Universidade de São Paulo – USP
Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia

LARISSA SOUZA AMARAL

**Otimização da inativação fotodinâmica de *E. coli* por
fotossensibilizadores veiculados por nanopartículas de sílica**

São Carlos,

2016

Universidade de São Paulo – USP
Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia

LARISSA SOUZA AMARAL

**Otimização da inativação fotodinâmica de *E. coli* por
fotossensibilizadores veiculados por nanopartículas de sílica**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Janice Rodrigues Perussi

São Carlos,

2016

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

A485o Amaral, Larissa Souza
 Otimização da Inativação Fotodinâmica de *E.coli* por
Fotossensibilizadores Veiculados por Nanopartículas de
Sílica / Larissa Souza Amaral; orientadora Janice
Rodrigues Perussi. São Carlos, 2016.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2016.

1. Inativação Fotodinâmica. 2. nanopartículas de
sílica. 3. planejamento experimental. 4. azul de
metileno. 5. azul de toluidina O. 6. *Escherichia coli*.
I. Título.

Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

LARISSA SOUZA AMARAL

Título: “Otimização da inativação fotodinâmica de *E. coli* por fotossensibilizadores veiculados por nanopartículas de sílica”

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 03/02/2016

Profa. Dra.: Janice Rodrigues Perussi (Orientadora) Instituto de Química de São Carlos / USP

Assinatura: _____

Resultado: Aprovada

Prof. Dr.: Andrei Leitão

Instituto de Química de São Carlos / USP

Assinatura: _____

Resultado: Aprovada

Prof. Dr.: Eduardo Bessa Azevedo

Instituto de Química de São Carlos / USP

Assinatura: Eduardo Bessa Azevedo

Resultado: APROVADA

Homologado em: ____/____/____

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

Dedico esse trabalho à todos os que me ajudaram a desvendar parte do “imenso oceano” que é a pesquisa científica, em especial:

Minha linda mãezinha Marilene que sempre foi e será meu exemplo, minha admiração, meu consolo, minha paz, meu tudo!

Meu namorado Erich que desde o início esteve sempre ao meu lado me incentivando, consolando, acalmando e amando com todo o seu carinho, dedicação e afeto!

Minha Orientadora Janice por tantos conselhos, sugestões e suporte que me fizeram chegar até onde cheguei!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida e por me conceder inteligência e força de vontade suficientes para alcançar e lutar pelos meus objetivos. Não sei o que me espera amanhã, mas permaneço em paz, pois sei que Deus tem sempre o melhor para mim, assim como a conclusão desse mestrado. Confio e espero pois sei que com minha fé serei sempre vitoriosa!

À minha mãe Marilene por sempre me apoiar, vibrar comigo diante de qualquer conquista e me consolar diante dos obstáculos. Obrigada minha mãe perfeita pelo amor, carinho e dedicação. Obrigada por nunca desistir de mim, por sempre ser a mão que me segura, mesmo a 1000 km de distância. Obrigada por ser minha mãe e meu pai, por ser minha luz e minha paz. Desejo a sua eternidade ao meu lado, à você minha eterna e sincera gratidão!

Ao meu namorado Erich pela dedicação em nosso relacionamento. Obrigada por estar comigo desde o início de minhas conquistas acadêmicas após a graduação, por me auxiliar nos processos de otimização e em minhas dúvidas. Obrigada por compartilhar comigo dos meus planos e sonhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi pela dedicação em toda a minha fase de crescimento acadêmico. Obrigada por ter me conduzido até onde cheguei, pelas oportunidades, pela paciência e pelo constante incentivo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bessa Azevedo com quem aprendi o processo de otimização por planejamento de experimentos e ao Prof. Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho por me ensinar a preparar nanopartículas e filmes em seu laboratório.

À todos os colegas do Laboratório de Fotossensibilizadores – IQSC/USP e do Laboratório de Química de Materiais Híbridos e Inorgânicos – IQSC/USP por toda colaboração e companhia durante o Programa de Mestrado.

Agradeço a CAPES, FAPESP e CEPOF pela bolsa durante o mestrado e pelo suporte financeiro para a realização dos experimentos.

RESUMO

AMARAL, L.S. **Otimização da inativação fotodinâmica de *E. coli* por fotossensibilizadores veiculados por nanopartículas de sílica**. 2016. 99 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

A nanotecnologia tem sido aplicada para o desenvolvimento de materiais para diversas aplicações inclusive na inativação de patógenos. As nanopartículas de sílica (npSi) destacam-se pela alta área superficial, facilidade na alteração da superfície para aumento da eficiência adsorptiva, penetrabilidade e toxicidade para bactérias gram-negativas sendo biocompatíveis para células de mamíferos e mais foto-estáveis que a maioria dos compostos orgânicos. Devido as suas vantagens, as npSi podem ser usadas para veicular fotossensibilizadores (FSs) uma vez que permitem sua utilização em solução aquosa em que os FSs geralmente são insolúveis. Além disso, o uso de FSs em vez de antibióticos, permite a inativação microbiológica pela Terapia Fotodinâmica sem que as bactérias adquiram resistência por mecanismos genéticos. Esse processo ocorre pela interação entre um FS, luz e oxigênio molecular produzindo oxigênio singlete que é extremamente reativo danificando estruturas celulares. O objetivo desse estudo foi otimizar a fotoinativação dinâmica de *E. coli* utilizando Azul de Metileno (AM) e Azul de Toluidina O (ATO) veiculados por npSi. As npSi foram preparadas pela metodologia sol-gel, caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e submetidas à adsorção de AM e ATO em sua superfície. A presença de AM e ATO na superfície das npSi foram analisadas por espectroscopia no infravermelho; espectroscopia de fluorescência por raio-X e análise termogravimétrica. O planejamento experimental, iniciado pelo fatorial 2^3 e modelado ao composto central em busca das condições ótimas foi adotado pela primeira vez nessa aplicabilidade, visando a fotoinativação de *E. coli* empregando AM e ATO em solução e em seguida com npSi. AM e ATO veiculados por npSi permitem a fotoinativação em concentrações mais baixas de FS (20 e 51% respectivamente), causando desestruturação da integridade bacteriana demonstrada por MEV. Os resultados sugerem que a veiculação de AM e ATO por npSi é extremamente efetiva para a fotoinativação dinâmica de *E. coli* e que o planejamento composto central pode levar à completa inativação das bactérias.

Palavras Chave: Inativação Fotodinâmica, nanopartículas de sílica, planejamento experimental, azul de metileno, azul de toluidina O, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

AMARAL, L.S. **Optimization of the photodynamic inactivation of *E. coli* by photosensitizers carried by silica nanoparticles.** 2016. 99 f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2016.

Nanotechnology has been applied to the development of materials for several applications inclusive inactivation of pathogens. The silica nanoparticles (npSi) are distinguished by high surface area, ease of change the surface in order to increase the adsorption efficiency, penetrability and toxicity in gram-negative bacteria being biocompatible with mammalian cells and more photo-stable than most the organic compounds. Due to its advantages, npSi can be used to carry photosensitizers (PSs) since they allow its use in aqueous solution in which PSs are frequently insoluble. Furthermore, the use of PSs instead of antibiotics, allows the microbiological inactivation by Photodynamic Therapy without bacteria to develop resistance by genetic mechanisms. This process occurs by the interaction among a PS, light and molecular oxygen producing singlet oxygen, which is extremely reactive, causing damage to cellular structures. The aim of this study was to optimize the photoinactivation of *E. coli* using Methylene Blue (MB) and Toluidine Blue O (TBO) carried by npSi using the central composite design. The npSi were prepared by sol-gel method, characterized by scanning electron microscopy (SEM) and subjected to adsorption of MB and TBO on its surface. The presence of PSs on the surface of npSi were analyzed by infrared spectroscopy, fluorescence X-ray spectroscopy and thermogravimetric analysis. The experimental design, initiated by the factorial 2^3 and modeled by the central composite in search of the optimal conditions was adopted for the first-time for this applicability, aiming the *E. coli* photoinactivation employing MB and TBO in solution and then with npSi. MB and TBO carried by npSi allowed the photoinactivation in lower concentrations of PS (20 and 51% respectively), causing disruption of bacterial integrity demonstrated by SEM. The results suggest that MB and TBO carried by npSi are extremely effective for dynamic photoinactivation of *E. coli* and the central composite design can lead to complete inactivation of bacteria.

