.

Fonte: Adaptada por (Souza 2014) a partir de Tortora, 2010, p.116⁵⁶.

Em meio líquido, as bactérias são submetidas a forças hidrodinâmicas, especialmente quando se aproximam das superfícies. As bactérias têm mecanismos de mobilidade própria. Estes mecanismos permitem ultrapassar as forças eletrostáticas e hidrodinâmicas repulsivas encontradas ao redor da superfície aumentando a chance das bactérias interagirem com a superfície.

Em bactérias Gram-negativas como a *E. coli* e a *Salmonella*, a mobilidade ativa é dependente de um aparelho flagelar que é necessário para que elas possam movimentar-se (nadar) em meio líquido ou semi-líquido. Segundo um estudo realizado por Pratt e Kolter⁵⁷ utilizando *E.coli* como um sistema modelo, pode ocorrer uma mutação nos flagelos e afetar a formação do biofilme.

Com o passar das décadas, muito tem-se aprendido sobre as diversas estruturas dos biofilmes. Numerosas espécies de bactérias têm sido reportadas na forma de biofilmes, e parece claro que a formação de biofilme bacteriano é favorecida em ambientes com mais nutrientes⁴⁸. Os biofilmes podem ser formados por múltiplas espécies, como a *E.coli* reportada por Beloin⁵⁸. Tem sido proposto que biofilmes refletem comunidades complexas de microcolônias separadas por canais repletos de água. Estes canais têm sido comparados aos sistemas circulatórios, levando à visão emergente que biofilmes podem ser considerados como organismos multicelulares primitivos.

A adesão bacteriana às superfícies é ditada pelas interações entre a superfície e a célula, sendo influenciadas pela carga da superfície da bactéria (potencial Zeta), pH e força iônica do meio, além da rugosidade da superfície. Uma vez que medir a carga de superfície de bactérias é difícil, essas interações são muitas vezes caracterizados pelo potencial Zeta o que pode ser deduzido das medições eletroforéticas de mobilidade⁵⁹. O potencial Zeta é a diferença de tensão elétrica entre a superfície de cada colóide e a sua suspensão líquida. Este depende da carga da superfície da partícula, bem como da espessura da dupla camada elétrica⁶⁰.

Soni et al⁵¹ realizaram um estudo com quatro tipos de biomassas. Dentre elas a *E.coli* e levedura e verificaram qual a influência do pH no potencial Zeta.

Este resultou mais negativo para a bactéria *E.coli* do que para a levedura, parecendo que o potencial Zeta é independente do pH na faixa de pH de 6,0 a 10 para todas as biomassas estudadas. Estudos de *Hayashi et al*⁶¹ confirmam que diferentes cepas de bactérias, dentro elas a *E.coli*, apresentaram valores negativos para a mobilidade.

Neste trabalho foram desenvolvidos biofilmes usando a bactéria *E.coli*. O protocolo foi adaptado a partir do proposto por Fletcher⁶².

3.8. Energia superficial a partir do ângulo de contato

Em um fluido o que impede as moléculas de se espalharem pelo espaço são as forças de atração e repulsão presentes no interior do fluido. Devido a estas forças há uma diferença em energia no interior e na superfície do líquido, no interior do líquido há choques constantes e forças em todas as direções, as quais se anulam, como mostrado na figura 16. Já as moléculas da superfície do fluido estão aptas apenas para interagir com as moléculas que a cercam dos lados e do interior do fluido. Surge então uma atração da película superficial do fluido para o interior no fluido. Essa força de atração por unidade de comprimento perpendicular à força, é designada por tensão superficial.

Devido à incompressibilidade do fluido, há um deslocamento de moléculas que estão na superfície do fluido para o interior. Quando ocorre o equilíbrio, todas as moléculas da superfície arranjam-se de maneira a reduzir a área por unidade de volume, estado de menor energia. Logo, devido à existência da tensão superficial, e dado que o sólido que tem menor superfície por unidade de volume é a esfera, o líquido agrupa-se de maneira a formar uma esfera.

Figura 14. Ilustração da tensão superficial e de forças atrativas e repulsivas.

Fonte: BRACCO, G., 2013. p.4.⁶⁵

Segundo Aurenty et al⁶³, o ângulo de contato é um parâmetro importante que determina a qualidade do umedecimento de um sólido por um líquido. Quando este parâmetro alcança um valor constante para uma determinada situação, é obtido o equilíbrio termodinâmico na interface.

A caracterização das propriedades da superfície, especialmente a energia livre e seus componentes do sólido, são considerados de extrema importância para entender as propriedades de uma superfície sólida.⁶⁴

Os estudos de molhabilidade envolvem medidas de ângulos de contato, os quais indicam o grau de molhabilidade, como ilustra a figura 15.⁶⁵

- ✓ $\theta < 90^\circ$ Superfície hidrofílica
- ✓ $\theta = 90^\circ$ superfície hidrofóbica
- ✓ $\theta > 90^\circ$ superfície altamente hidrofóbica

Figura 15. Ilustração dos três distintos graus de molhabilidade que podem ocorrer em uma superfície sólida.

Fonte: BRACCO, G., 2013. p.4.⁵⁷.

Quando uma gota de um determinado líquido é depositada em uma superfície plana, há formação de um ângulo pela intersecção da interface líquido-sólido e da interface líquido-vapor; este ângulo é definido como ângulo de contato (θ). Ele é medido traçando uma linha tangente a partir do ponto de contato ao longo da interface líquido-vapor, como mostra a Figura 15.

A Figura 15 mostra que um pequeno ângulo de contato é observado quando o líquido se espalha sobre a superfície, enquanto um grande ângulo de contato é observado quando o líquido toca a superfície.

As medidas de ângulo de contato (θ) foram primeiramente descritas por Thomas Young⁶⁶ em 1805 sendo utilizada ainda nos dias de hoje; é o melhor método para determinar a interação entre um líquido (L) e um sólido (S). A equação de Young é descrita pela interação entre a superfície do sólido e a gota do líquido, conforme mostrado na equação 1.

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad \text{Eq. (1)}$$

No qual: γ_{LV} , γ_{SV} e γ_{SL} representam as energias interfaciais de líquido-vapor, sólido-vapor e sólido-líquido, respectivamente. Esta equação pressupõe que a superfície seja lisa, rígida e homogênea. A partir desta equação obtém-se a medida de ângulo de contato (θ).

Para determinação da energia superficial precisamos de correlacionar o valor do ângulo de contato e da energia superficial. A equação é chamada de Young e Dupré⁶⁷ (equação 2).

$$W_{L/S} = \gamma_L (1 + \cos \theta) \quad \text{Eq. (2)}$$

O trabalho termodinâmico de adesão entre o líquido e o sólido é representado por $W_{L/S}$. Este também pode ser representado, equação 3, como sendo a soma da energia do tipo dispersiva (ou não polar) chamada de Lifshitz-van der Waals, ou LW) e a do tipo polar (chamada também de ácido-base AB)

$$W_{L/S} = W_{L/S}^{AB} + W_{L/S}^{LW} \quad \text{Eq. (3)}$$

Combinando as equações (2) e (3) obtemos a equação 4, a qual relaciona o $\cos\theta$ com os componentes LW e AB do trabalho de adesão, sendo que LW é determinado usando líquidos não polares, enquanto AB é obtido da medida do ângulo de contato de líquidos polares.

$$\cos\theta = \frac{W_{L/S}^{LW}}{\gamma_L} + \frac{W_{L/S}^{AB}}{\gamma_L} - 1 \quad \text{eq (4)}$$

A contribuição $W_{L/S}^{AB}$ é dada pela equação 5:

$$W_{L/S}^{AB} = 2(\gamma_s^+ \cdot \gamma_L^-)^{1/2} + 2(\gamma_s^- \cdot \gamma_L^+)^{1/2} \quad \text{Eq. (5)}$$

Sendo as componentes γ^+ e γ^- as contribuições ácida (receptor de elétrons) e básica (doador de elétrons) do sólido e do líquido respectivamente (γ_s , γ_L).

Da mesma forma, como a contribuição é a composição das contribuições do líquido e do sólido:

$$W_{L/S}^{LW} = 2(\gamma_s^{LW} \cdot \gamma_L^{LW})^{1/2} \quad \text{Eq. (6)}$$

Combinando as equações acima descritas, chega se a uma simplificação demonstrada na equação (7), a qual permite o cálculo da energia superficial.

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \cdot \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_s^+ \cdot \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_s^- \cdot \gamma_L^+}) \quad \text{Eq. (7)}$$

Através de um líquido apolar pode se determinar o termo γ_s^{LW} pela medida do ângulo de contato, aonde $\gamma_L = \gamma_L^{LW}$ e a equação 8, uma vez que não possui os termos de origem ácido-base, torna se mais simples:

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2(\sqrt{\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW}}) \quad \text{Eq.(8)}$$

O uso de dois líquidos polares é necessário par determinar os termos γ^+ e γ^- e para isto, os líquidos precisam ter as componentes ácida (γ_s^+) e básica (γ_s^-) conhecidos. Estes valores são encontrados em tabelas presentes em hanbook⁶⁸ e com o valor do termo γ_s^{LW} calculado para o líquido apolar.

3.9. Fotodegradação

As radiações eletromagnéticas na faixa do ultra violeta (U.V) são conhecidas por causar danos estruturais nas proteínas e nos lipídios. A radiação eletromagnética do tipo UV é definida como tendo um comprimento de onda entre 10-400 nm e é dividida em três regiões: UVA 320 e 400 nm, UVB 280 e 320 e UVC 200 e 280 nm. A camada de ozônio absorve a maior parte da radiação UVB e parte da radiação UVC. Portanto, 90 e 99% da radiação solar que atinge a superfície da terra são compostas de UVA e 1 e 10% é composta de UVB. É bem conhecido que o UVB e UVC tem as mais altas fotodegradação cinética para compostos insaturados como proteínas e lipídeos⁶⁹. Para proteínas há dois caminhos para oxidação fotoquímica, proteínas podem diretamente absorver luz UV para gerar um estado excitado (estado tripleto ou singleto) ou radicais livres⁷⁰.

Um semicondutor muito utilizado em fotocatalise é o TiO_2 , pois possui boa estabilidade e não toxicidade. Uma grande desvantagem do TiO_2 é o *band gap* grande de 3,2 eV, com comprimentos abaixo de 400 nm são necessárias para excitação, o que limita a fotossensibilidade da parte dos raios UV do espectro solar. Segundo Carey⁷¹ a primeira a reportar a destruição de traços de poluentes orgânicos da água por fotocatalise utilizando o TiO_2 , com a irradiação do semicondutor sobre luz UV em presença de oxigênio. Especialmente após publicações de Ollis Et al.⁷², fotocatalise tem sido reconhecida como bom candidato para purificação de água e ar, e também desde que tem sido estudada extensivamente como uma alternativa tecnológica para uso em cloração, ozonização e adsorção de carbono ativo^{73,74}.

Os ensaios de fotodegradação foram realizados no Instituto Superior Técnico de Lisboa (Portugal), sob orientação do professor Luis Felipe Vieira. Para os ensaios de fotodegradação de ormosils contendo fosfolipídios e proteínas, utilizou-se uma lâmpada de Xenônio/Mercúrio calibrada para 250W. Neste trabalho realizamos a fotodegradação de lipídeos para simular a membrana celular de uma bactéria, com o objetivo de desenvolver materiais funcionais que possam

ser utilizados em máscaras hospitalares e granjas nos sistemas de condicionador de ar.

3.9.1. Fosfolípídeo - 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC)

Os lipídios representam uma classe de moléculas anfifílicas caracterizadas por uma grande diversidade quanto a sua estrutura e função biológica, podendo ser desde combustíveis celulares a moléculas sinalizadoras. Em relação à morfologia celular, são importantes constituintes estruturais da membrana plasmática e de organelas. Glicerofosfolipídios são os maiores componentes lipídicos das membranas biológicas e compõem-se de uma molécula glicerol esterificada a dois ácidos graxos nos carbonos 1 e 2, e a um grupo fosfato no carbono 3 (figura 16). O grupo fosfato, por sua vez, está formando um éster comum grupo alcoólico como a colina, etanolamina ou glicerol, sendo que o glicerofosfolipídio mais simples é o ácido fosfatídico que apresenta o átomo de hidrogênio ligado ao grupo fosfato, isto é, o grupo hidroxila (OH) substituindo o grupo colina na figura 16.

Figura 16. Estrutura química da 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC), anfifílico estrutural de lipossomas.

Fonte: Adaptação de Souza (2014) a partir de Sigma-Aldrich, 2014, p-1.

Os glicerofosfolipídios apresentam característica anfifílica, isto é, possuem uma cabeça polar hidrofílica (grupo fosfato esterificado a um grupo alcoólico) e grupos não-polares (hidrofóbicas) correspondentes às cadeias hidrocarbônicas dos ácidos graxos. Possui caráter zwitteriônico, motivo pelo qual tem sido usado

para mimetizar as bicamadas lipídicas de bactérias. Esse caráter anfifílico é o que determina a formação de bicamada dos lipídios em estruturas lamelares quando dispersos em água.⁷⁵

Fosfolipídeos como DMPC e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) são excelentes construtores de blocos para produção de lipossomas, que são constituídos por compostos anfifílicos (caracterizam-se por possuir em sua estrutura uma região polar (iônica ou não) capaz de interagir com a água e uma região apolar que tende a proteger-se do contato com a água)⁷⁶.

Lipossomos são vesículas compostas de fosfolipídios que podem ser orientadas em camadas individuais ou múltiplos círculos concêntricos, contêm um compartimento interno, que pode ser utilizado para o transporte de compostos em numerosos domínios, tais como a entrega de drogas, produtos têxteis, controle de pragas, nutrição, e cosméticos^{77,78}. Lipossomos com lenta liberação podem ser úteis para descontaminar superfícies auto duradouras, como forros e filtros de ventilação de aquecimento e ar condicionado (AVAC) sistemas e controle, em longo prazo, do crescimento de mofo e outros contaminantes do ar. A pesquisa anterior demonstrou que a liberação controlada pode ser desencadeada por uma variedade de estímulos físicos e elétricos, tais como pH, temperatura, enzimas, ou luz. O mecanismo de liberação depende, principalmente, da perturbação do controle das bicamadas lipídicas por um estímulo no ponto mais fraco, alterando as propriedades estruturais dos lipossomos.

O processo de formação de bicamadas via fusão de vesículas é ainda desconhecido no nível molecular. Uma das hipóteses é a existência de dois estágios⁷⁴. Primeiramente, os lipossomos depositados se imobilizam através de uma interação com a superfície. Com o aumento do tempo de deposição, os lipossomos se deformam, tensionando as ligações das bordas e provocando a ruptura do mesmo. Por fim, ocorre uma reorganização dos fosfolipídios resultando na bicamada sustentada, como mostrada na figura 17⁷⁹

Figura 17. Ilustração esquemática da formação das bicamadas fosfolipídicas sustentadas via método de fusão de vesícula. (a) o lipossomo interage com a superfície. (b) o lipossomo se rompe. (c) os fosfolipídios se reorganizam nas bordas para minimizar as interações hidrofóbicas resultando na formação da bicamada.