Keywords: Photodynamic inactivation, silica nanoparticles, experimental design, methylene blue, toluidine blue O, *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala representativa de macro-materiais para átomos.	17
Figura 2: Imagem representativa da estrutura de nanopartícula de sílica.	18
Figura 3: Metodologia sol-gel para o preparo de nanopartículas em que o rosa representa a parte em gel e em verde o sol com as partículas suspensas.	20
Figura 4: Representação da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.	22
Figura 5: Representação do Diagrama de Jablonski.	23
Figura 6: Estrutura Molecular do Azul de Metileno e seu espectro de absorção na região do visível.	25
Figura 7: Estrutura Molecular do Azul de Toluidina O e seu espectro de absorção na região do visível.	27
Figura 8: Interação entre nanopartículas de sílica com: (a) bactéria Gram-negativa e (b) células de mamíferos.	29
Figura 9: Microscopia Eletrônica de Transmissão de E. coli após tratamento com nanopartículas para diferentes tempos: (a) 0 min. (b) 60 min. (c) 120 min. (d) 180 min.	30
Figura 10: Esquema ilustrativo da metodologia de preparação de nanopartículas de sílica pelo método Stober.	32
Figuras 11: (a) Porta amostra para análise de fluorescência por Raio-X e (b): Espectrofotômetro por Fluorescência de Raio-X.	37
Figura 12: Equipamento utilizado para análise termogravimétrica.	38
Figura 13: Otimização da fotoinativação do biofilme multiespécies utilizando modelos matemáticos, sendo os parâmetros (Ti): tempo de incubação; (C): concentração do FS e (DL): Dose de Luz.	40
Figura 14: Biotable com um série de LEDs brancos.	42
Figura 15: (a) Imagem de MEV de npSi preparadas com precursor TEOS, pelo método de Stober, sem aglomerados e (b) distribuição normal do tamanho das nanopartículas obtidas. Imagem feita por um Microscópio LEO modelo 440 com magnitude de 60,00 KX.	45
Figura 16: (a) Imagens de MEV de npSi preparadas com precursor TEOS, pelo método de Stober, com aglomerados e (b) distribuição normal do tamanho das npSi. Imagem feita por um Microscópio ZEISS modelo SIGMA, com magnitude de 290,00 KX.	45

Figura 17: a) Espectros de absorção molar do AM em PBS, nas concentrações de: 1 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5 $\mu\text{g/mL}$ e b) Curva de calibração para o AM para determinação do coeficiente de absorção molar obtida pela regressão linear dos pontos experimentais.....	46
Figura 18: a) Espectros de absorção molar do ATO em PBS, nas concentrações de: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ e b) Curva de calibração para o ATO para determinação do coeficiente de absorção molar.....	48
Figura 19: Espectros de absorção do AM em PBS em função do pH.....	49
Figura 20: Espectros de absorção do ATO em PBS em função do pH.....	50
Figura 21: Adsorção do AM nas concentrações: 20, 50, 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por npSi.....	51
Figura 22: Adsorção do ATO nas concentrações: 20, 50, 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por npSi.....	52
Figura 23: Dados experimentais utilizando 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: a) Pseudo –primeira ordem e b) Pseudo-segunda ordem.	54
Figura 24: Dados experimentais utilizando 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: a) Pseudo –primeira ordem e b) Pseudo-segunda ordem.	55
Figura 25: Dados experimentais utilizando 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: a) Pseudo –primeira ordem e b) Pseudo-segunda ordem.	55
Figura 26: Dados experimentais utilizando 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: a) Pseudo –primeira ordem e b) Pseudo-segunda ordem.	56
Figura 27: Dados experimentais utilizando 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: a) Pseudo –primeira ordem b) Pseudo-segunda ordem.	56
Figura 28: Dados experimentais utilizando 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: a) Pseudo –primeira ordem b) Pseudo-segunda ordem.	57
Figura 29: Dados experimentais utilizando 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: a) Pseudo –primeira ordem b) Pseudo-segunda ordem.	57
Figura 30: Dados experimentais utilizando 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: a) Pseudo –primeira ordem b) Pseudo-segunda ordem.	58
Figura 31: Espectros de transmitância de npSi pura, npSi-AM e npSi-ATO no infravermelho.	61
Figura 32: Curva de degradação térmica de npSi, npSi-AM e npSi-ATO.....	63
Figura 33: Curva de crescimento da E. coli em meio BHI e a representação da primeira derivada no tempo da curva de crescimento.....	64

Figura 34: (a) Diagrama de Pareto em função do teste t para AM e (b) Diagrama de Pareto em função dos efeitos em que DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.	66
Figura 35: (a) Diagrama de Pareto em função do teste t para ATO e (b) Diagrama de Pareto em função dos efeitos em que DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.	66
Figura 36: Gráficos de superfície/contorno do planejamento composto central para AM (a) TI x DL; (b) TI x C e (c) DL x C.	72
Figura 37: Gráficos de superfície/contorno do planejamento composto central para ATO (a) TI x DL; (b) TI x C e (c) DL x C.....	74
Figura 38: (a) Diagrama de Pareto em função do teste t para AM adsorvido na superfície de npSi e (b) Diagrama de Pareto em função dos efeitos em que DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.	77
Figura 39: (a) Diagrama de Pareto em função do teste t para ATO adsorvido na superfície de npSi e (b) Diagrama de Pareto em função dos efeitos em que DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.	78
Figura 40: Gráficos de superfície/contorno do planejamento composto central para a fotoinativação de E. coli com npSi-AM (a) TI x DL; (b) TI x C e (c) DL x C.....	82
Figura 41: Gráficos de superfície/contorno do planejamento composto central para a fotoinativação de E. coli com npSi-ATO (a) TI x DL; (b) TI x C e (c) DL x C.....	84
Figura 42: Microfotografias da interação E .coli/npSi-AM/ATO. a) E. coli isolada sem tratamento. As demais figuras referem-se a diferentes tratamentos. b) experimento com 8 min de incubação, concentração de npSi-AM de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e dose de luz de 15 J cm^{-2} . c) é referente às mesmas condições que 42(b), no entanto utilizou-se 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de npSi-ATO. d) e e) 16 minutos de incubação, dose de luz de 20 J cm^{-2} e concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de npSi-AM (42d) e de npSi-ATO (42e). f) e g) referem-se a 20 min de incubação; dose de luz de 30 J cm^{-2} e concentração de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ npSi-AM (42f) e npSi-ATO (42g).	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores adsorvidos do AM e ATO em função da concentração, por quantidade em massa de npSi.	54
Tabela 2: Parâmetros cinéticos de adsorção de AM e ATO sobre npSi para o modelo de Pseudo-Segunda Ordem.	59
Tabela 3: Resultados da quantificação em porcentagem de S pela técnica EDXRF.....	62
Tabela 4: Planejamento Fatorial 2^3 e resultados obtidos no processo de fotoinativação utilizando AM e ATO em solução. T_i = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz ($J\ cm^{-2}$) e C = concentração ($\mu mol\ L^{-1}$).	65
Tabela 5: Resultado da análise de variância (ANOVA) para AM e ATO em solução, em que SQ= Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ= Média Quadrática.	67
Tabela 6: Valores dos deslocamento e resultados obtidos para AM e ATO em solução, em que TI = Tempo de incubação (min); DL = dose de Luz ($J\ cm^{-2}$) e C = Concentração ($\mu mol\ L^{-1}$).	68
Tabela 7: Resultados do segundo Planejamento fatorial 2^3 , em que T_i = tempo de incubação; DL = Dose de luz e C = concentração.	68
Tabela 8: Tabela ANOVA do segundo planejamento fatorial para AM e ATO em solução, em que SQ = Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ = Média Quadrática.....	70
Tabela 9: Planejamento Composto Central para AM e ATO em solução, em que TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz ($J\ cm^{-2}$) e C = concentração ($\mu mol\ L^{-1}$)......	70
Tabela 10: Tabela ANOVA do Planejamento Composto Central para AM e ATO em solução, em que em que SQ = Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ = Média Quadrática.....	71
Tabela 11: Planejamento Fatorial 2^3 e resultados obtidos no processo de fotoinativação de E. coli utilizando npSi-AM e npSi-ATO. TI = tempo de incubação; DL = Dose de luz e C = concentração.	76
Tabela 12: Tabela ANOVA para npSi-AM e npSi-ATO, em que SQ= Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ= Média Quadrática.	78
Tabela 13: Valores dos deslocamentos e resultados obtidos para fotoinativação de E. coli com npSi-AM e npSi-ATO, em que TI = Tempo de incubação (min); DL = dose de Luz ($J\ cm^{-2}$) e C = Concentração ($\mu mol\ L^{-1}$) para os dois FSs incorporados às npSi.....	79

Tabela 14: Resultados do segundo Planejamento fatorial 2^3 , em que TI = tempo de incubação; DL = Dose de luz e C = concentração para fotoinativação de E. coli com AM e ATO incorporados às npSi.	79
Tabela 15: Tabela ANOVA referente ao segundo planejamento fatorial para a fotoinativação de E. coli com npSi-AM e npSi-ATO, em que SQ = Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ = Média Quadrática.....	80
Tabela 16: Planejamento Composto Central para a fotoinativação de E. coli com npSi-AM e npSi-ATO, em que TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm^{-2}) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$).	81
Tabela 17: Tabela ANOVA do Planejamento Composto Central para a fotoinativação de E. coli com npSi-AM e npSi-ATO, em que em que SQ= Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ= Média Quadrática.....	81

ABREVIACÕES E SIGLAS

TFD: Terapia Fotodinâmica

FS: Fotossensibilizador

S₀: Estado Fundamental

S₁: Estado Excitado Singlete

T₁: Estado Triplete

O₂^{•-}: Radial Superóxido

AM: Azul de Metileno

ATO: Azul de Toluidina O

npSi: Nanopartículas de Silica

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

PBS: Tampão Fosfato de Sódio

q_e: Quantidade Adsorvida pelo Adsorvente no Equilíbrio ($\mu\text{mol g}^{-1}$)

C₀: Concentração do Adsorvato no Tempo Inicial em $\mu\text{mol L}^{-1}$

C_t: Concentração do Adsorvato no Tempo t em $\mu\text{mol L}^{-1}$

k₁: Constante de Velocidade de Adsorção do Modelo de Pseudo-Primeira Ordem (min^{-1})

k₂: Constante de Velocidade de Adsorção do Modelo de Pseudo-Segunda Ordem ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$)

H: Velocidade Inicial de Adsorção ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) para t_0

R: Coeficiente de Correlação Linear

FTIR: Spectrophotometry in Infrared (Espectrofotometria no Infravermelho)

EDXRF: Espectroscopia por Fluorescência de Raio X

TGA: Análise Termogravimétrica

E. coli: *Escherichia coli*

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain - Heart Infusion (Infusão Cérebro - Coração)

RPM: Rotação por Minuto

UFC: Unidade Formadora de Colônia

DP: Desvio Padrão

F. Ajuste: Falta de Ajuste

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
1.1 A Nanociência e a Nanotecnologia.....	17
1.2 Nanopartículas de Sílica e a Metodologia Sol-Gel	18
1.3 Terapia Fotodinâmica e a Inativação de Bactérias Gram-negativas.....	21
1.4 Processos Fotodinâmicos	22
1.5 Agentes Fotossensibilizantes	24
1.5.1 Azul de Metileno (AM).....	25
1.5.2 Azul de Toluidina O	26
1.6 Otimização Matemática pelo Planejamento Composto Central	27
1.7 Importância da Veiculação de Fotossensibilizadores por Nanopartículas.....	28
2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. METODOLOGIA.....	32
3.1 Nanopartículas de sílica	32
3.1.1 Preparo das nanopartículas de sílica.....	32
3.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Nanopartículas de Sílica	33
3.2 Fotossensibilizadores	33
3.2.1 Coeficiente de Absorção Molar dos Fotossensibilizadores.....	33
3.2.2 Influência do pH no meio reacional	33
3.3 Cinética de adsorção dos fotossensibilizadores em nanopartículas de sílica.....	34
3.3.1 Processo de Adsorção.....	34
3.3.2 Experimento de Cinética de Adsorção	34
3.3.3 Ajuste ao Modelo de Pseudo-Primeira Ordem.....	35
3.3.4 Ajuste ao Modelo de Pseudo-Segunda Ordem.....	36

3.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)	36
3.5 Análise Semi-Quantitativa por Fluorescência de Raios-X no Modo Dispersivo em Energia (EDXRF) das npSi.....	37
3.6 Análise Termogravimétrica (TGA)	38
4. Experimentos Microbiológicos	38
4.1 Cultivo Microbiológico.....	38
4.2 Curva de crescimento da <i>E. coli</i>	39
4.3 Otimização da Inativação utilizando Planejamento Composto Central.....	39
4.4 Preparação para Fotoinativação de <i>E. coli</i>	40
4.4.1 Preparo de solução dos FSs	40
4.4.2 Preparo da Suspensão de npSi.....	40
4.4.3 Preparo da suspensão de <i>E. coli</i>	41
4.4.4 Quantificação de <i>E. coli</i>	41
4.4.5 Fonte de Luz Utilizada	42
4.5 Experimentos de Fotoinativação de <i>E. coli</i>	42
4.5.1 Fotoinativação com AM e ATO em solução.....	43
4.5.2 Fotoinativação com AM e ATO Adsorvidos em npSi sem retirada de excesso não adsorvido	43
4.6 Análise da interação bactéria/npSi por MEV.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Nanopartículas de sílica	44
5.1.1 Análise do Tamanho das npSi por MEV.....	44
5.2 Fotossensibilizadores	45
5.2.1 Coeficiente de Absorção Molar do AM e ATO	45
5.2.2 Influência da alteração do pH.....	49

5.3 Cinética de Adsorção	50
5.3.1 Cinética de Adsorção do AM e ATO por npSi	50
5.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho	60
5.5 Análise Semi-Quantitativa por Fluorescência de Raios-X no Modo Dispersivo em Energia (EDXRF) das npSi.....	61
5.6 Análise Termogravimétrica (TGA)	62
6. Experimentos Microbiológicos	63
6.1 Curva de crescimento da <i>E. coli</i>	63
6.2 Experimentos de Fotoinativação de <i>E. coli</i>	64
6.2.1 Fotoinativação com AM e ATO em Solução – Planejamento Experimental.....	64
6.2.2 Fotoinativação com AM e ATO Adsorvido em npSi – Planejamento Experimental	76
6.3 Análise da interação <i>E. coli</i> /npSi-AM/ATO por MEV.....	86
7. CONCLUSÕES	88
8. REFERÊNCIAS.....	89

1.INTRODUÇÃO

1.1 A Nanociência e a Nanotecnologia

“Nano” é um prefixo de procedência grega significando “excessiva pequenez”. A nanociência é definida pelo estudo da natureza em escala nanométrica, convencionalmente definida de 1 a 100 nm. Já a nanotecnologia é definida como a aplicação dos conhecimentos nanocientíficos para a manipulação, controle e integração dos átomos e moléculas para formar materiais, estruturas, componentes, dispositivos e sistemas em níveis celulares e moleculares (nanoescala) com a finalidade de promover avanços nas ciências da vida e da saúde (Filipponi, 2010). A fig. 1 apresenta a comparação de estruturas para conhecimento da nanoescala.