Fonte: Apatação de Souza (2014) a partir de LEONENKO, Z.V. et al., 2000, 135.

Estudos realizados por Yuan e Johnston⁸⁰ mostram imagens de microscopia de força atômica (AFM) de vesículas compostas por bicamadas de fosfolídeos de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) e dipalmitoil fosfatidiletilenoamina (DPPE). As imagens mostram as vesículas de lípidos com uma superfície plana lisa que está livre de defeitos, buracos, mas tem várias pequenas áreas de detritos na superfície com espessura de 5nm, as quais são coerentes com a deposição de bicamadas na superfície de mica. Estudos realizados por Spangenberg et al⁸¹, relatam a formação de superfícies multilamelares de bicamadas de fosfolípido, DMPC, as quais apresentaram ilhas e terraços irregulares em toda a superfície. Estas características, segundo os autores, devem se a pouca quantidade de líquido na fase gel.

4. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão descritas as metodologias, insumos e equipamentos utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho.

4.1. Reagentes

Em todo o trabalho foi utilizada uma suspensão de nanopartículas de TiO_2 (33-37% em água Sigma-Aldrich, tamanho de partículas «150nm (DLS)) 0,1% em água deionizada (pH = 7,9). Placas de vidro aluminossilicato de 1 cm^2 (Bioslide), Tetraetilortossilicato 98% (TEOS) (ALDRICH), 3-Glicidóxi-propiltrimetóxi-silano (GLYMO) (ALDRICH), 4-trietóxi-sililbutironitrila (BuTS) (ALDRICH), ácido 12-tungstostungstico P.A hidratado (HPW) (ALDRICH), Ácido Clorídrico 37% (CHEMIS), peróxido de hidrogênio 29% (SYNTH), Hidróxido de amônio 30% (QHEMIS). Solventes: Acetona PA 99,5%, Etanol Absoluto PA 99,3 % (QHEMIS). Meio de cultura Luria Bertani (Acumedia Manufactures, Inc. Lansing, Michigan) (LB), ágar Mueller Hinton (Himedia), tampão fosfato salino (Biosystems) (PBS), Ácido acético glacial (CHEMIS), Glutaraldeído (CHEMIS), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-fosfocolina (DMPC) (ALDRICH). Todos os reagentes foram utilizados sem purificação prévia. A bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi cedida pelo Prof. Dr. José Francisco Hofling da FOP-UNICAMP.

4.2. Pré-Tratamento dos Substratos

4.2.1. Vidros

Os substratos de vidro foram limpos com água deionizada e detergente e, posteriormente, submetidos ao tratamento conhecido como RCA⁴⁸, o qual consiste o aquecimento das placas numa solução 1:1:5 de $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$,

respectivamente, por 30 minutos 80 °C, lavando-as em seguida com água destilada e secando-as sob fluxo de nitrogênio.

4.2.2. Discos de Silício

O tratamento para a limpeza dos discos de silício consiste em 10 etapas:

1º - H_2O_2 + H_2SO_4 (1:3 em volume) durante 10 minutos; 2º - Passar por H_2O desionizada; 3º - 30 segundos em HF 10% (w) em H_2O desionizada. 4º - Passar novamente por H_2O desionizada; 5º - H_2SO_4 puro durante 10 minutos; 6º - Nova passagem por H_2O desionizada; 7º - Repetir o 3º etapa; 8º - Repetir a 4º etapa. 9º - Deixar as placas em H_2O_2 (30 volumes) por 30 minutos. 10º - Repetir a 4º etapa.

4.2.3. Esterilização dos substratos para preparo do biofilme

A esterilização das placas de vidro e dos filmes ormosils sobre vidro foi realizada pela imersão das placas em solução de álcool etílico 70% durante 30 min. Em seguida submetidas foram secas em capela de fluxo laminar (marca SPLabor) sob radiação UV por 30 minutos.⁸².

4.3. Procedimento Experimental

4.3.1. Formação de Filmes Ormosils

Os filmes ormosils foram preparados através do processo sol-gel, a partir de silanos como BUTS 4-trietóxisililbutironitrila, GLYMO (3-glicidoxipropiltriétóxisilano), TEOS (tetraetilortosilicato). Para incorporar as propriedades fotocromicas aos materiais, além de propiciar a catálise ácida das reações de gelificação do sol, adicionou-se ácido fosfotungstico (HPW) previamente pesado e solubilizado na metade no solvente utilizado na preparação do material híbrido. As nanopartículas de TiO_2 foram adicionadas na forma de suspensão 0,1% (p:V) em água. Foram preparadas soluções com diferentes volumes da suspensão de NP de TiO_2 iguais a 20, 200, 1000 e 2000 μL .

respectivamente. Segue abaixo a nomenclatura e a composição em ppm adotada para os filmes ormosils na tabela 1.

Tabela 1 - Identificação e composição dos filmes ormosils (unidade ppm).

Composição	Sem NP	A2	A6	A7	A8
TEOS	1773	1773	1773	1773	1773
BUTS	347	347	347	347	347
HPW	2246	2246	2246	2246	2246
GLYMO	1604	1604	1604	1604	1604
H₂O	824	824	824	824	824
NP TiO₂	-----	0,00958	0,0958	0,49	0,96

Fonte: Autoria própria.

Os filmes foram depositados por meio da técnica de *dip coating*, preparados em triplicatas, que envolve o uso de um elevador de discos para imersão e emersão da placa de vidro na solução por braço mecânico. 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, então, os frascos são fechados e armazenados.

Os parâmetros utilizados para a formação dos filmes ormosils foram os mesmos para todas as amostras, são eles: velocidade de imersão (v_{im}) 10 mm/s e elevação do substrato (v_{el}) 10mm/s, tempo de secagem(t_{sec}) 10 segundos, temperatura de imersão(t_{im}) e 20 imersões na suspensão à temperatura ambiente. Lembrando que a solução de ormosil foi agitada por 10 minutos antes do processo de dip coating, durante o processo as soluções não foram agitadas.

Os filmes ormosils foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho médio no modo de refletância total atenuada (ATR) e espectroscopia Raman.

4.3.2. Preparação dos meios de cultura

Os filmes de biomoléculas (lipídeos saturados e insaturados) foram formados por *dip coating* a partir da imersão de superfícies revestidas com os ormosils em soluções ou suspensões aquosas das biomoléculas. A influência de parâmetros como tempo de imersão, velocidade de imersão, temperatura serão foram os mesmos descritos no item 4.3.1.

4.3.3. Adsorção de Biomoléculas sobre os Filmes de Ormosil

Os filmes de biomoléculas (lipídeos saturados e insaturados) serão formados por *dip coating* a partir da imersão de superfícies revestidas com os ormosils em soluções ou suspensões não-aquosas e aquosas das biomoléculas. A influência de parâmetros como tempo de imersão, velocidade de imersão, temperatura serão estudados sobre a morfologia e composição química dos filmes.

4.3.3.1. Filmes com o fosfolipídeo dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC)

Os filmes de DMPC foram depositados sobre wafer de silício a partir de uma solução 0,1 mg/mL (partindo de uma solução estoque de concentração 10 mg/mL toma-se 100 μ L para um volume de 10 mL de suspensão) de vesículas unilamelares de DMPC durante pelo menos 30 min entre 30 °C e 37 °C para permitir a fusão de vesículas. Na sequência os filmes foram enxaguados com solução do tampão HEPES 10 mM para remover o material não aderido⁸³.

Estes materiais foram submetidos a testes de fotodegradação e foram caracterizados por Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS), Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio e microscopia de força atômica (AFM).

4.3.4. Microorganismos

4.3.4.1. Preparo da Suspensão celular

O preparo da suspensão celular foi realizada pelo laboratório da professora doutora Janice Rodrigues Perusi, segundo trabalho desenvolvido por MELO⁸⁴. A suspensão celular atingiu a fase logarítma em 18 horas , a suspensão celular foi diluída em PBS até obter uma concentração celular de 1×10^8 células mL⁻¹.

4.3.4.2. Formação do biofilme sobre substrato de vidro

O trabalho foi desenvolvido no laboratório do grupo de Fotossensibilizadores sob supervisão da professora doutora Janice Rodrigues Perussi. A suspensão utilizada foi aquela descrita no item anterior.

Para cada experimento realizado procedemos o repique da suspensão celular da seguinte maneira: retira-se uma alíquota de 1mL da suspensão celular previamente fornecida no item 4.3.4.1, de *E.coli* transferindo-a para um frasco de 100 mL previamente esterilizado, na seqüência adiciona-se 20 mL de caldo LB. Agita-se esta suspensão à uma velocidade de 1000 rpm à 37 °C por 18 horas em uma incubadora com agitação orbital 410 marca Marconi. Estas condições garantem o crescimento da bactéria. Ajusta-se a densidade ótica (D.O) para 0,9 em 600nm em um espectrofotômetro para garantir que a cada experimento a suspensão celular tenha a concentração inicial de 1×10^8 células/mL.

Para a formação do biofilme utilizamos placas de 24 poços estéreis, na qual colocam-se os substratos de vidro, previamente esterilizados (referido no item 3.2.3.), medindo 1,5x1,0 cm e em seguida despeja-se 4mL dda suspensão celular de *E.coli*, deixando em contato durante 4 horas, etapa promove a adesão celular sobre o susbtrato, em estufa a 37°C. Após isto o substrato é transferido para outra placa de poços estéreis contendo 4 mL de meio de cultura LB fresco. Deixar em agitação à 1000 rpm à 37°C por 48 horas. Este tempo é necessário para que o biofilme seja formado conforme citado anteriormente envolvendo as 4 etapas de

sua formação. Os biofilmes foram realizados em sextuplicata, as amostras preparadas foram: ormosils SNP (controle), A2, A6, A7 e A8.

Os biofilmes sobre ormosils serão submetidos a contagem de colônias bacterianas, método de contagem por placas, analisados quantitativamente por análise com cristal violeta e também foram analisados por MEV,

5. Caracterização e Procedimentos

5.1. Espectroscopia Vibracional

5.1.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FTIR)

Para as amostras dos ormosils, obtidos a partir do xerogel, utilizou-se para as análises de Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho no modo de Transmitância usando um Espectrofotômetro 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 100mg 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 4 cm⁻¹ na faixa de número de onda entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹. O branco foi feito a partir da pastilha de KBr. Neste caso analisou-se somente 3 tipos de amostras com diferentes concentrações de nanopartículas, sendo elas: SNP, A2, A7 e A8.

As medidas de infravermelho dos filmes ormosils contendo lipídeos foram realizadas no Instituto Superior Técnico (IST) em Lisboa, Portugal, sob orientação do professor Luis Filipe Ferreira Vieira. Utilizou-se um espectrofotômetro NicoletImpac no modo ATR no intervalo de 550- 4000 cm⁻¹, com 2cm⁻¹ de resolução. A referência utilizada foi disco de silício, a qual foi subtraída do espectro da amostra. Cada espectro mostrado é o resultado da média de 64 espectros coletados.

5.1.2. Espectroscopia Raman

O espectrômetro Raman utilizado foi o System 2000R (Perkin-Elmer) com detector de germânio. As amostras dos filmes ormosils foram irradiadas com um laser emitindo em um comprimento de onda de 1064 nm (9394,7cm⁻¹) e a potência do laser ajustada para o máximo de 250W. O laser utilizado foi o

Nd:YAG. Os espectros foram coletados com 4cm^{-1} de resolução. As amostras na forma de pós puros foram colocadas em um porta-amostra de alumínio. Os dados coletados foram transferidos e tratados pelo software da Perkin-Elmer. Esta análise foi realizada no Instituto Superior Técnico (IST) em Lisboa, Portugal, sob a orientação do professor Luis Felipe. Ferreira Vieira.

5.2. Microscopia de força atômica (AFM)

A análise de microscopia de força atômica foi realizada para os filmes ormosils e para filmes ormosils contendo fosfolídeo DMPC.

As amostras de filmes ormosils contendo titania possuíam dimensões de $1 \times 2\text{cm}$, amostras filme suportadas por placas de vidro de aluminossilicato.

As amostras de filmes ormosils contendo fosfolídeo foram preparadas sobre placas de vidro de aluminossilicatos com dimensão de $1 \times 2\text{ cm}$.

A precisão da medida é de $0,005\text{ nm}$ em profundidade. As análises foram realizadas no Instituto de Física de São Carlos no microscópio Dimension Icon com ScanAsyst fabricado pela Bruker, modelo OTESP. A ponta utilizada foi de silício cristalino. Utilizou-se o software NanoScope (versão 1.4). A morfologia da superfície foi analisada em modo de varredura, tapping-mode, e os experimentos foram feitos ao ar, sem atmosfera controlada, a rugosidade foi obtida pela raiz média quadrática (R_q) e pela rugosidade máxima ($R_{\text{máx}}$) obtidas a partir do software. A rugosidade máxima, $R_{\text{máx}}$, é calculada pela diferença do ponto mais alto com o ponto mais baixo da área selecionada. A rugosidade obtida pela raiz média quadrática (R_q) calculada por meio da equação 8, onde Z_i é o atual valor de Z (um determinado número dentro da área escolhida), e N é o número de pontos dentro da área selecionada⁸⁵.

$$\sqrt{\frac{\sum Z_i^2}{N}}$$

Eq. (8)

5.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os biofilmes crescidos sobre substrato de vidro foram analisados por MEV. Para preparar os biofilmes para a análise retirou-se os substratos de vidro crescidos com biofilme dos poços estéreis e transferiu-se para poços limpos. A lavagem é feita utilizando glutaraldeído 2,5% deixando-o em contato por 1 hora, esta etapa garante a fixação do biofilme no substrato. A segunda etapa compreende a lavagem com uma solução de álcool etílico à 10, 25, 50, 75, 90 e 100% durante 2-0 minutos cada. Após este procedimento os substratos podem ser levados para a preparação da análise de MEV.

Para estudar a morfologia das amostras, foram realizados experimentos de Microscopia Eletrônica de Varredura em um Microscópio LEO modelo 440 da Central de Análises Químicas (CAQI) do IQSC/USP. Os biofilmes sobre vidro foram previamente metalizados com finas camadas de Carbono de 10 nm, depositadas através de um metalizador (BALTEC Méd 020). As imagens foram obtidas com o microscópio operando com tensão de 15,00 kV e pressão de 1 Pascal (10⁻⁵ bar). As amostras foram montadas em porta-amostra de alumínio horizontais de 1 cm de diâmetro para observação da superfície.