Figura 1: Escala representativa de macro-materiais para átomos.

Fonte: Filipponi, 2010 ajustado pelo autor.

Nanomateriais, que são materiais preparados em nanoescala, apresentam efeitos quânticos e de superfície. Quânticos porque há limitação sobre o movimento dos elétrons alterando propriedades como cor e condutibilidade elétrica e de superfície porque há diminuição do tamanho da amostra (Rosensweig, 1997).

Diante do cenário da fabricação de nanomateriais, as nanopartículas se destacam devido à uma área superficial específica elevada que resulta em uma maior interações entre materiais, aumentando assim a força e/ou resistência química/térmica. Também pelo fato das nanopartículas apresentarem dimensões inferiores em relação ao comprimento de onda crítico de luz, tornando-as transparentes, sendo importante sua aplicação em embalagens, cosméticos, revestimentos, além de adsorventes, abrasivos, agentes dispersantes e de cobertura, catalisadores de reações, sondas em sistemas químicos e biológicos e transportadores de fármacos (Chatterjee, 2008 e Morais, 2001).

As nanopartículas são fabricadas com ou a partir de diversos materiais, sendo os mais comuns e importantes as cerâmicas de óxido metálico, como titânio, zinco, alumínio e ferro, além do silício. O silício se destaca por sua abundância, estando presente em tecidos, animais e vegetais, sendo essencial para alguns organismos, apresentando-se na forma de óxidos cristalinos (quartzo, cristobalita, tridimita, coesita) e não cristalinos (sílica vítrea, opala, sílica gel) (Niu, Y et al, 2014) para diversas aplicabilidades.

1.2 Nanopartículas de Sílica e a Metodologia Sol-Gel

A sílica é o polímero mais utilizado na classe das substâncias inorgânicas, sendo utilizada como suporte de uma variedade de sistemas com diferentes ramos de aplicação. Na sua estrutura há a presença de grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior, e de grupo silanóis (Si-OH) em sua superfície, como pode ser visto pela fig. 2. Devido a sua superfície, ela é considerada interessante para estudos de adsorção de moléculas e íons (Farias, 2000).

Figura 2: Imagem representativa da estrutura de nanopartícula de sílica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A sílica-gel é uma matriz sólida inorgânica ideal por apresentar uma ótima estabilidade mecânica sendo simples em relação à outras matrizes, como por exemplo, um polímero. A sílica

apresenta cinética de adsorção rápida, boa resistência ao inchaço em diferentes solventes, estabilidade química e fácil obtenção pelo método sol-gel (Niu, Y et al, 2014).

A metodologia sol-gel inicia-se com o preparo de um coloide. Coloide é uma suspensão em que a fase dispersa é pequena, assim as forças gravitacionais podem ser desprezadas. As interações predominantes são as forças de van der Waals e interações eletrostáticas, advindas da carga superficial das partículas. A suspensão coloidal apresenta duas fases, uma fase dispersa e um meio dispersante, aparentando a olho nu ter apenas uma fase. As partículas suspensas tendem a se encontrar devido ao movimento browniano. Dependendo da interação entre essas partículas, as mesmas podem se agregar e precipitar, desestabilizando o sistema coloidal, sendo uma ação irreversível (Mebert, 2013).

A metodologia Sol-Gel tem várias vantagens, como a escolha de precursor com elevada pureza, o material obtido apresenta alta homogeneidade, seja em géis, filmes e partículas e especialmente, permite a possibilidade de híbridos e de materiais compósitos com novas propriedades químicas, mecânicas, condutivas e permeabilidade (Bacile N, 2009 e Mebert, 2013). Também é a metodologia mais simples para o preparo de membranas inorgânicas porosas, npSi e preparo de filmes.

A síntese ocorre através de duas reações, a hidrólise e a condensação. Na reação descrita pela Equação 1 ocorre a hidrólise do grupo alcóxido com a formação de grupos reativos do tipo silanol e na reação descrita pela Equação 2 ou 3 ocorre a condensação do grupo silanol, a qual leva inicialmente à formação do sol e, eventualmente, ao gel. No mecanismo sol-gel apenas a reação 1 é bem conhecida, pois as reações 2 ou 3 começam antes da reação 1 terminar, tornando o mecanismo muito complexo e envolvendo muitas reações de hidrólise e condensação ao mesmo tempo (Zha, J et al 1991).

ou

A reação de hidrólise, ativada por um ácido, envolve a protonação do grupo alcóxido, seguida pelo ataque nucleofílico da água, para formar um intermediário penta-coordenado. Sob condições básicas, acredita-se que o mecanismo envolva o ataque nucleofílico sobre o átomo de silício pelo ânion hidróxido para formar um intermediário penta-coordenado carregado negativamente, seguido pela saída de um ânion alcóxido (Brinker, C. 1988). A fig.3 mostra esquematicamente o processo sol-gel para confecção de nanopartículas.

Figura 3: Metodologia sol-gel para o preparo de nanopartículas em que o rosa representa a parte em gel e em verde o sol com as partículas suspensas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido às propriedades da sílica, bem como à facilidade de obtenção das nanopartículas através da metodologia sol-gel, têm sido realizados vários estudos com imobilização/veiculação de antibióticos com a finalidade de inativar micro-organismos sem afetar a integridade das células eucarióticas.

A utilização de fotossensibilizadores adsorvidos em nanopartículas de sílica em vez de antibióticos como agentes antimicrobianos está se destacando pelo fato de não ocasionar mecanismos de resistência, especialmente em bactérias. Além disso as nanopartículas de sílica são transparentes na janela terapêutica, ou seja, não apresentam absorção de luz na faixa do visível, embora provoquem o seu espalhamento (Chatterjee, F, 2008). Assim abrem-se caminhos para os estudos que envolve a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana, com uso de fotossensibilizadores veiculados/adsorvidos em nanopartículas de sílica.

1.3 Terapia Fotodinâmica e a Inativação de Bactérias Gram-negativas

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um processo de fotoinativação que envolve a combinação de corantes de baixa toxicidade conhecidos como fotossensibilizadores, oxigênio molecular e baixas doses de luz visível em um comprimento de onda adequado para a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o oxigênio singlete e radicais hidroxila que são capazes de matar bactérias (Perussi, J.R, 2007).

O tratamento por TFD consiste de quatro etapas, sendo elas: 1) aplicação; 2) acumulação; 3) ativação com luz e 4) fotoinativação – morte celular (Charttejee, 2008) e é indicado para doenças que envolvam o crescimento anômalo de tecidos, fungos e bactérias.

Em 1988, foram iniciadas as investigações que demonstraram a fotodeterioração de *E. coli*, sugerindo que a oxidação direta da coenzima-A (Co-A) intracelular, age como uma coenzima em acetilações biológicas, resultando na inibição da atividade respiratória, levando a célula à morte. Esses resultados sugerem que os processos fotocatalíticos induzem estresse oxidativo direto para os componentes bacterianos. Tempos depois, através da microscopia eletrônica de transmissão, a destruição da bactéria por espécies reativas de oxigênio, foi demonstrada ser iniciada através da fuga intracelular rápida de íons K^+ , liberando lentamente proteínas e RNA, seguido da ruptura celular (Rémy, et al 2011).