5.4. Método de placas para contagem de colônias bacterianas

Para a contagem dos microorganismos, preparamos placas de petri com meio de cultura Mueller Hinton como descrito no item 4.3.2.

Os biofilmes sobre ormosils foram colocados em um tubo Falcon individualmente, juntamente com uma solução de PBS diluída e agitada durante 3 minutos em vórtex. Este procedimento é necessário para o desprendimento do biofilme do substrato. Foram feitas 12 diluições a partir da solução de PBS com o ormosil. Das diluições 10⁻³, 10⁻⁶, 10⁻⁹ retiraram-se 25µL e gotejou-se sobre a placa de Petri com o meio de cultura. Este foi incubado a 37°C por 48 horas. A contagem das colônias bacterianas foi realizada com o auxílio de um contador de

colônias. O resultado da contagem de colônias bacterianas resultou em valores médios de medidas realizadas em sextuplicata.

5.5. Teste colorimétrico com cristal violeta para determinação total de bactérias no biofilme

O estudo da viabilidade de células totais no substrato contendo biofilme com a bactéria *E.coli*, foi realizado no laboratório de Fotossensibilizadores sob a orientação da prof Janice Perusi. O protocolo foi adaptado segundo Merrit⁸⁶.

Após o processo de formação do biofilme descrito no item 4.3.4.2, retira-se o biofilme e efetua-se a lavagem com solução de PBS, sempre transferindo o substrato para novos poços estéreis, este processo de lavagem repete-se por 3 vezes, com o intuito de remover células não aderidas. A segunda etapa envolve a adição de 100µL de cristal violeta 0,1% (solução aquosa), deixando a placa com o biofilme em contato com o substrato contendo o biofilme por 20 minutos. Os cátions moleculares do cristal violeta difundem e são absorvidos na fina camada do peptídeo glicano, componente da célula, assim como na membrana plasmática, corando-as. Na terceira etapa, o cristal violeta é desorvido por lavagem do substrato com PBS por 3 vezes para remover o excesso de cristal violeta do biofilme. A quarta etapa envolve a adição de ácido acético 33% (solução aquosa), o ácido acético rompe a membrana plasmática e permite que o cristal violeta deixe a célula, com isto teremos em solução somente a quantidade de cristal violeta que as células absorveram. Realizamos em seguida a leitura das placas com 96 poços em uma leitora de microplaca TP-Reader NM Thermo Plate na OD (densidade ótica) 560 nm.. As leituras de densidade ótica permitiram o cálculo do Índice de Formação Específica de Biofilme (FEB) e crescimento total. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

5.6. Medidas de ângulo de contato

Para estudar a superfície dos filmes ormosils e obtermos informações sobre a polaridade da superfície, realizaram-se medidas de ângulo de contato com diversos solventes. Com o auxílio de uma microseringa foi colocada sobre as diversas amostras de filmes ormosils uma gota de aproximadamente 10 μL de líquido (água, α -bromonaftaleno, diiodometano, formamida), logo em seguida a imagem foi capturada pelo goniômetro (equipado com câmera CCD com lente de aumento de 75x) e armazenada, o próprio software calcula e informa o valor do ângulo de contato. Os resultados foram organizados em Tabelas e gráficos. A medida foi realizada em sextuplicata.

5.7. Cálculos da energia superficial dos filmes ormosils

Após o estudo de ângulo e morfologia com filmes ormosils, passamos para o estudo da energia superficial de superfícies com intuito de verificar a influência das propriedades de cada amostra de filme na energia superficial das placas. Para o cálculo da energia superficial foi necessário o uso de líquidos com termos de energia superficial conhecidos para as medidas de ângulo de contato. Estes líquidos com os valores de energia superficial e suas componentes se encontram na Tabela 2, estes valores foram utilizados, de acordo com a equação de Van Oss, apresentada no item 3.8, para calcular o valor da energia superficial do sólido bem como suas componentes.

5.8. Verificação da atividade fotocatalítica dos filmes ormosils contendo biofilme

As amostras de filmes ormosils contendo biofilme de bactéria *E.coli* foram irradiadas com lâmpada UV para verificarmos a atividade bactericida do filme ormosil com TiO_2 . As amostras de filmes ormosils identificadas na tabela 1 foram irradiadas durante 1 minuto com uma lâmpada negra de 100 W, a distância da lâmpada e das amostras foi de 15 cm. Para procedermos a contagem de colônias

bacterianas realizamos o procedimento descrito no item 5.4 (contagem por placas), como mostra a Figura 18.

Figura 18. Ilustração contendo amostras em placas com poços sob radiação UV.

Fonte: Autoria própria.

Também realizamos a verificação de células viáveis pelo método do cristal violeta, descrito no item 5.5.

Os testes de irradiação foram realizados em sextuplicatas.

5.9. Espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS)

A análise de XPS foi realizada no Instituto Superior Técnico (IST), Lisboa, Portugal sob orientação da professora Ana Maria Botelho do Rego.

Foram analisados os filmes ormosils e filmes ormosils com fosfolipídeos em um espectrofotômetro XSAM 800 (KRATOS Analytical Limited), operado no modo analisador em transmissão fixa (FAT), com uma energia de passagem de 20 eV. Foi usada radiação X de um tubo de raios X com ânodo de alumínio e magnésio e a radiação escolhida foi a AlK_{α} ($h\nu=1486,6$ eV) não monocromática, a fonte de raios X com potência de 120 W (10 mA e 12 kV); o ângulo de coleta do fotoelétron relativo à superfície (TOA) foi de 90° . As amostras foram analisadas em câmara mantida sob ultra alto vácuo (UHV), $\sim 10^{-7}$ Pa. Todas as transferências de amostras foram feitas em ar atmosférico. As mostras foram analisadas à temperatura

ambiente. Nenhuma neutralização de cargas superficiais foi realizada usando *floodgun* foi utilizada. A acumulação de carga superficial gerada pela ionização da amostra pelos raios X foi corrigida usando como referência a energia dos fotoelétrons emitidos pelo C, orbital 1s do C ligado a outros átomos de carbono e/ou de hidrogênio, C 1s (C-H,C-C). Os espectros detalhados foram coletados e armazenados em 300 canais com um passo de 0,1 eV, e 60 s de aquisição por varredura, usando um Sun SPARC Station 4 com um software Vision (Kratos). Uma linha de base de Shirley foi subtraída e o ajuste da curva para os componentes dos picos foi realizado utilizando um perfil pseudo-Voight (combinação linear de Gaussiana e Lorentziana).

Com o intuito de realizar a quantificação, os fatores de sensibilidade foram 0,27 para o Si 2p, 0,66 para O 1s, 0,25 para C 1s, 0,42 para o N1s. O limite de detecção de Ti/C é 3×10^{-5} . O cálculo da sensibilidade da análise de XPS foi realizado conforme descrito no Apêndice A, item 5.9.1.

5.10. Ensaios de fotodegradação

Realizaram-se ensaios com os filmes ormosils contendo lipídeos aderidos à superfície. As amostras foram: SNP, A2, A6, A7 e A8.

Os filmes foram preparados sobre discos de silício conforme descrito no item 4.2.2. Os testes foram realizados em quadruplicata no Instituto Superior Técnico (IST) em Lisboa, Portugal, sob orientação do professor Luis Filipe Ferreira Vieira.

Os filmes foram irradiados com uma lâmpada de xenônio/mercúrio de 250W, em diversos tempos, e foram analisados por espectroscopia de infravermelho como descrito no item 5.1.1.

Os experimentos de fotodegradação foram repetidos em São Carlos no Instituto de Química da USP em nosso laboratório, utilizamos uma fonte de radiação UV da marca Hamamatsu, modelo Lightningcure LC8.

5.10.1. Dessorção de fosfotungstato do ormosil

Um possível mecanismo para a inibição de crescimento de biofilme na ausência e presença da radiação UV seria a dessorção de espécies potencialmente citotóxicas como o fosfotungstato para a solução e sua incorporação pelas células. Com o intuito de analisarmos esta possibilidade, estudou-se as perdas dos componentes do ormosil para solução durante o processo de retirada do biofilme do substrato. Realizamos o experimento colocando os filmes ormosis em uma solução tampão PBS a qual foi agitada por 3 minutos em vortex e então foi realizado uma leitura em um espectrofotômetro JASCO na região do ultravioleta. A presença de uma banda de absorção estreita com centróide em 260nm indicaria a dessorção de fosfotungstato para a solução tampão usada nos experimentos com *E. Coli*

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

A análise de EDXRF foi realizada na Central analítica no Instituto de Química de São Carlos da USP. O equipamento utilizado foi 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. O porta-amostra estava preenchido com gás hélio. Para análise quantitativa de W as amostras foram analisadas em forma de filmes sobre vidro para SNP, A2, A6, A7 e A8. Já para quantificar Ti os filmes foram depositados sobre silício monocristalino por dip coating. A análise quantitativa foi realizada com padrões e o tempo de leitura por amostra e padrão foi de 7000s, atmosfera ambiente. Os padrões foram feitos no nosso laboratório por deposição da suspensão coloidal sobre silício monocristalino por Dip-Coating.

5.12. Determinação do ângulo de contato

Os valores das tensões dos líquidos utilizados para determinar a energia superficial do material estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de tensão energia superficial (em mJ/m^2) e seus componentes para os líquidos utilizados para determinar o ângulo de contato.

	γ_L	γ_L^{LW}	γ_L^{ab}	γ_L^+	γ_L^-
Água	72	21,8	51,0	25,5	25,5
Diodometano	50,8	50,8	0	0	0
α -Bromonaftaleno	44,4	44,4	0	0	0
Formamida	58	39	19	2,28	19,6

Fonte: HAYNE, W.N.; 2012-2013, p.182. ⁸⁷

γ_L Energia Superficial do líquido

γ_L^{LW} Energia dispersiva (ou não polar) do líquido

γ_L^{ab} Energia de origem ácido-base (ou polar) do líquido,

γ_L^+ Contribuição da componente ácida do termo AB para o líquido

γ_L^- Contribuição da componente básica do termo AB para o líquido,

6. Resultados e Discussões

6.1. Análise Quantitativa por Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva (EDXRF)

Analizamos os filmes ormosils SNP, A2, A6 A7 e A8 , os resultados das porcentagens dos componentes encontram-se na Tabela 15. Analisando-se a concentração média em ppm na quantificação de Ti nos filmes ormosils, observamos um aumento linear conforme mostra a Tabela 16. Este aumento é devido ao aumento da concentração em volume de titânia adicionada nos filmes e também é resultante do aumento da quantidade de água nos filmes.

Com relação ao W, pode-se afirmar que a % média de W aumenta linearmente conforme aumentamos a concentração em volume de titânia adicionada nos filmes. Este aumento pode ser devido à adsorção de fosfotungstato na superfície das nanopartículas de titânia formando nanopartículas de fosfotungstato como observado em filmes LBL⁸⁸ que podem flotar e serem recolhidas no processo de formação do filme por *dip-coating*.

Se compararmos estes valores com as porcentagens atômicas encontradas na análise de XPS podemos observar que no preparo de filmes adicionamos o volume de NP de titânia em suspensão aquosa, esta maior quantidade de água no filme A8 causa um aumento da rede de silanos no filme, aumentando assim a quantidade de átomos de W no material. Por isto nesta análise também observamos o aumento de W com o aumento da quantidade de água no ormosil

Tabela 3- Resultados da quantificação em porcentagem de W nos filmes ormosils pela técnica EDXRF.

	Média(%)	Desvio padrão(%)
Sem NP	1,17	0,01
A2	2,06	0,02
A6	2,30	0,01
A7	2,54	0,02
A8	3,97	0,02

Fonte: Autoria própria. Dados obtidos por Orlando Ysnaga.

Tabela 4- Resultados da quantificação de Ti nos filmes ormosils pela técnica EDXRF.

	Média(ppm)	Desvio padrão(ppm)
Sem NP	119	31
A2	196	23
A6	262	17
A7	522	33
A8	921	35

Fonte: Autoria própria.

6.2. Espectroscopia Vibracional

6.2.1. Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

Foram analisados separadamente os organosilanos que compõe o ormosil. Na figura 19 o espectro de absorção na região do infravermelho médio mostra os componentes: tetraetilortosilicato (TEOS), 3-Glicidóxi-propil-trimetóxi-silano (GLYMO) e 4-trietóxi-silil-butironitrila (BUTS).

Figura 19. Espectro de infravermelho para os componentes do ormosil: (-) GLYMO, (-) BUTS, (-) TEOS.

Fonte: Autoria própria

Analisando a região de 3500-500 cm^{-1} , podemos observar as bandas entre 2889 e 2974 cm^{-1} , estas bandas são referentes à deformação axial da ligação -C-H, estando presentes em todos os silanos na figura 19. Podemos observar para curva em preto, referente a BUTS, a banda em 2247 cm^{-1} , característica do grupo nitrila, -CN, que compõe a butironitrila. Ainda nesta figura podemos observar uma banda de absorção em 1100 cm^{-1} devido à vibração Si-O-R dos grupos etóxi ligados diretamente ao Si⁸⁹, que sobrepõe-se à banda do grupo Si-O-Si na região de 1000-2000 cm^{-1} . Estas bandas são um indicativo que conseguimos formar redes de silicatos orgânicos no processo sol gel.

A figura 20 mostra os espectros de infravermelho para os filmes sobre wafer de silício contendo: fosfolípídeo DMPC, ormosil A8 e ormosil A8 contendo DMPC.

Figura 20. Espectro de absorção na região do infravermelho médio para os filmes de (-) ormosil A8+fosfolipídeo, (-) ormosil A8 e (-) fosfolipídeo sobre wafer de silício.

Fonte: Autoria própria.

Podemos observar na figura 20 a curva em azul referente ao filme Si+A8+fosfolipídeo a banda correspondente à deformação -OH na região de 300 cm^{-1} . A deformação axial assimétrica dos grupos CH_2 e CH_3 apresenta bandas em 2954 e 2918 cm^{-1} , esta mesma banda também se encontra nos espectros em vermelho para os filme Si+fosfo. A principal banda característica do fosfolipídeo DMPC é a banda de éster (C=O) em 1741 cm^{-1} , os grupamentos fosfato e hidroxil podem ser distinguidos na região que compreende $1200\text{-}500\text{ cm}^{-1}$.

Na Figura 21 analisamos a região que compreende $1500\text{-}500\text{ cm}^{-1}$, a curva em preto corresponde a amostra Si+A8, podemos observar as bandas em 1078 e 1082 cm^{-1} atribuída ao acoplamento assimétrico dos modos $\nu_{\text{ass}}\text{P-O}$ e $\nu_{\text{as}}\text{W-O}_t + \nu_{\text{ass}}(\text{W-O}_{2c2}\text{-W})$, entre 979 e 982 cm^{-1} atribuída ao acoplamento simétrico dos modos $\nu_{\text{ass}}(\text{P-O})$ e $\nu_{\text{ass}}(\text{W-O}_t)$, entre 892 e 897 cm^{-1} atribuída aos modos $\nu_{\text{ass}}(\text{W-O}_{2c1}\text{-W})$ e $\nu_{\text{ass}}(\text{W-O}_{2c2}\text{-W})$, e entre 814 e 819 cm^{-1} atribuída ao modo $\nu_{\text{ass}}(\text{W-O}_{2c1}\text{-W})$.

$O_{2c1}-W)^{90}$. Estas mesmas bandas também aparecem quando adicionamos fosfolípido na amostra, como podemos evidenciar na curva em azul (si+A8+fosfo).

Podemos concluir de acordo com os espectros de infravermelho que não houve deslocamento significativo das principais bandas dos componentes, indicando que o cluster do fosfotungstato está presente em toda sua forma após o processamento do filme ormosil.

Figura 21. Espectro na região do infravermelho médio para amostras sobre silício contendo ormosil A8, fosfolípido e ormosil A8 com fosfolípido depositado.

Fonte: Autoria própria.

Comparando a curva em azul e a curva em preto, Figura 21, podemos observar pequenas mudanças no espectro de infravermelho médio. As bandas referentes ao fosfotungstato estão levemente deslocadas. A curva em preto é referente ao ormosil A8, quando depositamos o fosfolípido sobre o rmosil há um

deslocamente para maior numero de onda, sugerindo uma possível interação entre o ormosil e o fosfolípido.

A tabela 5 apresenta as principais bandas evidenciadas nas figuras 20 e 21. Destaca-se a banda larga em 3400 cm^{-1} que é decorrente da deformação axial da ligação OH, proveniente dos grupos silanóis Si-OH, dos grupos hidroxila de álcool ou proveniente da abertura do anel oxirano ou de água presente na amostra. Destaca-se uma banda fraca em torno de 2255 cm^{-1} , Figura 22, atribuída à deformação axial do grupo nitrila da 4-(trietoxisilil)-butironitrila⁹¹. A ausência de deslocamento desta banda nas várias amostras indica que este grupo funcional no Ormosil não está interagindo fortemente com outros componentes do filme e com a sobrecamada lipídica. Estiramentos dos Si-O e Si-O-Si dos siloxanos, o que nos permite confirmar a formação da rede tridimensional de sesquisiloxanos (silicatos), gerada pelas reações de hidrólise e condensação dos alcóxidos de silício.⁹²

Tabela 5 - Listagem das bandas presentes nos espectros das amostras de ormosils com suas atribuições de acordo com os grupos funcionais responsáveis pelas vibrações.

Número de Onda(cm^{-1})	Atribuição
3550-3200	$\nu(\text{O-H})$
3400	deformação axial da ligação –OH
2976 – 2879	deformações axiais das ligações -C-H
2255	deformação axial da ligação –CN
1200-1020	Si-O e Si-O-Si
1076	$\nu(\text{PO}_4) + \nu(\text{W-O}_t)$
980-820	W=O e W-O-W

Fonte: Autoria própria.

É importante ressaltar que a banda entre 1078 e 1082 cm^{-1} têm a contribuição das bandas $\nu_{\text{ass}}(\text{Si-O-Si})$ dos anéis de 4 e 6 membros do silicato⁹³, da banda $\nu_{\text{sym}}(\text{C-O-C})$ da rede de poli(óxido de etileno)^{94,95} formado pela abertura do

anel oxirano do Glymo. Portanto, a análise da banda em 1082 cm^{-1} fica comprometida pela presença de vários grupos que se encontram nesta região. Verificando os espectros não é possível notar um deslocamento ou mudança nas formas da banda, indicando que a introdução de titânia não afeta significativamente a estrutura química do filme. Isso será comprovado pela espectroscopia Raman. No que diz respeito à interação fosfotungstato-nanopartículas os resultados obtidos estão em concordância com Sun et al⁹⁶.

6.2.2. Espectroscopia Raman

O espectro Raman da figura 23 mostra todos os espectros para os filmes ormosils. Observa-se que não há diferença das bandas para o ormosil SNP quando comparado com os demais que contém NP de TiO_2 . A ausência das bandas das fases cristalinas da titânia, Anatase e rutilo, está relacionada à baixa concentração destas no ormosil como mostra a tabela 1.

Analisando-se os espectros da figura 23, podemos verificar que as bandas características do ácido fosfotungstico (HPW) estão presentes em 1002, 989, 918, 898, 517, 373, 231, 213 e 157 cm^{-1} . Essas bandas foram atribuídas por Brigdman da seguinte forma: as bandas em 1002 e 989 cm^{-1} (atribuídas aos modos ns (W-Ot) e nas (W-Ot), respectivamente) são bandas referentes às deformações axiais dos oxigênios terminais, já a banda em 517 cm^{-1} ν_s (W-O-W)) foi atribuída a deformação angular dos óxidos em ponte do tipo 2_c1 . Este grupo funcional é muito importante por atuar como centro básico de Lewis e interagir com o meio que cerca os fosfotungstatos enquanto a banda em 373 cm^{-1} poderia ser atribuída ao modo $p(\text{W-OH}_2)$, do mesmo tungstato ou do H_2WO_4 .⁹⁷

Comparando-se os espectro observa-se que as bandas dos grupos funcionais do fosfotungstato não sofreram deslocamento, os experimentos foram realizados no mesmo equipamento, as amostras foram preparadas no mesmo dia, obtemos o xerogel de todas as amostras após evaporação do solvente e então as

amostras foram analisadas por Raman. Levando estas informações em consideração podemos dizer que ocorreu apenas uma diferença em relação as intensidades relativas o que pode refletir em um aumento da intensidade do campo elétrico ao redor do fosfotungstato, uma mudança de ionicidade ou ainda a presença de outra espécie com grupo cromóforo absorvendo na mesma região, como mostra um trabalho realizado por Gonçalves⁹⁸ em nosso grupo de pesquisa. Um aumento da intensidade do campo elétrico levaria ao aumento de todas as bandas do espectro em um material anisotrópico, não cristalino, como os ormosils, portanto, esta hipótese deve ser deconsiderada. Ainda estamos estudando outras possibilidades.

Figura 22. Espectro Raman para os filmes ormosils: SNP (cor preta), A2-20 μL TiO_2 (cor vermelho), A6-60 μL TiO_2 (cor azul), A7-1000 μL TiO_2 (cor verde), A8-2000 μL TiO_2 (cor rosa).

Fonte: Autoria própria.

Sendo assim foi confirmada através dessas técnicas a integridade do Heteropoliânion fosfotungstato e a formação de uma rede tridimensional de

silicatos e oligômeros de óxido de etileno através da abertura do anel oxirano do GLYMO, que foi constatado através da banda característica.

6.3. Microscopias ormosils e ormosils contendo fosfolipídeo

6.3.1. Microscopia de força atômica (AFM) para filmes ormosils

As amostras de filmes ormosils foram investigadas com intuito de serem obtidas as rugosidades das superfícies, conhecer este fator torna-se importante para sabermos a pré disposição de crescimento bacteriano. O grande interesse nestes estudos de rugosidade deve-se ao fato da rugosidade ser um parâmetro de grande importância para a formação de biofilmes, por exemplo, estudos mostram que biofilmes de *Streptococcus* possuem um número maior de bactérias aderidas sobre o substrato acrílico com o aumento da rugosidade da superfície⁹⁹.

De acordo com a Figura 23, podemos visualizar a amostra SNP com uma escala de observação de 500x500 nm. A imagem mostra a presença de partículas não dissolvidas e/ou formadas por aglomeração durante o processo de formação do filme. Ainda a superfície do filme é irregular possuindo pequenas depressões. É importante ressaltar que estas partículas estão embutidas no filme de ormosils e não se movem quando a ponta do AFM passa por elas, portanto, não são partículas depositadas após a formação do filme, mas formadas durante a formação do filme ou gelificação. O valor da rugosidade encontra-se na tabela 3. O ormosil SNP foi o que apresentou a menor rugosidade.

Para o ormosil A2 , figura 24, a imagem está em uma escala de 500x500 nm, podemos evidenciar uma superfície mais compacta, com regularidades na superfície. Comparado ao ormosil SNP o ormosil A2 (20µL NP TiO₂) apresenta uma menor rugosidade..

Na figura 25 podemos observar a ampliação de 500x500 nm, nesta ampliação já podemos observar que há a presença de diversos aglomerados e/ou partículas não dissolvida presentes sobre toda a superfície do filme. É esperado

que esta amostra possua uma maior rugosidade devido a maior quantidade, em volume e em numero de moles, de titânia adicionada. Na tabela 6 podemos visualizar os valores médios da rugosidade das amostras de filmes ormosils.

Tabela 6 - Rugosidade média para os filmes ormosils para ampliação de 500x500 nm.

	Ampliação 500 nm
semNP (controle)	Rq = 0,0239nm
A2	Rq = 0,00633 nm
A8	Rq = 0,0765 nm

Fonte: Autoria própria.

Quando comparamos as amostras podemos evidenciar que para o ormosil A2 a rugosidade foi menor do que os outros filmes. Esta observação é condizente com o que se observa de maneira qualitativa por MEV. Esta variação de rugosidade mostra que a adição da suspensão aquosa de titânia está afetando o processo de formação do sol e a gelificação que levam à formação dos filmes. O interessante é ver que a rugosidade cresce abruptamente com o aumento do volume de suspensão de NP de titânia (suspensão aquosa como descrito no item 4.3.1.) adicionado. Duas podem ser as causas desta variação: a) a titânia e b) a água usado como fluido para a suspensão das primeiras. A Tabela 7 mostra os diferentes valores do numero de moles de água para cada formulação dos filmes ormosils.

Tabela 7- Valores do numero de moles de água para as diferentes composições dos filmes ormosils.

SNP	A2	A6	A7	A8
0,045	0,047	0,057	0,101	0,156

Fonte: Autoria própria.

A água pode afetar a morfologia do filme uma vez que ela é um reagente na reação de hidrólise dos silanos. Com o aumento da concentração desta, espera-se um deslocamento do equilíbrio para a formação de mais silanos hidrolizados, assim, como um deslocamento na cinética desta reação. Wang e Hu¹⁰⁰ estudaram o papel da adição de água em filmes $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ /ormosil quando varia-se a razão molar da $\text{H}_2\text{O}/\text{OR}$ ($\text{OR} = -\text{OCH}_3, -\text{OC}_2\text{H}_5$) na espessura dos filmes, comprovaram que com o aumento da quantidade de água a espessura dos filmes aumenta. A adição de pequenas quantidades de água no processo de formação do filme resulta em um aumento da velocidade de reação de condensação; conquanto em maiores quantidades o processo de hidrólise é favorecido, o que é reportado causar um aumento de espessura.

Nas amostras dos filmes ormosils verificou-se um aumento de partículas não dissolvidas na superfície dos filmes, este fato também é relatado por Wang e Hu. Quando adiciona-se alto teor de água, a velocidade do sol nas reações de condensação ocorre de maneira mais lenta do que a de hidrólise, o que resulta em reações intramoleculares cíclicas e as espécies levam a formação de partículas. Os dados claramente indicam que o aumento de água nos filmes provocam uma mudança na superfície alterando a rugosidade.

Figura 23. Micrografia do ormosil SNP na escala 500x500 nm. A escala de cor ao lado da imagem indica a profundidade (eixo Z).

Fonte: Autoria própria.

Figura 24. Micrografia do ormosil A2 na escala de 500x500 nm. A escala de cor ao lado da imagem indica a profundidade (eixo Z).

Fonte: Autoria própria.

Figura 25. Micrografia do ormosil A8 na escala de 500x500 nm. A escala de cor ao lado da imagem indica a profundidade (eixo Z).

Fonte: Autoria própria.

6.3.2. Microscopia de força atômica para ormosils recobertos com fosfolipídeo

A microscopia de força atômica é largamente utilizada para investigação da estrutura e das propriedades mecânicas e biológica dos materiais, assim como adesão, estabilidade e transições de fase de lipídeos¹⁰¹. A morfologia dos filmes depende do modo de preparo da solução de fosfolipídeos, assim como depende do modo de deposição desse, sobre a superfície do filme ormosil.

A superfície do ormosil SNP recoberta com fosfolipídeo foi observada em modo de não-contato do tipo Tapping Mode (modo ressonante) capturando-se a imagem topográfica, Figura 26.(a), e imagem por diferença de fase Figura 27.(b). As duas imagens são muito parecidas, muita embora o fenômeno físico responsável pela geração de imagem seja muito diferente nos dois casos. Na Figura 26.(a) o perfil de altura, topográfico, é o responsável por contraste, enquanto, a Figura 26.(b) é a somatória da topografia e da diferença de módulo viscoelástico que gera a imagem. Assim, o módulo de fase carrega uma informação a mais que é função da composição química, da fase cristalina e da própria cristalinidade do material. Na imagem em fase, representada pelo item (b) nas imagens, observou se que a superfície mostra domínios não uniformes contendo formas arredondadas, com eixos mais longos variando entre 110 e 90 nm. O método utilizado para o preparo das vesículas de DMPC garantiram a formação do tipo LUV (do inglês *large unilamellar vesicle*), ou seja, vesículas grandes unilamelares, identificadas pela formação de ilhas¹⁰². Na figura 26(b) podemos evidenciar uma região mais clara (esbranquiçada), esta região representa a fase móvel que suporta as vesículas, durante a aquisição da imagem tem se a impressão que a amostra não está seca, esta região clara da imagem fica com esta tonalidade em função da sua maior mobilidade.

Figura 26. Micrografias de AFM do ormosil SNP contendo fosfolípido DMPC, vesículas destacadas a imagem com ampliação de 1,0x1,0 μ m (a) imagem topográfica (b) imagem em fase.

Fonte: Autoria própria.

Podemos observar na Figura 27 a superfície do filme ormosil SNP contendo fosfolípido DMPC. As imagens possuem ampliações de 20x20 μ m apresentando-se em formas arredondadas e mais regulares sobre a superfície, contem domínios com diferentes tamanhos variando entre 1,30 -1,90 μ m. A região mais escura na Figura 27(b) imagem em fase, podemos atribuir ao ormosil nota-se claramente os depósitos de DMPC, formando ilhas irregulares por toda a superfície. Tal observação é consistente com o método proposto⁸¹, levando à formação de domínios de vesículas

Figura 27. Micrografias de AFM do ormosil SNP contendo fosfolípido DMPC, vesículas destacadas a imagem com ampliação de 20x20 μm . (a) imagem topográfica (b) imagem em fase.

Fonte: Autoria própria.