Para a aplicação da TFD no processo de inativação de bactérias é necessário padronizar concentração de fotossensibilizadores e doses de luz devido à diferença na suscetibilidade entre espécies nas duas classificações bacterianas que é explicada pela sua fisiologia (Perussi, J. R. e Imasato, 2008). De maneira geral, a literatura mostra que as bactérias Gram-positivas podem ser eliminadas por vários fotossensibilizadores e por doses mais baixas de irradiação do que bactérias Gram-negativas (Melo, W. C. e Perussi, J. R, 2012).

De acordo com Kussovski et al, a maior eficiência da TFD sobre Gram-positivas é explicada devido à sua fisiologia ser mais simples em comparação com Gram-negativas. As Gram-positivas apresentam a parede celular relativamente mais porosa permitindo que o FS alcance a membrana citoplasmática. Por outro lado, as Gram-negativas apresentam uma complexidade mais acentuada, pois além da parede celular, há uma membrana externa com lipopolissacarídeos carregados negativamente, lipoproteínas e proteínas com função de porinas,

fazendo com que haja maior dificuldade para a incorporação do FS. A estrutura pode ser vista pela fig 4.

Figura 4: Representação da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Fonte: Yin, 2013 adaptado pelo autor.

1.4 Processos Fotodinâmicos

O efeito fotodinâmico é explicado por dois mecanismos, o Tipo I e o Tipo II, resumidos na fig. 5 pelo diagrama de Jablonski.

Figura 5: Representação do Diagrama de Jablonski.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após absorver um fóton, a molécula do FS passa do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_1). No estado excitado o FS pode retornar ao estado fundamental emitindo um fóton de energia através de processos radioativos (fluorescência) e não radioativos (relaxações vibracionais) ou pode ainda inverter seu spin espontaneamente através do processo de cruzamento entre sistemas e passar do estado S_1 para o estado tripleto (T_1). O T_1 pode sofrer decaimento para o estado fundamental através de processos radioativos (fosforescência) e não radioativos (relaxações vibracionais) (Lima, A.M 2013 e Crutchley et al, 2002).

O mecanismo Tipo I envolve a participação do FS em reações de transferência de elétrons entre a molécula do FS no seu estado excitado S_1 ou T_1 e o substrato, resultando na formação de íons radicais que tendem a reagir instantaneamente com o oxigênio molecular, produzindo uma mistura de intermediários de oxigênio altamente reativos como o radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas. As reações do mecanismo tipo I podem ser vistas abaixo, através das Equações 4, 5 e 6 (Perussi, J.R, 2007).

O mecanismo Tipo II apresenta reações de transferência de energia (Equações 7 e 8) entre o FS no estado T_1 e o oxigênio molecular, cujo estado fundamental também é tripleto. Essas reações levam à formação de oxigênio singleto, uma espécie capaz de oxidar os constituintes e organelas celulares resultando na morte das células (Silva et al, 2007 e Tanielian, C. et al, 2000).

1.5 Agentes Fotossensibilizantes

Agentes fotossensibilizantes ou fotossensibilizadores (FS) são moléculas coloridas que apresentam grupos cromóforos que fazem com que as substâncias tornem-se ativadas pela absorção de radiação eletromagnética. Esse composto, quando excitado, interage diretamente com um substrato ou propicia a formação de oxigênio singleto e/ou radicais que agem destruindo os tecidos biológicos (Perussi, 2008).

Os FSs estão classificados em primeira, segunda e terceira geração. Os de primeira geração são derivados de hematoporfirina, os de segunda geração abrangem as clorinas, bacterioclorinas, benzoporfirinas, ftalocianinas, naftalocianinas, purpurinas e hipericina (Ortel et al, 2009). Os de terceira geração representam os fotossensibilizadores que são transportados por diversos suportes, como: micelas, lipossomos, dendrímeros, nanopartículas poliméricas, metálicas, cerâmicas entre outros (Bae, B.C e Na, K, 2012).

O FS é uma substância que induz a sensibilidade luminosa a processos químicos e/ ou físicos, normalmente insensíveis à luz. Grande parte dos fotossensibilizadores apresentam um anel heterocíclico semelhante à clorofila e ao grupamento heme da hemoglobina. Os fótons são

absorvidos na banda do espectro eletromagnético de absorção característica dos fotossensibilizadores, podendo transferir essa energia a outras moléculas, especialmente ao oxigênio molecular que resultará na liberação de espécies energéticas de meia-vida curta, levando ao dano do sistema biológico envolvido (Hamblin, M. R, 2008).

A eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana para os diferentes micro-organismos depende tanto do tipo quanto da concentração do fotossensibilizador, além do modo exato de ação do fotossensibilizador que por sua vez, é influenciado pelo sítio de ação. O sítio de ação depende das características físico-químicas da interação célula-fotossensibilizador (Melo, W. C. M. e Perussi, J. R, 2012).

1.5.1 Azul de Metileno (AM)

É um FS catiônico, com dois picos de absorção máxima em 293 e 664 nm em solução aquosa (Fig. 3), havendo uma curvatura nessa última, correspondente à transição vibrônica. O AM apresenta baixa toxicidade e boa atividade fotodinâmica, com preço acessível. A síntese do azul de metileno (AM) foi descrita na literatura pela primeira vez em 1876 e desde então tem uma grande utilidade em processos variados (Santos, R.O, 2014 e Paula, L.F, 2010).

Figura 6: Estrutura Molecular do Azul de Metileno e seu espectro de absorção na região do visível.

Fonte: Espectro no visível de Azul de Metileno elaborado pelo autor e estrutura da molécula elaborada por Buck S.T.G 2009.

Nota-se através da estrutura molecular que o AM possui um átomo de nitrogênio no anel central que aceita prótons e dois átomos de nitrogênio que contribuem para a deslocalização da carga no cromóforo, estabilizando o cátion (Allinger, N.L 1978). O AM compõe a classe das

fenotiazinas, que são moléculas catiônicas com estrutura composta por um sistema de anel aromático tricíclico planar, sistema altamente conjugado, funcionando como cromóforo do composto. Essa característica classifica os fenotiazínicos como adequados para a utilização em TFD, com absorção intensa em 620-660 nm (Hussain et al, 2006).

Apesar de apresentar um rendimento quântico favorável, as concentrações de AM devem ser escolhidas e testadas com cautela, uma vez que ele pode agregar, reduzindo a geração de oxigênio singlete. Quando AM absorve energia, a molécula passa para o estado excitado singlete excitado. O relaxamento pode ocorrer por fluorescência ou por cruzamento intersistemas, gerando o estado excitado triplete e transferindo energia ao oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pelo mecanismo tipo II. No caso da molécula dimerizada (agregada), quando ocorre a excitação, ela decai através de um mecanismo radicalar, não gerando oxigênio singlete e sim radicais semi-reduzidos e semi-oxidativos de AM, pelo mecanismo tipo I (Vono, L, 2010).

Devido à natureza hidrofílica, baixa massa molecular e carga positiva, o AM consegue penetrar pelos canais de proteína-porina da membrana das bactérias gram-negativas (Wainwright, 2007 e 1997) já que há a necessidade da acumulação antes da irradiação (Machado, 2007).

1.5.2 Azul de Toluidina O

O azul de Toluidina O (ATO) também pertence à classe das fenotiazinas e sua absorção máxima é em 620-660 nm (Fig.7). É um FS com alto rendimento quântico de cruzamento-intersistemas, geração de oxigênio singlete e pode também produzir espécies radicalares em presença de agentes redutores (Graciano, T.B et al, 2014). O ATO, assim como o AM pode apresentar agregação, quando utilizado em altas concentrações. A agregação é denominada metacromasia, sendo relacionada com a variação pronunciada de sua banda de absorção no espectro visível, sendo diferentes para cada tipo de corante (Martinelli, 2006).

De acordo com D’Ilário et al 2006, o ATO agregado, é representado por três formas. A agregação H, que há um arranjo paralelo das moléculas formando uma pilha vertical. A agregação J que consiste em um arranjo “cabeça-calda” das moléculas, formando uma pilha

inclinada e também a agregação de Geometria intermediária, oblíqua, sendo observada uma divisão na banda, tanto azul quanto a banda do vermelho.