Para o ormosil A8, Figura 28, contendo o fosfolípido DMPC podemos observar na Figura 28(a) imagem topográfica e 29(b) imagem em fase, uma vesícula com 3 μm de largura, a ampliação da imagem é de 4x4 μm . A região representada pela seção transversal representa o filme ormosil. Todos os filmes ormosils apresentaram a formação de vesículas.

Figura 28. Micrografias de AFM do ormosil A8 contendo fosfolípido DMPC, com ampliação de $4.0 \times 4.0 \mu\text{m}$, (a) imagem topográfica (b) imagem em fase.

Fonte: Autoria própria.

Figura 29. Micrografias de AFM do ormosil A8 contendo fosfolípido DMPC, vesículas destacadas a imagem com ampliação de $20.0 \times 20 \mu\text{m}$. (a) imagem topográfica (b) imagem em fase.

Font Autoria própria.

A imagem 29 (a) representa o ormosil A8 contendo o fosfolípido DMPC, esta imagem evidencia a formação das vesículas de lipídeo sobre o filme ormosil, compreendendo tamanhos entre 2,16-2,83 μm . A imagem 29(b) representa a imagem em fase para a mesma amostra, as regiões mais claras atribuídos aos domínios do ormosil, os quais segundo a seção 6.3.1 forneceu a informação que este filme possui uma maior espessura. As maiores vesículas obtidas sobre a superfície foi no ormosil A8.

6.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) para biofilmes ormosis contendo bactéria *E.coli*

Uma avaliação qualitativa do crescimento de biofilmes ou adesão das bactérias sobre os ormosils foi realizada com o auxílio das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura. As micrografias foram obtidas para os filmes ormosils contendo biofilme de bactérias *Escherichia coli*. A figura 30 possui uma barra de escala de 3 μm . Podemos observar a bactéria *E. coli* do tipo gram negativa, a qual apresenta-se sob a forma de bastonete, sobre toda a superfície. Estas imagens mostram que houve o crescimento de biofilme desta bactéria sobre o ormosil SNP. As bactérias apresentam se agregadas ou dispersas na imagem, sua formação indica uma afinidade com a superfície.

Figura 30. Micrografia da superfície do filme SNP, com barra de escala de 3 μm e magnificação de 8.0x.

Fonte: Autoria própria.

Figura 31. Micrografia da superfície do filme A2 (20 μ L de TiO₂) e filme A6 (200 μ L de NP de TiO₂), respectivamente, barra de escala de 1 μ m e magnificação de 8.0x.

Fonte: Adaptação de Souza (2014) a partir do programa Image Tool.

A figura 31 representa o filme ormosil A2 (contendo 20 μ L de NP de TiO₂), e ormosil A6 (contendo 60 μ L de NP de TiO₂), podemos observar que para o ormosil A2 houve um crescimento bacteriano, típico de bactéria *E.coli* (forma de bastonete) ligeiramente maior do que para o ormosil A6 a imagem mostra aglomerados de bactérias crescidas sobre o ormosil.

A figuras 32 mostram micrografias para o ormosil A7 (1000 μ L de NP de TiO₂) e para o ormosil A8 (2000 μ L de NP de TiO₂), respectivamente. Podemos observar nas imagens uma menor quantidade de bactérias aderidas sobre o ormosil A8. Esta menor quantidade de bactéria pode estar associada ao efeito bactericida da titânia, pois este filme apresenta uma maior concentração em ppm do que o ormosil A7.

Figura 32. Micrografia da superfície do filme A7 (1000 μ L de NP de TiO₂) e do filme A8 (2000 μ L de NP de TiO₂) barra de escala de 1 μ m e magnificação de 8.0x.

Fonte: Adaptação de Souza (2014) a partir do programa Image Tool.

Através microscopia eletrônica de varredura observou-se a formação do biofilme em todas as amostras de filmes ormosils. O filme que não mostrou uma quantidade significativa de microorganismo foi o filme A8. A maior concentração de NP de titânia no filme auxiliou a inibição do crescimento bacteriano sobre a superfície do filme ormosil. Alguns fatores podem explicar este resultado, como a rugosidade que Segundo Pak et al.¹⁰³ investigou o efeito da rugosidade superficial em resinas compósitas na formação de biofilme a topografia (tamanho e profundidade das depressões) é um fator muito importante na formação do biofilme, o que foi corroborado em um trabalho realizado previamente por Gonçalves⁹⁸ no nosso grupo de pesquisa.

Contudo, a rugosidade não é o único fator a influenciar a formação de biofilmes e a adesão celular, outros fatores seriam a polaridade e a carga da superfície. O aumento de TiO₂ nos ormosils deveria ocorrer um aumento da fração de cobertura da superfície com o semiconductor que possui uma superfície polar e anfotérica, tendo ponto de carga zero abaixo do pH do meio de cultura. Sendo assim, a superfície adquiriria cargas negativas o que pode causar inibição da adesão das bactérias.

Como mostrado nas micrografias, o ormosil A8 apresenta a menor tendência para formação de biofilme, devido a maior concentração de titânia adicionada. Procurando compreender melhor este fenômeno outras metodologias de contagem de colônias foram aplicadas e os resultados são descritos a seguir.

6.4. Contagem de colônias bacterianas

Visando obter dados quantitativos da formação de biofilmes e adesão bacteriana sobre os ormosils de interesse foram realizadas medidas de crescimento bacteriano sobre os filmes por duas metodologias distintas: a) contagem de placas e b) método colorimétrico utilizando cristal violeta.

6.4.1. Método de contagem por placas

Este método conta todas as bactérias sobre a superfície sem distinção sobre sua integridade ou atividade celular, portanto, conta depósitos de bactérias vivas ou mortas. As contagens de colônias bacterianas foram realizadas em sextuplicatas e os dados com o respectivo desvio padrão encontram-se na Tabela 8.

De acordo com a tabela 8, o filme SPN (sem titânia) apresentou uma maior média de UFC/mL. Já quando analisamos os filmes contendo titânia, houve um decréscimo linear na contagem de UFC/mL da bactéria *E.coli*, conforme aumentamos linearmente a quantidade de titânia adicionada nos filmes ormosils.

Como já discutido no item 6.3.3 (MEV) pode existir uma quantidade de NP de TiO_2 que satura o efeito inibidor da formação de biofilmes de *E.Coli* ou ainda este grande crescimento de bactérias pode ser atribuído a rugosidade como foi discutido na seção 6.3.1 (AFM). Estes resultados estão de acordo como reportado na literatura e já citados neste trabalho.

Tabela 8-. Contagem de colônias bacterianas dos filmes ormosils, realizado em sextuplicata.

	UFC/mL	mLxDil	Log UFC	Viabilidade	DesvPad
SNP	1553,33	1553333,3	6,19	100,00	2,22
A2	1113,33	1113333,3	6,05	71,67	1,9
A6	260,00	260000,0	5,41	16,74	1,44
A7	83,33	83333,3	4,92	5,36	1,56
A8	50,00	50000,0	4,70	3,22	2,78

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 8 traz informações das quantidades de unidades formadoras de colônias (UFC) e viabilidade de crescimento bacteriano. Podemos observar nos dados descritos que, a maior viabilidade de células é no filme SNP seguido do filme A2 e a menor viabilidade é no filme A8. Este resultado entra em acordo com as micrografias apresentadas na seção 6.3.3. indicando que no ormosil A8 houve um menor crescimento bacteriano. Podemos atribuir a maior quantidade de titânia adicionada no filme, a titânia exerce um papel fundamental para o impedimento do desenvolvimento da bactéria.

Uma consideração importante a ser feita é que a amostra *SNP* foi escolhida como controle, pois esta possui a mesma composição das demais amostras com exceção da titânia. Os cálculos de viabilidade descritos na Tabela 8 leva em conta esta consideração.

6.4.2. Método colorimétrico para contagem de células

O método colorimétrico permite avaliar as células aderentes usando o corante cristal violeta. Durante o processo pode haver perda de células aderidas, como no processo de lavagem, a desvantagem deste método é que ele não permite quantificação do número de células em uma referência de curva padrão, mas é extremamente útil para verificação de células aderidas ao substrato.¹⁰⁴

O cristal violeta cora todo o substrato contendo a amostra, não somente as células, mas essencialmente qualquer material aderido à superfície da placa (por

exemplo, componentes da matriz celular), e, por conseguinte, a coloração com cristal violeta pode estimar o número de bactérias totais no substrato.

A Tabela 9 mostra os dados obtidos pelo método do cristal violeta, os experimentos foram realizados em sextuplicatas.

Podemos observar, Tabela 9, que com o aumento da concentração de NP de titânia os valores de absorbância foram diminuindo, indicando que o filme A8 (2000 μ L TiO₂) possui uma quantidade menor de bactérias aderidas sobre o filme, pois apresenta o menor valor de contagem total (CT) 38,24%, ou seja o poder inibitório do crescimento bacteriano é maior.

Tabela 9 - Contagem de células viáveis pelo método do cristal violeta, leituras da absorbância feitas na DO 560 nm.

Am/ Nº Colônias	Média	DesvPad	Contagem total (CT)
Sem NP (branco)	2,72	0,17	100
A2	2,56	0,13	90,16
A6	2,12	0,02	74,54
A7	1,80	0,08	63,33
A8	1,09	0,00	38,24

Fonte: Autoria própria.

No método de contagem por placas, item anterior 6.4.1. avalia se as bactérias aderidas, uma vez desorvidas podem se proliferar, enquanto, no método colorimétrico avaliamos quantas bactérias estão adsorvidas – vivas ou mortas. Portanto, os dados combinados dos dois métodos nos indicam que o filme A8, após a formação do biofilme, consegue impedir a sobrevivência das bactérias sobre o ormosil. Desta forma os resultados obtidos por MEV seguem esta mesma explicação, sugerimos que a presença de fosfotungstato aliado a presença de titânia favorecem a menor taxa de adesão para o filme com maior concentração de titânia.

6.5. Atividade bactericida potencializada pela irradiação com U.V

A potencialização da atividade bactericida dos filmes foi investigado pela queda no número de bactérias sobreviventes após irradiação com radiação UV, alguns trabalhos relatam esta mesma avaliação como é o caso de Sunada et al¹⁰⁵.

A atividade bactericida ocorre quando o material que possui tal atividade inativa a célula, devido a isto é possível estimar o número de células vivas ou mortas que ainda encontram se na superfície do ormosil. Utilizamos o teste colorimétrico com cristal violeta já descrito no item 5.8 e item 5.5.

A Tabela 10 mostra a média de absorbância para as amostras de filmes ormosils, podemos observar que após irradiação UV o ormosil A8 apresentou uma menor absorbância o que nos diz que poucas bacterias estão aderidas sobre a superfície do filme, o que era de se esperar pela maior quantidade de titânia adicionada.

A figura 33 mostra o gráfico da % de contagem total (CT) de bactérias versus a absorbância para os filmes ormosils contendo biofilme. Observa se um decaimento da contagem total de bactérias quanto maior a concentração de partículas de titânia.

Tabela 10 - Amostras irradiadas leitura de absorbância em 560 nm.

Am/ Nº Colônias	Média	DesvPad	Contagem total (CT)
Vidro	0	0	0
Sem NP (branco)	1,73	0,08	60,74
A2	1,04	0,08	32,62
A6	1,15	0,07	40,49
A7	0,83	0,11	29,05
A8	0,09	0,01	2,99

Fonte: Autoria própria.

Figura 33. Gráfico contendo em (a) % da contagem total de bactérias dos filmes ormosils versus a absorbância encontrada no método colorimétrico.

Fonte: Autoria própria

Figura 34. Gráfico relacionando o índice de sobrevivência versus a % de átomos de W obtido pela técnica de EDRX

Fonte: Autoria própria.

Tabela 11 mostra os valores das amostras de filmes ormosils contendo biofilme da bactéria *E.coli*, a leitura de densidade óptica (OD) foi feita em 560 nm. Observou-se que a atividade bactericida do ormosil A8 foi mais eficiente, restando apenas 2.99% de bactérias totais (vivas ou mortas).

Podemos observar que o índice de sobrevivência da bactéria *E.coli*, Figura X, aumenta quanto tem se pouca quantidade de átomos de W na superfície do ormosil. Como já foi discutido na seção 6.1 no que justifica ao aumento de W na superfície do ormosil. Podemos atribuir também que, a inibição do biofilme formado pela bactéria pode estar ligada com a maior quantidade de átomos de W na superfície do substrato.

A figura 35 mostra uma ilustração esquemática do mecanismo de fotocatalise do TiO_2 e fosfotungstato nos filmes ormosils contendo titânia. Estes filmes quando submetidos a radiação UV geram um par elétron-buraco. O buraco tem potencial suficientemente positivo para gerar radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), a partir de íons hidroxila e/ou moléculas de água adsorvidas na superfície do material, estes podem destruir a membrana plasmática da célula como é mostrado na imagem. Devido a isto o ormosil A8, pela maior quantidade de tiania, possui um maior poder fotocatalítico quando comparado aos outros filmes.

Figura 35. Ilustração esquemática do processo bactericida em um filme contendo bactéria *E.coli* sobre o ormosil contendo fosfotungstato e TiO_2 . (a) ilustração da célula de *E.coli* (b)- (c) ilustração da atividade do radical hidroxila e o rompimento da membrana plasmática.

Fonte: Adaptação de Souza (2014) a partir de SUNADA, K., 2003, p.03.

6.6. Análises de superfície

6.6.1. Espectroscopia de fotoelétrons de raios X

A figura 36 apresenta o espectro completo de XPS, contendo todos os elementos analisados como C, Si, O, P, W e N presentes nos filmes ormosils. Não observamos os picos fotoelétricos do Ti nos espectros dos ormosils, o que indica que não há titânia na superfície das amostras ou a concentração está abaixo do limite de detecção do XPS.

Figura 36. Espectro completo da análise de XPS para o filme ormosil, com os principais elementos analisados, como N, C, O, Si e W.

Fonte: Autoria própria.

A figura 37, mostra o espectro de XPS para o elemento N 1s para os filmes ormosils SNP, A2, A8 e A8 gel (amostra xerogel).

Figura 37. Espectro de XPS na região do N 1s para os filmes sobre vidro SNP, A2 e A8 e para o xerogel A8 gel, compreendendo 419-390eV.

Fonte: Autoria própria.

Segundo mostra a Figura 38, podemos observar que todas amostras trazem um singleto assimétrico. Para os filmes sem NP e A2, o ajuste foi realizado com apenas um único pico. Já para o filme A8 e para o xerogel A8 gel, temos a presença de duas componentes na região de N1s. Como descrito na Tabela 12

Os espectros trazem um singleto assimétrico ajustado, para os filmes ormosils sem NP e A2, com apenas uma componente e para os filmes A8 e A8 gel apresentam um singleto com duas componentes, o valor da energia de ligação para cada amostra analisada esta descrita na Tabela 12.

Figura 38 - Espectro de XPS para o elemento N1s com uma componente para os ormosils: (a) SNP e (b) A2.

(a)

(b)

Fonte: Autoria própria

Figura 39 - Espectro de XPS para o elemento N1s com duas componentes para os ormosils: (a) A8 e (b) A8 gel (xerogel).

(a)

(b)

Fonte: Autoria própria.

A tabela 11 mostra os valores da energia de ligação para os diferentes ormosils analisados. Para os filmes SNP e A2 temos apenas um singlete correspondente a N1s em 400,1 e 399,9, respectivamente. Este pico é derivado do grupo funcional nitrila (-CN) proveniente do BUTS adicionado nos filmes ormosils. Na amostra A2 há uma sugestão de segunda componente. Mas devido ao ruído não foi possível situá-lo e quantificá-lo com qualquer rigor.

Já para o filme A8 e para o xerogel A8 gel temos claramente um singlete com duas componentes. A protonação da nitrila poderia afetar a energia de ligação assim como a coordenação de ácido de Lewis. Sugerimos a coordenação de grupos nitrila com BF_3 formando um ligação B-N resultando em um deslocamento para maiores energias de ligação, como também mostra Ferreira-Neto¹⁰⁶.

Tabela 11- Energias de ligação em eV ($\pm 0,2$ eV) para para o elemento N nos filmes ormosils analisados.

	Sem NP	A2	A8	A8 gel
N1s1	400,1	399,9	400,1	400,1
N1s2			402,3	402,0

Fonte: Autoria própria.

Figura 40. Espectro de XPS para o elemento W nos filmes ormosils analisados: SNP (36), A2, A8 e A8 gel (xerogel)

Fonte: Autoria própria.

A Figura 40 mostra o espectro XPS na região do pico fotoelétrico $W4f$ e nível $5p$ e para os filmes ormosils SNP (36): A2, A6, A8 e para o xerogel denominado, A8 gel.

Podemos observar mais detalhadamente cada espectro das amostras na Figura 41. Há o aparecimento do duplete $W4f_{7/2}$ e $W4f_{5/2}$ e picos do $W5p$ em maior energia de ligação confirmando a presença de HPW na superfície do ormosil¹⁰⁶. A Tabela 12 mostra todos os valores de energia de ligação para os dupletos $W4f$ e $W5p$.

Figura 41. Espectro de XPS para o elemento W nos filmes ormosils SNP, A2, A8 e no xerogel (A8 gel).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 12 - Valores da energia de ligação para W 4f e 5p das amostras analisadas de filmes ormosils SNP, A2, A8 e A8 gel (xerogel).

	SNP	A2	A8	A8 gel
W 4f $_{7/2}$	35,3	35,3	35,3	35,3
W 4f $_{5/2}$	37,6	37,5	37,6	37,6
W 4f $_{7/2}$	36,8	36,8	36,8	36,8
W 4f $_{5/2}$	38,9	38,9	38,9	38,9
W 5p	40,2	40,5	40,1	40,2
W 5p	42,1	42,1	41,7	42,1

Fonte: Autoria Própria

Ao comparar se as porcentagens de N nas amostras obtidas por XPS verificamos que o gel A8 tem uma concentração bem superior àquelas dos filmes de ormosils, Tabela 13. As duas amostras A8 e A8 gel (xerogel) foram preparadas usando a mesma quantidade de precursores, TiO_2 e HPW; portanto, seria esperado que tanto o filme quanto o gel apresentassem a mesma porcentagem. A diferença observada entre as duas amostras deve estar relacionada com o processo de fabricação dos filmes. No processo de formação de filme por *dip-coating* ocorre transferência de massa da interface sol-ar para a interface do vidro com o ar¹⁰⁷. Tendo em vista a baixa porcentagem de N apresentada pelos filmes de ormosils comparado ao gel A8 deve ocorrer uma depleção de silanos nitrogenados para o interior do sol. Este fenômeno não ocorre na amostra gel, pois neste caso todo volume do sol passa para fase gel e finalmente para o xerogel após a evaporação do solvente.

Quando analisada a porcentagem atômica de átomos de W, Tabela 13 podemos evidenciar uma tendência de aumento da concentração de W na superfície com o aumento da concentração de nanopartículas adicionadas. Isto indica que as nanopartículas estão nos ormosils e estão ajudando a transferir o fosfotungstato da interface sol-ar para o vidro no processo de formação dos filmes. Idêntica conclusão pode ser obtida olhando-se a razão N/Si na Tabela 14.

Conforme a concentração de NP de titânia nos filmes aumenta, aumenta a concentração de átomos de W, comprovando realmente que uma maior quantidade de HPW está presente na superfície do ormosil. Comparando a mesma amostra A8 em filme e em gel, podemos observar que no gel esta porcentagem atômica é ainda maior. Observando as porcentagens atômicas para o átomo de P aumenta, grosso modo, como o W.

Tabela 13 – Porcentagens atômicas dos elementos analisados por XPS.

	Sem NP	A2	A8	A8-gel
C	48	51	42	51
N	0,92	0,64	0,96	4,4
O	41	38	45	34
Si	9,9	8,5	9,4	6,7
W	0,79	1,1	2,1	3,5
P	0,18	0,18	0,41	0,65

Fonte: Autoria própria.

As porcentagens atômicas de W mostradas na Tabela 13 têm um aumento crescente conforme o aumento de NP de titania nos filmes ormosils, pois a essa encontra-se em suspensão aquosa. Com isto, a quantidade de água no xerogel é muito maior do que no filme, a água atua nas reações de hidrólise durante o processo sol gel, fazendo com que a rede do ormosil aumente, aumentando também sua espessura e a quantidade de átomos de W por toda a superfície. Já a razão N/W diminui, Tabela 14, em virtude deste comportamento.

A razão N/C obtida pelas razões atômicas dos elementos foram similares para todas as amostras considerando que todas as amostras em filme possuem o mesmo composto BUTS, como mostra a Tabela 14, mas a razão foi muito maior para o xerogel. Analisando as razões N/Si e N/C para o ormosil A8 gel, elas são maiores do que nos filmes; isso é devido à sua maior concentração atômica na superfície; na forma de xerogel, o N parece ficar mais concentrado à superfície do material.

Tabela 14 - Razões atômicas para os elementos analisados por XPS para os filmes ormosils sem NP., A2, A8 e para o xerogel da amostra A8gel.

	SNP	A2	A8	A8 gel
N/C	0,019	0,012	0,023	0,086
N/Si	0,093	0,075	0,102	0,655
N/W	1,164	0,573	0,451	1,264
W/Si	0,080	0,131	0,225	0,518
W/P	4,474	6,030	5,124	5,292
W/C	0,017	0,022	0,050	0,068

Fonte: Autoria Própria.

A análise de XPS também foi realizada para os filmes ormosils contendo fosfolipídeo (DMPC), designadas como SNP+fosfo, A8+fosfo e somente DMPC, filmes sobre vidro, como mostra a figura 42 no espectro completo.

Figura 42. Espectro de de fotoemissão do N 1s para os filmes: fosfolipídeo sobre vidro (fosfo), A8/fosfolipídeo sobre vidro (A8+fosfo) e sem NP/fosfolipídeo sobre vidro (sem NP+fosfo).

Fonte: Autoria própria

Tabela 15 - Valores de energia de ligação na região do pico fotoelétrico do N1s obtidos por XPs para os filmes: a) Fosfolipídeo sobre vidro, b) A8+fosfo e c) sem NP+fosfo.

	Fosfoli	A8 + fosfo	SNP+fosfo
N 1s	402,6	402.6	402.7

Fonte: Autoria própria.

A energia de ligação do N 1s mostra que todos os nitrogênios são quaternários como era de esperar num fosfolipídeo, Tabela 15. Logo têm uma carga positiva que desloca a energia de ligação de cerca de 2,5 eV. Isto significa que, praticamente não vemos o filme ormosil onde foi encontrada uma larga maioria de nitrogênios sem carga (correspondentes ao grupo nitrila não protonado nem envolvido em pontes de hidrogênio).

Quando analisamos as porcentagens atômicas dos elementos, Tabela 16, podemos observar que a quantidade de átomos de Si para o filme SNP+fosfolipídeo também é menor o que nos ajuda confirmar que o melhor recobrimento de fosfolipídeo se dá com esta amostra sem NP.

A porcentagem atômica de átomos de W também é reduzida para o filme SNP+fosfolipídeo, indicando melhor recobrimento com fosfolipídeo para esta amostra e sugerindo que o fosfotungstato fica na fração ormosil do filme, portanto, não difunde para o lipídeo. Quando comparamos as quantidades de átomos de fósforo, a amostra que demonstra estar bem recoberta por fosfolipídeos é também a SNP + fosfolipídeo pela maior porcentagem de fósforo na superfície.

Tabela 16 - Porcentagem atômicas dos elementos analisados por XPS para fosfolipídeo, A8+fosfo e SNP+fosfo.

	Fosfoli	A8 + fosfo	SNP+fosfo
C	76,03	75,76	77,41
N	1,39	1,76	2,17
O	18,19	18,32	16,73
Si	2,44	1,87	1,32
W	0,00	0,31	0,07
P	1,96	1,98	2,30

Fonte: Autoria própria.

A Figura 43 mostra o espectro de XPS para o filme ormosil SNP+fosfolipídeo e A8+fosfolipídeo para a região de W4f. Para melhor comparação podemos observar os valores de energia de ligação para estes mesmos filmes na Tabela 17. Para ambos os filmes há dois dubletos de W4f $7/2$ e W4f $5/2$. E somente para o ormosil A8+fosfolipídeo podemos observar o pico de fotoemissão do W5p, pois, esta amostra possui maior concentração de fosfotungstato superficial como já discutido anteriormente. Como a quantidade de W é menor para o filme SNP+fosfo, isto indica que o fosfolipídeo possui uma melhor cobertura para esta amostra.

Tabela 17. Energias de ligação para os filmes A8 e SNP contendo fosfolipídeo.

	A8 + fosfo	SNP+fosfo
W 4f7/2 1	34,4	35,7
W 4f5/2 1	36,3	36,3
W 4f7/2 2	35,8	37,5
W 4f5/2 2	37,9	38,5
W5p	34,4	0,0

Fonte: Autoria própria.

Figura 43. Espectro de XPS para região de W4f para os filmes SNP e A8 contendo fosfolipídeo.

Fonte: Autoria própria.

6.6.2. Ângulo de contato e energia superficial

Primeiramente foi realizado a medida para determinação da energia superficial e então procedeu-se os cálculos para obter as diversas componentes da energia superficial.

Os valores medidos de ângulo de contato utilizando solventes polares (formamida e água) e solventes apolares (diodometano e α -Bromonaftaleno) para os filmes ormosils encontram-se na Tabela 18.

A medida de ângulo de contato fornece a informação da superfície do material no que diz respeito à sua hidrofobicidade ou hidrofiliidade. Quanto maior for o valor do ângulo de contato maior o caráter hidrofóbico da superfície do sólido, válido para qualquer solvente utilizado.

Os dados da Tabela 18 mostram uma faixa de estabilidade do ângulo de contato perante os diferentes líquidos utilizados, indicam que a superfície possui uma grande afinidade com os solventes polares (água e formamida) apresentando os valores na faixa de 48-50°, o que pode informar que as superfícies apresentam maior caráter hidrofílico. A maior afinidade frente aos solventes polares é a do filme A8.

Os valores de ângulo de contato para os líquidos apolares (α -Bromonaftaleno e diodometano) situaram-se na faixa de 24-36°, indicando que a superfície apresenta realmente um caráter hidrofílico pelo ângulo de contato resultar em um valor menor que 90°.

Tabela 18 - Valores para o ângulo de contato (θ) utilizando solvente polares e apolares, Os valores apresentados são médias de sextuplicatas realizadas.

	Sem NP	A2	A6	A7	A8
Água	49	51	48	51	51
Formamida	49	51	49	51	51
α-Bromo naftaleno	36	33	24	31	32
Diodometano	32	33	37	33	32

Fonte: Autoria própria.

Pela equação 8 calculamos os valores de γ_s^d (componente dispersiva polar) e então utilizamos a equação 7 para calcular as componentes ácidas e básicas e, na sequência, calcula-se a energia de superfície. Este cálculo é realizado para cada medida de ângulo de contato. Após o cálculo das componentes procedemos aos cálculos dos valores médios.

Os dados da energia de superfície para os filmes ormosils contendo titânia estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Valores de energia superficial calculados para os ormosils e suas componentes ácida e básica, unidade em mJ/m^2 .

	γ_s^d	γ_{s+}	γ_{s-}	Γ
Sem NP	39	20	7,3	66,42
A2	40,1	3,2	5,5	48,74
A6	40,6	8,3	10	58,51
A7	39,5	0,0	5,9	45,37
A8	40,3	9,8	7,4	57,51

Fonte: Autoria própria.

Como podemos observar na Tabela 19, os valores da energia superficial para os filmes permaneceu na faixa de 45-66 mJ/m^2 . Estes valores de energia de superfície indicam que as superfícies de todas as amostras possuem as mesmas características, alto caráter hidrofílico. Quando observamos os valores da componente básica γ_{s-} para os filmes, observamos um valor de 7,4 para o ormosil A8, como temos em todas as composições de filmes o composto Butironitrila (BUTS), podemos sugerir que a basicidade de Lewis seja devido à presença de grupos nitrila na superfície deste ormosil.

Este resultado nos informa que as amostras de filmes ormosils não apresentam grandes diferenças quanto a energia superficial, não sendo então um fator decisivo na formação do filme em bactérias.

6.7. Fotogração

6.7.1. Atividade Fotocatalítica: Avaliação pela Fotodegração de sobrecamadas de cristal violeta (CV)

Antes de testarmos a atividade foto-biocida dos filmes, verificamos se os filmes podem se comportar como fotocatalisadores. Para tanto, foram gotejados 30 μL de cristal violeta 0,1% (solução aquosa) sobre os filme ormosils contendo titânia. Os filmes foram irradiados durante 10 minutos (600 s) e então as leituras de absorbância foram feitas em um espectrofotômetro.

- ✓ Média de dose de UVB foi 212,31 MED/min, que corresponde a 63 mW/cm^2
- ✓ Média de UVA foi de 566,20 MED/min, que corresponde a 102 mJ/cm^2

Os filmes de ormosils apresentaram uma boa resposta fotocatalítica como mostram as medidas de fotodegradação do corante cristal violeta (CV) depositado sobre os filmes ormosils. A figura 44 mostra a banda de absorção para o filme ormosil A8. A fotólise direta do CV depositado sobre o substrato de vidro também é mostrada na Tabela 21 para comparação. A diminuição da banda de absorção do CV ocorre após 10 minutos de irradiação com UV. A Figura 45 prova que a atividade fotocatalítica do ormosil A8 é significativamente mais efetiva que a fotólise direta (degradação do corante CV depositado sobre o vidro).