Figura 7: Estrutura Molecular do Azul de Toluidina O e seu espectro de absorção na região do visível.

Fonte: Espectro no visível do Azul de Toluidina obtido pelo autor e estrutura molécula, elaborada por Buck S.T.G 2009.

1.6 Otimização Matemática pelo Planejamento Composto Central

A utilização de modelos matemáticos em busca de condições ótimas para atingir um objetivo como inativar microrganismos nunca foi aplicada em estudos envolvendo a Terapia Fotodinâmica. A maioria dos experimentos são realizados de forma univariada em que os parâmetros envolvidos no processo são variados um por vez. A modelagem pelo planejamento composto central possibilita a variação multivariada dos parâmetros alternados simultaneamente levando a uma resposta objetiva, significativa, com menos experimentos e gastos (Montgomery, 2003).

Para a modelagem há a necessidade de análise de significância dos parâmetros envolvidos no processo através de um planejamento fatorial em que se extrai do estudo o máximo de informações úteis com menos quantidade de experimentos. Nele há a análise dos efeitos principais de cada parâmetro e de suas interações (Barros Neto, 2010).

O planejamento fatorial consiste de modelos lineares que são utilizados para indicar o caminho a se deslocar para obter as condições ótimas do estudo. Para a obtenção das superfícies de respostas (método matemático para obtenção do ponto ótimo) há a necessidade de modelos

que possam avaliar as interações de segunda ordem. No caso o modelo é chamado de planejamento composto central que é dividido em três partes: (1) fatorial; (2) axial e (3) ponto central. A primeira parte, a fatorial, se ajusta a um modelo linear o qual mostra o caminho para o qual se deve deslocar para chegar a uma região de maior interesse, ou seja, de melhor resposta. O ponto central avalia a curvatura da superfície sendo completado com os pontos axiais para encontrar a região ótima de superfície (Bezerra et al, 2008).

Essa análise fornece dados significativos obtidos através da modelagem matemática que, nesse estudo foi realizada empregando o software Statistica, facilitando a investigação em busca das melhores condições para qualquer tipo de estudo.

1.7 Importância da Veiculação de Fotossensibilizadores por Nanopartículas

Agentes fotossensibilizantes veiculados apresentam vantagens em relação à sua utilização em forma dispersa, uma vez que podem ser utilizados em solventes em que o fotossensibilizador é insolúvel e há seu transporte para localizações específicas. A interação do fotossensibilizador com um suporte sólido é explicado pela existência de ligações iônicas, troca iônica e ligação covalente entre o fotossensibilizador e o suporte, ou ainda apenas por forças de Van der Waals (Nakonechny et al, 2013).

Segundo Nakonechny, F, et al, 2013, entre a variabilidade de suportes para a veiculação de fotossensibilizadores, até o momento os mais estudados são: Poli (cloreto de estireno-co-vinilbenzilo), poli [(N-isopropilacrilamida)-co-(cloreto de vinilbenzilo)], poli [(sódio p-estirenosulfonato)-co-(cloreto de 4-vinilbenzil)], quitosana, gel e nanopartículas de sílica.

Dentre as diversas opções, as nanopartículas de sílica se destacam pela simplicidade do processo de fabricação, baixo custo em relação às outras nanopartículas como de ouro e de prata, facilidade na adsorção de substâncias fotossensíveis, além de serem transparentes às ondas eletromagnéticas favorecendo a utilização da TFD. Também são compatíveis com células eucarióticas, e tóxicas para micro-organismos sendo um ótimo suporte para veiculação de fotossensibilizadores a fim de erradicar infecções ocasionadas por micro-organismos.

Para a inativação de micro-organismos, as nanopartículas de sílica têm demonstrado um grande avanço, uma vez que há estudos recentes que demonstram a não toxicidade das npSi em células de mamíferos e alta toxicidade em bactérias, em presença e ausência de antimicrobianos (Capeletti, 2014). Pode-se ver pela fig. 8 a representação da interação entre as nanopartículas de sílica com a membrana externa de bactérias gram-negativas, através de ligações de hidrogênio pelos grupos hidroxila da superfície da sílica. Nota-se que não há interações com as células de mamíferos, o que é explicado pelas diferenças na estrutura das membranas. Devido à compatibilidade das npSi com células de mamíferos, há um interesse para utilização como veículos para o processo de erradicação de micro-organismos, utilizando fotossensibilizadores (Capeletti, 2014).

Figura 8: Interação entre nanopartículas de sílica com: (a) bactéria Gram-negativa e (b) células de mamíferos.

Fonte: Capeletti, 2014 adaptado pelo autor.

A importância da veiculação de FSs por nanopartículas, especialmente de sílica, objetivando a fotoinativação microbiológica é dividida por duas vertentes. Uma em que há a utilização de fotossensibilizadores em vez de antibióticos, desfavorecendo o processo natural de resistência microbiana, especialmente bactérias. E a outra em que há a utilização de nanopartículas de sílica que além de apresentarem um baixo custo e fácil fabricação, agem como veículos para o transporte dos fotossensibilizadores, sendo altamente tóxicas para bactérias gram-negativas e muito compatíveis com células de mamíferos (Capeletti, 2014).

Os antibióticos têm sido cada vez mais substituídos por outros agentes que podem erradicar micro-organismos sem favorecer mecanismos genéticos de resistência, como aquisição de um novo material genético por meio de bacteriófagos (transdução), incorporação

de DNA (transformação) ou aquisição de um plasmídeo (conjugação), assim, problemas como infecções e diversas doenças causadas por micro-organismos já resistentes são resolvidos pela utilização de agentes fotossensibilizantes (Dzidic, 2003).

Junto ao uso de agentes fotossensibilizantes, as nanopartículas de sílica agem formando agregados que podem perfurar a parede celular da *E. coli* e se concentrar em torno delas, tornando-as mais vulneráveis à TFD. A interação entre superfície de *E. coli* e as npSi podem induzir um estresse tornando-as menos resistentes a ataques externos (Benabbou et al, 2011).

Há estudos com vários tipos de nanopartículas, no caso nanopartículas de quitosana e prata foram utilizadas por Xiao, G. et al 2015, com TiO_2 , objetivando a inativação fotocatalítica da *E. coli* através da emissão de luz visível e foi obtida uma taxa de inativação superior a 99% em 2 horas de irradiação. A Figura 9 mostra a imagem obtida por Microscopia Eletrônica de Transmissão comprovando a deterioração da integridade celular da *E. coli* utilizando as nanopartículas. Em (a) nota-se a parede celular íntegra; (b) 60 minutos de contato e irradiação, a integridade celular começa a se desfazer; (c) Após 120 minutos e (d) 180 min de irradiação, é notado a perda total da integridade celular.

Figura 9: Microscopia Eletrônica de Transmissão de *E. coli* após tratamento com nanopartículas para diferentes tempos: (a) 0 min. (b) 60 min. (c) 120 min. (d) 180 min.

Fonte: Xiao, G. et al 2015.

Mesquita, M. et al, 2014, imobilizou clorina catiônica em dois materiais comerciais: (1) sílica funcionalizada com 3- bromopropil e (2) em resina Merrifield. A inativação de *E.coli* ocorreu com luz branca de potência $4,0 \text{ mW cm}^{-2}$ e a eficácia foi comprovada com redução de 3 log, mantendo a eficiência por três ciclos repetidos de fotoinativação.

Alves, E. et al, 2014 imobilizaram porfirina em um nano ímã com um núcleo de CoFe_2O_4 e avaliaram a capacidade de reciclagem da amostra. Os experimentos foram feitos

com potência de 40 Wm^{-2} e uma dose de luz total de 345 J cm^{-2} . O estudo destacou a fotoestabilidade dos compostos e a alta capacidade de fotoinativação de *E. coli*.