Figura 44. Espectro eletrônico de absorção para o CV (cristal violeta) depositado sobre o filme ormosil A8, antes e após irradiação com luz U.V durante 10 min.

Fonte: Autoria própria

Tabela 20. Valores médios de porcentagem de degradação para os filmes ormosils com cristal violeta.

V	Sem NP	A2	A6	A7	A8
10,5	17,50	24,75	36,94	43,23	31,39

Fonte: Autoria própria.

Figura 45. Comparação da porcentagem de fotodegradação do cristal violeta na fotólise direta (vidro) e sobre os filmes ormosils.

Fonte: Autoria própria.

Em estudos realizados em nosso grupo por Ferreira Neto¹⁰⁶ mostra-se que a atividade fotocatalítica dos filmes ormosils está inversamente correlacionada à atividade fotocromica nestes ormosils. Assim, esperaríamos que o ormosil A8 com melhor resposta fotocromica apresentasse a menor atividade fotocatalítica; de fato, isto acontece. O aumento da concentração de NPs de titânia mostrado na seção de XRF favorece a interação fosfotungstato-NPs e permite que após irradiação UV, elétrons da banda de condução da titânia passem para o HPW formando heteropoliazuis. A formação destes heteropoliazuis pode levar à formação de íons superóxido e peróxido de hidrogênio pela reação dos heteropoliazuis com o O₂ molecular. Em tese, isto deveria ampliar a atividade fotocatalítica não só pelo aumento de espécies com alto potencial de redução e portanto oxidantes potentes, mas também porque o processo de recombinação elétron-buraco na titânia é inibido. No entanto, isto parece ser válido até a

concentração de 522 ppm de Np de titânia. A partir desta concentração, parece ocorrer um processo inibitório cuja origem ainda é desconhecida.

6.7.2. Fotodegradação do fosfolípídeo DMPC

A figura 46 mostra os espectros de infravermelho para as amostras preparadas sobre wafer de silício contendo filme ormosil A8 + fosfolípídeo DMPC. Estas amostras foram submetidas à radiação UV, procedimento descrito no item 5.10.

Figura 46. Espectro de infravermelho em modo transmissão para amostra sobre wafer de silício contendo ormosil A8 e fosfolípídeo em diferentes tempo de exposição a irradiação. Região analisada de 4000-500 cm^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

Nota se que todas as curvas, correspondentes a amostras irradiadas com diferentes tempos, estão praticamente superpostas; as bandas não apresentaram

nenhum deslocamento significativo, não houve a formação de nova banda e nem o desaparecimento de qualquer outra banda presente no espectro vibracional.

Ampliando-se a região do espectro situada entre $3500\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$, as bandas na região de 2919 cm^{-1} e 2845 cm^{-1} , correspondentes a deformação axial assimétrica de CH_2 e CH_3 não apresentaram alteração significativa, como mostra a Figura 47.

Figura 47. Espectro de infravermelho em modo transmissão para amostra sobre wafer de silício contendo ormosil A8 e fosfolipídeo para diferentes tempos de exposição a irradiação, compreendendo a região ampliada de $3500\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria.

Na figura 48 observamos a região ampliada que compreende $1600\text{-}550\text{ cm}^{-1}$, estas bandas são referentes ao acoplamento assimétrico dos modos $\nu_{\text{ass}}\text{P-O}$ e $\nu_{\text{as}}\text{W-O}_t + \nu_{\text{ass}}(\text{W-O}_{2c2}\text{-W})$, presentes no ormosil e também no fosfolipídeo,

bandas que não apresentaram mudança no espectro. São bandas definidas e sobrepostas.

Figura 48. Espectro de infravermelho em modo transmissão para amostra sobre wafer de silício contendo ormosil A8 e fosfolipídeo para diferentes tempos de exposição a irradiação, compreendendo a região ampliada de $1600\text{-}500\text{cm}^{-1}$.

Fonte: Autoria própria.

Preparou-se também amostras contendo apenas fosfolipídeo sobre wafer de silício, submetemos a mesma a um ciclo de exposição a radiação com variação de tempo. A figura 49 mostra os espectros obtidos frente às irradiações. Podemos sugerir que o fosfolipídeo sozinho também apresenta uma boa estabilidade frente a estes ciclos de irradiação.

Figura 49. Espectro de infravermelho em modo transmissão para wafer de silício contendo fosfolípídeo DMPC irradiada com vários tempos, compreendendo a região 4000-500 cm^{-1} .

Fonte: Autoria própria.

Foram realizadas modificações nas composições dos filmes ormosils na tentativa de fotodegradar o fosfolípídeo. A Tabela 21 mostra as modificações.

Tabela 21. Composições diversas para o ormosil A8.

Composição	A8	A8.1	A8.2
TEOS	1773	1773	1773
BUTS	347	347	347
HPW	2246	5492	2246
GLYMO	1604	1604	1604
H ₂ O	824	824	824
NP TiO ₂	31,58	31,58	100

Fonte: Autoria própria.

6.7.2.1. Fotodegradação do fosfolipídeo com amostras de filmes ormosils com outras formulações

. Em nenhuma destas diferentes composições do filme ormosil A8 foram obtidos espectros diferentes ou com pequenas mudanças dos apresentados no item 6.7.2. Estes resultados sugerem que o fosfolipídeo, o qual simula a membrana celular, possui uma grande resistência frente a uma série de radiações UV quando estão suportados sobre os filmes ormosils que possuem atividade fotocatalítica.

6.8. Dessorção do fosfotungstato

Os espectros obtidos não mostram qualquer banda no U.V que possa ser atribuída ao fosfotungstato ou produtos de hidrólise do mesmo. Portanto, a dessorção de fosfotungstato dos ormosils para a solução de meio de cultura foi descartada como hipótese de atividade inibidora da formação de biofilme.

7. Conclusões

A adição de um componente na formulação dos ormosils afeta a morfologia da superfície e induz enriquecimento em HPW nos filmes o que está ligado ao processo de obtenção dos filmes. Esta mudança tem pouco impacto sobre a energia superficial dos mesmos.

Muito embora uma maior eficiência na inibição da recombinação elétron-buraco ocorra, como evidenciado pelo aumento do fotocromismo, outros fenômenos ainda não bem caracterizados induzem uma queda na atividade fotocatalítica para degradação de cristal violeta para altas concentrações de titânia adicionadas.

Os filmes ormosils, embora, possuam atividade fotocatalítica frente ao cristal violeta são ineficientes na tentativa de fotodegradar um componente da membrana celular: o fosfolipídeo DMPC.

O filme contendo a maior concentração em ppm de NP de titânia apresentou a melhor resposta inibitória quando crescemos biofilme sobre os mesmos. O que era de se esperar pelo aumento do poder inibitório da titânia.

Entretanto, a maior atividade inibitória da formação de biofilme não pode ser explicada em termos de energia superficial ou concentração superficial de Ti como demonstrado por XPS. Da mesma forma, esta atividade bactericida não está relacionada à dessorção do fosfotungstato. Estudos posteriores são necessários para identificar a boa atividade inibitória da formação de biofilme bacteriano sobre estes filmes híbridos.

Portanto, sugerimos que os material de filmes ormosils podem ser utilizados em granjas e em tubos de ar condicionado para impedir o crescimento e acúmulo de microorganismos.

APÊNDICE A

Figura A1. Espectro na região do infravermelho médio para o ormosil A8 contendo fosfolípido DMPC, formulação 8.1 de acordo com a Tabela 22.

Fonte: Autoria própria.

5.9.1. Cálculos para determinar o limite de detecção de XPS

Razão sinal/ruído = 2

Ruído: ~50/canal

Área do pico de Ti 2p_{3/2} ≥ 100 (para ser detectado)

Área do pico de C 1s ~7000

FS (Ti 2p_{3/2}) = 1,2

FS (C 1s) = 0,25

Para uma razão atômica Ti/C=1, para uma aquisição Área Ti = 33600

Para uma razão atômica Ti/C=1, para 100 aquisições Área Ti = 3360000

Como uma área (para um FWHM~1 eV)

Então Ti/C seria = $100/3360000 \sim 3,0 \times 10^{-5}$.

8. Referências Bibliográficas

¹CASE, C.L.; FUNKE, B.R.; TOTORA, G.J.; Microbiologia. – Ed. Artmed. P.894, - 10ª Ed, 2012.

² HUGHES, J.M., PETERS, C.J., *et al*, **Hantavirus pulmonary syndrome: an emerging infectious disease**. *Science*, v. 262, p. 850-851, 1993.

³ MESELSON, M., GUILLEMIN, J., *et al*, **The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979**, *Science*, v. 266, 1202-1208, 1994.

⁴CHO, IH, KIM, JP, LEE, HS, KIM, IT, YANG, YY; Nano inorganic antiviral agent showing antiviral effect against severe acute respiratory syndrome (SARS) corona virus and influenza virus comprising nano sized silver particle solution and titanium dioxide, KR 2006079388-A (30 de dezembro de 2004).

⁵ SANEZAKI, S., SKANEHIRA, Y., KANEHIRA, K, OGAMI, Y, BANZAI, T, KAMESHIMA, J., WO 2007034586-A1 (29 de março de 2007).

⁶MORAES, S.G., DONAIRE, P.P., DURAN, N., **Heterogeneous Photocatalysis and Its Applications**. In Catalysis and Photochemistry in Heterogeneous Media, 2007, 115-139. Editor Iseli L. Nantes e Sergio Brochsztain. Research Signpost, Kerala, Índia.

⁷ Li, Y., Leung, P., Yao, L., Song, Q.W., Newton, E., *J. Hosp. Disease*, v. 62, p. 58-63, 2006.

⁸RAMAHAM, M.N. Sol-gel processing. In: **Ceramic Processing and Sintering**. 2ª edição. Boca Raton, E.U.A: Taylo& Francis., 2003. cap. 5, p. 316-318.

⁹ BRINKER, C. Jeffrey.; SCHERER, G.W..**Sol-gel Science: the physics and chemistry of sol-gel processing**. Boston, Academic Press Limited. 891p. 1993.

¹⁰ HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. **Processo sol-gel uma visão físico-química**. Química Nova, v.18, n. 2, p.171,1995.

¹¹ SOLOMONS, G. T. W. **Química orgânica**. 6.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996. p.294.

¹² FERREIRA, G.; **Aplicação de sílica organicamente modificada em sistema de extração em fase sólida de íons Cu(II), Cd(II) e Pb(II) em meio aquoso, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**, Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia – UNESP – Campus de Ilha Solteira, Mestrado em Ciência dos Materiais. Ilha Solteira – SP, 2009.

¹³ PLUEDDMANN, E.P. **Silane coupling agents**. New York: Plenum Press, 1982. v.1. p.29-45.

¹⁴ TRIPATHI, V.S.; KANDIMALLA, V.B.; JU, H. **Preparation of ormosil and its applications in the immobilizing biomolecules**. Sensors and Actuators, B 114 (2006) 1071–1082.

¹⁵ LIVAGE, J.; SANCHEZ, C.; BABONNEAU, F. ; Molecular Precursor Route to Inorganic Solids. In **Chemistry of Advanced Materials**, New York: Wiley-VCH Inc, 1998, cap. 9, p 389-445

¹⁶ JOSÉ, N.M.; PRADO, L.A.S.A.. **Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações**. Quim. Nova, Vol. 28, No. 2, 281-288, 2005.

¹⁷ SAEGUSA, T.; *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, 1965.

¹⁸ SCHUBERT, S.; HUSING, N.; LORENZ, A.; *Chem. Mater.* **1995**, 7, 2010.

¹⁹ PAIVA NETO, E.; **Preparação, Caracterização e Comportamento Fotocrômico de filmes híbridos de Ormosil-Fosfotungstato dopados com nanopartículas de ZnO. 63f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Química)- Instituto de Química de São Carlos –Universidade de São Paulo.2011.**

²⁰POPE, M.T. **Heteropoly and IsopolyOxometalates**. Berlin: Springer-Verlag, 1983, 180 p.

²¹JEANNIN, Y. **The Nomenclature of Polyoxometalates: How To Connect a Name and a Structure**, Chemical Reviews, v. 98 , n. 1, p. 51-76, 1998.

²²POPE, M.T.; MULLER, A. **Polyoxometalate Chemistry: An Old Field with New Dimensions in Several Disciplines**.AngewandteChemie International Edition in Englishv. 30, n. 1, p. 34-48, 1991.

²³ YAMASE, T.; **Photo- and Electrochromism of Polyoxometalates and Related Materials**.Chem. Rev. 1998, 98, 307-325.

²⁴ LOPEZ, X.; BO, c.; POBLET, J.M.; **Electronic Properties of Polyoxometalates: Electron and Proton Affinity of Mixed-Addenda Keggin and Wells-Dawson Anions**. J. Am. Chem. Soc. 9 VOL. 124, No. 42, 2002.

²⁵ BROWN, G. M. et al. **Dodecatungstophosphoric acid hexahydrate, (H₅O₂⁺)₃(PW₁₂O₄₀³⁻) - true structure of Kegginpentahydrate from single-crystal X-Ray and Neutron-Diffraction Data**. Acta Crystallographica Section B-Structural Science, v. 33, n.1, p.1038-1046.1977.

²⁶OLIVEIRA JÚNIOR, Marcos. Estudos de complexos fotocrômicos de xerogéis de ormosil através de ressonância magnética nuclear em estado sólido. 2009. 116 f. Dissertação

(Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

²⁷ KATSOULIS, D. E. **A survey of applications of polyoxometalates**, Chem. Rev., v.98, p.359-387. 1998.

²⁸ KEGGIN, J. F. **The structure and formula of 12-phosphotungstic acid**. Proceedings Royal Society London. A, v. 144, p. 75-100, 1934.

²⁹ GUO, Y. R., Q. J. PAN, *et al.* **Abinitio studies on Keggin structure polyoxometalate α -[SiW₁₂O₄₀](⁴⁻)**. Chem. J. Chinese Univ.-Chinese, v.24, p.1862-1864. 2003.

³⁰ FRIESEN, D. A., L. MORELLO, *et al.* **Factors influencing relative efficiency in photo-oxidations of organic molecules by Cs₃PW₁₂O₄₀ and TiO₂ colloidal photocatalysts**, J. Photochem. Photob. A, v. 133, p.213-220. 2000.

³¹ FARHADI, S., Z. BABAZADEH, *et al.* **Sol-gel silica-supported 12-tungstosilicic acid (H₄SiW₁₂O₄₀/SiO₂) as a heterogeneous photocatalyst for efficient and selective oxidation of benzylic alcohols with O₂ under photoirradiation**, Acta Slovenica, v.53, p.72-76.2006.

³² LI, D. F., Y. H. GUO, *et al.* **Photocatalytic degradation of aqueous formic acid over the silica composite films based on lacunary Keggin-type polyoxometalates**, Appl.Catal.A, v.235, p.11-20.2002.