Magaraggia, M et al, 2013, utilizou uma porfirina anfifílica meso-substituída tetracatiônica encapsulada no interior de micropartículas de sílica. O conjugado apresentou estabilidade quando exposto à luz visível. Houve decréscimo do índice de sobrevivência da *E. coli* de 4 log em 30 minutos de irradiação.

O FS pode interagir com a superfície de nanopartículas de sílica de forma física ou química. Assim, há pesquisas utilizando nanopartículas de ouro, bem como a eficiência de azul de metileno e azul de toluidina interagindo com matriz polimérica como silicone e poliuretano (Perni, P, 2009 e 2011).

O primeiro estudo de FS imobilizado na superfície de nanopartículas foi feito por Bezman et al., imobilizando rose de bengala ligado em partículas de poliestireno, mostrando que quando exposto à luz branca, foi capaz de inativar *E. coli*. Também utilizou um derivado de porfirina ligado à superfície de ouro metálico e rose de bengala ligado à superfície de sílica mostrando eficiência na inativação de *S. epidermidis* (Bezman,B. et al 1978; Perni, 2011).

A utilização de sílica, como suporte de FS em suas diversas formas, seja em nano, micro ou meso-partículas, em filmes ou sílica com modificações na sua superfície, tem despertado curiosidade para o processo relacionado à TFD, uma vez que na maioria dos estudos são utilizados fotossensibilizadores dispersos em solução.

2. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Otimizar, pelo planejamento composto central, a fotoinativação dinâmica de *Escherichia coli*, utilizando azul de metileno e azul de toluidina dispersos e veiculados por nanopartículas de sílica. Como objetivos específicos têm-se:

- Otimizar o processo de fotoinativação de *E. coli* variando parâmetros como: (1) tempo de incubação; (2) dose de luz e (3) concentração de AM e ATO em solução;

- Otimizar o processo de fotoinativação de *E. coli* variando parâmetros como: (1) tempo de incubação; (2) dose de luz e (3) concentração de AM e ATO adsorvidos em nanopartículas de sílica sem retirada do excesso do fotossensibilizador adsorvido;
- Caracterizar as nanopartículas de sílica por: MEV, TGA, EDXRF e FTIR;
- Analisar a interação entre as nanopartículas de sílica com a *E. coli*, bem como sua influência no processo de fotoinativação.

3. METODOLOGIA

3.1 Nanopartículas de sílica

3.1.1 Preparo das nanopartículas de sílica

As nanopartículas de sílica foram preparadas através da metodologia Sol-Gel, pelo método de Stober, visando obter nanopartículas de tamanho inferior a 100 nm. Para o preparo, foram realizados os procedimentos de acordo com a Figura 10. A metodologia Stober permite a síntese de partículas monodispersas e esféricas que variam de 5-2000 nm. A reação de hidrólise do tetraortosilicato (TEOS) é ativada por hidróxido de amônia com água em álcool de baixa massa molar (Mebert, 2013).

Figura 10: Esquema ilustrativo da metodologia de preparação de nanopartículas de sílica pelo método Stober.

Fonte: elaborado pelo autor.

3.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Nanopartículas de Sílica

Para análise por MEV, uma pequena quantidade das nanopartículas de sílica foi dispersa no banho de ultrassom em 1 mL de água em microtubo por aproximadamente 1 h. Após a dispersão, com a ajuda de micropipeta, foram depositados na placa de silício, 30 μL da suspensão, com posterior retirada do excesso. Em seguida a amostra foi seca à temperatura ambiente e levada para o recobrimento com carbono para análise. As análises por MEV foram feitas em um Microscópio LEO modelo 440 da Central de Análises Químicas (CAQI) do IQSC/USP e também em um Microscópio ZEISS SIGMA equipado com canhão de elétrons por emissão de campo (MEV-FEG) do laboratório multiusuários do IFSC/USP. A MEV possibilita a análise do tamanho das nanopartículas e da homogeneidade do tamanho. Após a MEV, os tamanhos das npSi foram analisados e obtidos pelo software Image J, sendo em seguida o Origin 9 utilizado para construir o gráfico de distribuição normal do tamanho das npSi.

3.2 Fotossensibilizadores

3.2.1 Coeficiente de Absorção Molar dos Fotossensibilizadores

Para determinação do coeficiente de absorção molar do AM foram preparadas soluções de concentrações: 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,5 $\mu\text{g/mL}$ em tampão fosfato de sódio (PBS) $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e para o ATO: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10 $\mu\text{g/mL}$ também em PBS. Em seguida as amostras foram analisadas por espectroscopia de luz visível no espectrofotômetro HITACHI U-2800, utilizando-se cubeta de quartzo com duas faces polidas e caminho ótico de 1,0 cm.

3.2.2 Influência do pH no meio reacional

Estudos espectrofotométricos dos fotossensibilizadores em função do pH foram feitos utilizando soluções de AM e ATO de concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio (PBS) $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. O pH foi variado ~ 1 unidade, utilizando-se alíquotas de soluções estoque de HCl e NaOH em várias concentrações e tomando-se medidas espectroscópicas a cada variação de pH.

3.3 Cinética de adsorção dos fotossensibilizadores em nanopartículas de sílica

3.3.1 Processo de Adsorção

A adsorção pode ser física (fisissorção), que ocorre devido às forças de van der Waals ou forças eletrostáticas entre as moléculas do adsorbato e átomos que compõem a superfície do adsorvente. A adsorção também pode ser química, ocorrendo por interações químicas entre o fluido adsorvido e o sólido adsorvente, havendo transferência de elétrons de acordo com as ligações químicas entre o adsorbato e a superfície. No caso dos experimentos foram utilizados AM e ATO como adsorbatos e npSi como adsorvente, sendo o processo adsorptivo por fisissorção.

3.3.2 Experimento de Cinética de Adsorção

A cinética de adsorção é essencial para a compreensão da taxa de adsorção do adsorbato pelo adsorvente e todo o mecanismo do processo e são usualmente descritas pelos modelos de pseudo-primeira ordem (Lagergren, 1898); pseudo-segunda ordem (Ho et al., 1996) e difusão intrapartícula (Weber et al., 1963) para a maioria dos sistemas adsorvente-adsorbato (Bertolini et al 2011).

A cinética de adsorção de AM e ATO pelas npSi foi feita para estimar o tempo necessário para que ocorra a máxima adsorção sobre a superfície das npSi. Para esse propósito, os experimentos foram divididos em dois grupos. No grupo 1 foi estudada a cinética de adsorção utilizando 0,1 g de npSi com soluções de AM e ATO de 20 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O estudo da cinética fez-se necessário para saber o tempo ideal de contato do AM e ATO com as npSi para posterior experimentos *in vitro* de fotoinativação da *E. coli*, com as npSi dispersas em solução. Para o grupo 2, foi utilizado 0,2 g de npSi com soluções de AM e ATO de 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Esse estudo foi necessário também para avaliar o tempo necessário de contato do adsorbato com o adsorvente, no entanto, as npSi-AM/ATO foram posteriormente imobilizadas em filme, com o mesmo propósito de fotoinativação *in vitro* de *E. coli*.

1) Grupo 1: Foi disperso 0,1g de npSi em 10 mL de PBS durante 1 h, em banho de ultrassom, e em seguida foi misturado à 20 mL de solução de AM e ATO correspondendo à 20 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após a mistura, o pH foi ajustado à $\sim$ pH 7 com tampão HEPES 1 M e em seguida

submetido à agitação orbital a 300 rpm e temperatura a 28°C até o equilíbrio. Foram feitas medidas espectrofotométricas de 2 em 2 min até os 10 min de adsorção e após esse tempo, as medidas foram feitas de 10 em 10 minutos até 1h, sendo mensurado de hora em hora após esse período, até o equilíbrio.