³³ NIE, X.; ZHUO, S.; MAENG, G.; SOHLBERG, K. **Doping of TiO₂ polymorphs for altered optical and photocatalytic properties**. International Journal of Photoenergy. v.2009,

³⁴FELTRIN, J.; SARTOR, M.N., et al.; Photocatalytic surfaces of titania on ceramic substrates. *Cerâmica*, v.59, p.630-632, 2013.

³⁵BABEL, Sandhya; KURNIAWAN, TonniAgustiono. **Low-Cost Adsorbents for Heavy Metals Uptake From Contaminated Water: A Review**. *Journal of Hazardous Materials*, v. 97 n. (1-3), p. 219-243, 2003.

³⁶OHAMA, Y.; GEMERT, D.V.; *Aplications of titanium dioxide*. Springer.Japão, p.45. 2011.

³⁷FOX, M.A.; DULAY, M. T.; **Heterogeneous Photocatalysis**. *Chemistry Review*, v. 93, p. 341-357, 2003.

³⁸FUJISHIMA, A. et al.; **Titanium dioxide photocatalysis**. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 1 (2000) 1–21.

³⁹SOBCZYŃSKI, A.; DOBOSZ, A.; **Water Purification by Photocatalysis on Semiconductors**. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 10, No. 4 (2001), 195-205.

⁴⁰MONTAZER, M.; SEIFOLLAHZADEH, S. **Enhanced Self-cleaning, Antibacterial and UV Protection Properties of Nano TiO₂ Treated Textile through Enzymatic Pretreatment**. *Photochemistry and Photobiology*, 2011, 87: 877–883

⁴¹ETACHERI, V. et al. **Highly visible light active TiO₂-xNx heterojunction photocatalysts**. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/cm903260f>>. Acesso em: novembro de 2012.

⁴²JIN, C. et al.; **Cellular Toxicity of TiO₂ Nanoparticles in Anatase and Rutile Crystal Phase**. *Biol Trace Elem Res* (2011) 141:3–15

⁴³OLIVEIRA, J.S.S.; SILVEIRA, L.G.; **Utilização de dióxido de titânio em processos fotocatalíticos para degradação de halofenóis.** Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI ISSN 1809-1636

⁴⁴PASCHOALINO, F. C. S. **Proposição de um reator fotocatalítico para degradação de fenol.** 87f. 2008. Campinas. Dissertação de mestrado - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

⁴⁵ NOGUEIRA, R. F. P.; JARDIM, W. **A Fotocatálise Heterogênea e sua Aplicação Ambiental.** Química Nova, v. 21, n. 5, p. 671-673, 1998.

⁴⁶PANDIYAN, T et al. M. A. **Comparison of methods for the photochemical degradation of chlorophenols.** Journal of Photochemistry and Photobiology, p. 149–155, 2002.

⁴⁷ GHOSH, J.P.; SUI, R.; LANGFORD, C.H.; et al., **A comparison of several nanoscale photocatalysts in the degradation of a common pollutant using LEDs and conventional UV light.** v.43, n.18, p.4499-4506, 2009.

⁴⁸ANTUNES DE MELO, W.C, M.; **Fotoinativação Seletiva de Microorganismos: Escherichia coli e Staphylococcus aureus,** Tese apresentada ao programa de pós graduação interunidades Bioengenharia da Universidade de São Paulo, 2014, p.135.

⁴⁹ JAMES, G.A., et al., *Biofilms in chronic wounds.* **Wound Repair Regen**, 2008. 16(1): p. 37-44.

⁵⁰DAHLBERG, C., Linberg, C., Torsvik, V. L., and Hermansson, M.. **Conjugative plasmids isolated from bacteria in marine environments show various degrees of homology**

to each other and are not closely related to well-characterized plasmids. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4692–4697. (1997).

⁵¹KIEREK-PEARSON, K.K.; ARATAN.E.; **Biofilm Development in Bacteria**. Advances in applied microbiology, Vol. 57, p.79-11.2005.

⁵²CHARACKLIS, W. G., Wilderer, P. A. (1989) *Structure and Function of Biofilms*. New York: John Wiley & Sons.

⁵³MARSHALL, K. C. e Blainey, B. L. (1990) **Role of bacterial adhesion in biofilme formation and biocorrosion**. In: Flemming H-C, Geesey, G. G. (eds) *Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems*. Springer, Heidelberg. 29-45

⁵⁴NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; **Diarrheagenic *Escherichia coli***. Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11(1):142.

⁵⁵ KUSSOVSKI, V., et al., *Photodynamic inactivation of *Aeromonas hydrophila* by cationic phthalocyanines with different hydrophobicity*. **FEMS Microbiol Lett**, 2009. 294(2): p. 133-40..

⁵⁶TORTORA, G.J., CASE, C.L., *Microbiology: an introduction*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, p.116, 2010.

⁵⁷ PRATT, L.A.; KOLTER, R.; **Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili**. Molecular Microbiology (1998) 30(2), 285–293.

⁵⁸BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.M.; *Escherichia coli* biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology Volume 322, 2008, pp 249-289**

⁵⁹SONI, K.a.; et al.: **Zeta Potential of Selected Bacteria in Drinking Water**. Curr Microbiol (2008) 56:93–97.

⁶⁰ LIN, D.Q. et al.; **Biomass/Adsorbent Electrostatic Interactions in Expanded Bed Adsorption: A Zeta Potential Study**. Biotechnology and bioengineering, VOL. 83, NO. 2, JULY 20, 2003

⁶¹HAYASHI, H., et al.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 22 (2001) 149–157.

⁶²FLETCHER, M.; **The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene**. Canadian Journal of Microbiology, 1977, v.23, No1, p. 1-6.

⁶³AURENTY, P.; LANET, V.; TESSANDRO, A.; GANDINI, A. **Apparatus for the characterization of the static and dynamic wettability of complex interfaces**. Rev.Sci.Instrum. 68, 1997.

⁶⁴JANCZUK, B.; WOJCIK, W.; ZDZIENNICKA, A. **Determination of the Components of the Surface Tension of Some Liquids from Interfacial Liquid-Liquid Tension Measurements**. Journal of Colloid and Interface Science, v.157, p.384-393, 1993.

⁶⁵BRACCO, G.; HOLST, Bodil. **Surface Science Techniques**. In: Contact Angle and Wetting Properties, Berlin: Springer, 2013. p.3-9.

⁶⁶ YOUNG, T. **An essay on the cohesion of fluids**. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, v.95, p.65-87, 1805.

⁶⁷VAN OSS, C.J. **Interfacial Forces in Aqueous Media**. New York, 2ed., 2006.

⁶⁸ LIDE, R.D.; **RCRC Handbook of Chemistry and Physics**. (2003-2004).f.296.

⁶⁹VERBEEK, C.J.R.; et al. **Polymer Degradation and Stability**. 96, (2011) 515-522.

⁷⁰DAVIES, M.J. **Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences**. BiochemBiophys Res Commun. v.3, n.305, p.761, 2003.

⁷¹CAREY, J.H.; J. Lawrence, H.M. Tosine, Bull. Environ. Contam.Toxicol.16 (1976) 697.

⁷²OLLIS, D.F., AL-EKABI, H., Eds. **Photocatalysis Purification and Treatment of Water and Air**. Elsevier, Amsterdam (1992).

⁷³LETMANN, C.; Et al.; **Visible light photodegradation of 4-chlorophenol with a coke-containing titanium dioxide photocatalyst**. Applied Catalysis B: Environmental 32 (2001) 215–227.

⁷⁴HOFMANN, M.R.; et al.; **Environmental Applications of Semiconductor Photocatalysis**.Chem. Rev. 1995, 95, 69-96.

⁷⁵ARIMA, A.A. **Estudo comparativo entre as alterações produzidas pelas biomoléculas floretina e barbaloína na estrutura e na hidratação de membranas modelo negativamente carregadas de DMPG**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Botucatu . 2010.

⁷⁶AYGUN.a.; TORREY, K.; KUMAR, A.;**Investigation of Factors Affecting Controlled Release from Photosensitive DMPC and DSPC Liposomes**. ApplBiochemBiotechnol (2012) 167:743–757

⁷⁷BANGHAM, A. D., & HORNE, R. W. (1964).Journal of Molecular Biology, 8, 660–668.

⁷⁸CHAIZE, B., COLLETIER, J. P.,WINTERHALTER, M., & FOURNIER, D. (2004). **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology**, 32, 67–75.

⁷⁹ LEONENKO, Z.V. et al. **Supported planar bilayer formation by vesicle fusion: the interaction of phospholipid vesicles with surfaces and the effect of gramicidin on bilayer properties using atomic force microscopy.** Biochimica et Biophysica Acta 1509 (2000) 131-147.

⁸⁰ YUAN, C.; JOHNSTON, L.J.; **Atomic Force Microscopy Studies of Ganglioside GM1 Domains in Phosphatidylcholine and Phosphatidylcholine/Cholesterol Bilayers.** Biophysical Journal Volume 81 August 2001 1059–1069

⁸¹ SPANGENBERG, T.; MELLO, N.F.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PASA, A.A.; NIEHUS, H.; **AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by solution spreading.** Phys. St. Sol(a) , v.201, n.5, p. 857–860. 2004.

⁸² FRESHNEY, J.R..**Culture of animal cells, a manual of basic technic;** Liss W.; 3ª edição; pg 112.

⁸³ MILLONI, M.A.D.; Monocapas Autosambladas de Alcanotioles Y sobre Oro: Adorción no específica de Moléculas Bioactivas, Biomoléculas y Vesículas. Tese de Doutorado em Química. 24f. Universidade de La Plata, Argentina. 2011.

⁸⁴ MELOo W.C.M.A., PERUSSI J.R., HAMBLIM M.R., (2013) *Electroporation enhances antimicrobial photodynamic therapy mediated by the hydrophobic photosensitizer, hypericin.* **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.08.001>.

⁸⁵ VEECO INSTRUMENTS. Guia do usuário Nanoscope 6.13. Manual. 2004. P.206.

⁸⁶ MERRITT, J. H., KADOURI, D.E.; O'TOOLE, G. A., 2005. **Growing and Analyzing Static Biofilms Biofilms.** Current Protocols in Microbiology. 00:1B.1.1–1B.1.17.

⁸⁷ HAYNES, W.N.; **Handbook of Chemistry and Physics**. V.1. p.1650. 2012-2013.

⁸⁸ ULLAH, S.: et al.: **Photoactive layer-by-layer films of cellulose phosphate and titanium dioxide containing phosphotungstic acid**. .Applied Surface Science. v. 277, p. 111-120, 2013.

⁸⁹ WANG, B.; HU, L.; **Optical and surface properties of hybrid TiO₂/ormosil planar waveguide prepared by the sol-gel process**, Ceramics International 32 (2006) 7-12.

⁹⁰ BRIDGEMAN, A. J. **Density functional study of the vibrational frequencies of alpha Keggin heteropolyanions**. Chemical Physics, v. 287, n. 1, p. 55-69, 2003.

⁹¹ SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D.J.. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª ed ,Rio de Janeiro: LTC, 2007. cap. 2 ,p. 70-117.

⁹² NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman of inorganic and coordination compounds**. New York: Willey, 1986.

⁹³ FIDALGO, A.; ILHARCO, L. M.; **Chemical tailoring of porous silica xerogels: local structure by vibrational spectroscopy**. Chemical a European Journal, v. 10, n.2, p. 392-398, 2004.

⁹⁴ PEREIRA, R. P. et al. **Poly(ethylene oxide): electronic structure, energetics, and vibrational spectrum**. Journal of Physical Chemistry B, v.108, n.34, p.12677-12684, 2004.

⁹⁵ BOWER, D. I.; MADDAMS, W. F. **The vibrational spectroscopy of polymers**. New York, Cambridge University Press, 1989. p. 326 .

-
- ⁹⁶SUN, Z. et al. **Enhanced photoelectrochemical performance of nanocomposite film fabricated by self-assembly of titanium dioxide and polyoxometalates.** Journal of Physical Chemistry, v. 114, n.11, p. 5211–5216, 2010.
- ⁹⁷ INGHAM, B.; CHONG, S. V.; TALLON, J. L. **Layered tungsten oxide-based organotinorganic hybrid materials: an infrared and Raman study.** Journal of Physical Chemistry B, v.109, n.11, p. 4936-4940, 2005.
- ⁹⁸ GONÇALVES, L.P.; **Nanopartículas de dióxido de titânio como aditivos em materiais híbridos orgânico-inorgânico fotocromicos baseados em fosfotungstato.** São Carlos, SP, 2011. Dissertação de mestrado apresentada no Departamento de Engenharia de Materiais
- ⁹⁹ MORGAN, T.D.; WILSON, M. **The Effects of Surface Roughness and Type of Denture Acrylic on Biofilm Formation by Streptococcus Oralís in a Constant Depth Film Fermentor.** Journal of Applied Microbiology. v. 91, No. 1, p. 47-53., 2001.
- ¹⁰⁰ WANG, B.-L.; HU, L.-L. **Effect of water content in sol on optical properties of hybrid sol–gel derived TiO₂/SiO₂/ormosil film.** Materials Chemistry and Physics. v. 89, p.417–422, 2005.
- ¹⁰¹ SPANGENBERG, T.; MELLO, N.F.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PASA, A.A.; NIEHUS, H.; **AFM in-situ characterization of supported phospholipid layers formed by solution spreading.** Phys. St. Sol(a) , v.201, n.5, p. 857–860. 2004.
- ¹⁰² REVIKINE, I., BRISSON, A.; **Formation of Supported Phospholipid Bilayers from Unilamellar Vesicles Investigated by Atomic Force Microscopy.** Langmuir. v.16, p.1806-1815, 2000.
- ¹⁰³PARK, J.; SONG, J. JUNG, J; et al.**The Effects of Surface Roughness of Composite Resin on Bio- film Formation of *Streptococcus mutans* in the Presence of Saliva.** Operative Dentistry, v.37, No. 5, p. 532-539, 2012.

¹⁰⁴ BD BIOSCIENCES. **Cell Adhesion Protocol Manual**. Protocol. 2001.53p

¹⁰⁵ SUNADA, K.; HASHIMOTO, K. **Bactericidal Activity of Copper-Deposited TiO₂ Thin Film under Weak UV Light Illumination**. Environ. Sci. Technol, v37, p.4785-4789. 2003.

¹⁰⁶ FERREIRA NETO.; et al. **Surface structure and reactivity study of phosphotungstic acid nitrogenated ormosils**. Journal of Sol-Gel Science and Technology. V.66, n.3, p.363-371, 2013.

¹⁰⁷ BRINKER, C.J., et al, Journal of Non-Crystalline Solids 147&148 (1992) 424-436.