2) Grupo 2: Foi disperso 0,2 g de npSi em 10 mL de PBS durante 1 h, em banho de ultrassom, e em seguida foi misturado à 20 mL de solução de AM e ATO correspondendo à 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após a mistura, os experimentos foram feitos exatamente iguais aos do grupo 1.

3.3.3 Ajuste ao Modelo de Pseudo-Primeira Ordem

O modelo de pseudo-primeira ordem se aplica à adsorção em sistema sólido/líquido baseando-se na capacidade de adsorção de um líquido em um sólido. Assim, para melhor análise, foi calculada a quantidade adsorvida pelo adsorvente através da Equação 9, em que q_e é a quantidade adsorvida pelo adsorvente ($\mu\text{mol g}^{-1}$); C_0 e C_t ($\mu\text{mol L}^{-1}$) são as concentrações do adsorbato no tempo inicial e no tempo t , respectivamente; V corresponde ao volume da solução (L) e m à massa do adsorvente utilizado (g).

$$q_e = \frac{(C_0 - C_t)V}{m} \quad (\text{Equação 9})$$

Para o ajuste ao modelo de pseudo-primeira ordem (Lagergren, 1898 e Karin A.H et al 2012) os resultados experimentais foram analisados ajustando-os através da Equação 10, em que q_e = quantidade adsorvida no equilíbrio ($\mu\text{mol g}^{-1}$); q = quantidade adsorvida durante um tempo t ($\mu\text{mol g}^{-1}$) e k_1 = a constante de velocidade de adsorção do modelo de Pseudo-Primeira ordem (min^{-1}). A constante k_1 foi calculada a partir da inclinação da reta do gráfico $\ln (q_e - q_t)$ em função de t .

$$\ln (q_e - q) = \ln q_e - k_1 t \quad (\text{Equação 10})$$

3.3.4 Ajuste ao Modelo de Pseudo-Segunda Ordem

Além do ajuste para o modelo de pseudo-primeira ordem, também foi feito o ajuste para o modelo de pseudo-segunda ordem (Ho et al., 1996 e Karin A.H et al 2012) através da Equação 11, em que q_e = quantidade adsorvida no equilíbrio ($\mu\text{mol g}^{-1}$) ; q = quantidade adsorvida durante um tempo t ($\mu\text{mol g}^{-1}$) e k_2 = a constante de velocidade de adsorção do modelo de pseudo-segunda ordem ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$). A constante de velocidade (k_2) e a quantidade adsorvida no equilíbrio (q_e) foram calculadas a partir da reta do gráfico de t/q em função de t , em que o q_e foi obtido pelo coeficiente angular e o k_2 pelo coeficiente linear.

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (\text{Equação 11})$$

Com a constante k_2 definida, foi feito o cálculo da velocidade inicial de adsorção h ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) para t_0 , através da Equação 12.

$$h = k_2 \times q_e^2 \quad (\text{Equação 12})$$

Os parâmetros cinéticos do processo de adsorção de ATO e AM sobre npSi foram obtidos pelas regressões lineares dos gráficos de cada modelo. A avaliação dos modelos foi realizada pela comparação dos coeficientes de correlação linear (R

3.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (FTIR)

Para a análise, foi utilizado o 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 de nanopartículas de sílica com e sem FS adsorvido 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 três tipos de amostras sendo elas: npSi; npSi-AM e npSi-ATO.

3.5 Análise Semi-Quantitativa por Fluorescência de Raios-X no Modo Dispersivo em Energia (EDXRF) das npSi

Com o objetivo de comprovar a presença de AM e ATO na superfície das nanopartículas de forma semi-quantitativa, bem como avaliar a proporção dos mesmos de uma concentração para outra, foi feita a EDXRF. A análise de EDXRF foi realizada na Central Analítica no Instituto de Química de São Carlos - USP e o equipamento utilizado foi o Espectrômetro de Bancada Minipal 4 da Panalytical, tubo emissor de raios X feito de Ródio (Rh) e a potência usada foi de 9W. Para essa finalidade foram dispersas 200 mg de nanopartículas de sílica em PBS durante 1 h e em seguida misturadas à solução de AM e ATO que corresponderiam às concentrações de 20, 50 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Em seguida, foi ajustado o pH para 7 com tampão HEPES 1 mol/L e foi mantida sob agitação orbital a 300 rpm em uma temperatura de 28°C por 2 h. Após a adsorção as amostras foram centrifugadas à 6000 rpm durante 10 min e foi descartado o sobrenadante. O procedimento foi repetido até a retirada completa de AM e ATO no sobrenadante. Por fim, as amostras permaneceram na estufa por 12 h a 50 °C para completa evaporação do solvente e posterior maceração, sendo colocadas no porta amostra (Figura 11a) e levados para o espectrofotômetro por fluorescência de raio-x (Figura 11b) que opera sob atmosfera de He com o tempo de análise de 90 min por amostra.

Figuras 11: (a) Porta amostra para análise de fluorescência por Raio-X e (b): Espectrofotômetro por Fluorescência de Raio-X.

Fonte: Fotografias obtidas pelo autor.

3.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A TGA foi realizada no Laboratório de Análise Térmica do IFSC-USP, com o equipamento de Modelo TG 209 – NETZSCH (Figura 12) sob atmosfera de He com variação de 10°C por min de 25 – 300°C com o objetivo de analisar semi-quantitativamente a degradação térmica das nanopartículas de sílica com AM e ATO adsorvido. Os procedimentos para preparo da amostra foram feitos de acordo com o item 3.5, sendo utilizados 10 mg de amostra para a análise.

Figura 12: Equipamento utilizado para análise termogravimétrica.

Fonte: Fotografia obtida pelo autor.

4. Experimentos Microbiológicos

4.1 Cultivo Microbiológico

Para o cultivo da *Escherichia coli* foi preparado meio de cultura Infusão de Cérebro-Coração (BHI) em água destilada e posteriormente foi autoclavado à 121°C por 15 minutos. Em seguida foi acrescentada uma alíquota de 1 mL da *E. coli* ATCC 25922 preservada em *ultra-freezer* a -72°C, à 30 mL de caldo BHI, sendo mantida por 12 h em estufa sob agitação a 300 rpm em aquecimento à 37°C. No dia seguinte o processo foi repetido utilizando uma alíquota da amostra guardada na estufa no dia anterior. Após esse repique foi necessário determinar a curva de crescimento do micro-organismo.

4.2 Curva de crescimento da *E. coli*

Para a curva de crescimento, foi feito o procedimento citado no item 4.1 e em seguida, foi retirada uma alíquota de 1 mL da amostra e acrescentou-se a 30 mL de caldo BHI, após a adição foram retirados 500 µL e analisados em um espectrofotômetro HITACHI U-2800 no comprimento de onda de 600 nm. As medidas espectrofotométricas foram feitas de hora em hora durante 24 h. Com a obtenção dos pontos para formar a curva de crescimento, aplicou-se a primeira derivada, a qual mostrou o tempo em que ocorreu o maior crescimento bacteriano.

4.3 Otimização da Inativação utilizando Planejamento Composto Central

Todos os experimentos de fotoinativação de *E. coli*, foram realizados com base em modelagens matemáticas, iniciando com o planejamento fatorial 2^3 sendo ajustado ao planejamento composto central, objetivando o mínimo de experimentos, tempo e gastos.

O planejamento fatorial 2^3 , é um modelo linear composto de três parâmetros (tempo de incubação, dose de luz e concentração do FS), que são os fatores que interferem na resposta objetivo, no caso, a minimização da sobrevivência de *E. coli*. Nesse modelo, cada parâmetro teve dois níveis que foram testados e avaliados de forma experimental, estatística e matemática. O ajuste desse modelo a um modelo mais complexo, visando a localização do ponto ótimo, iniciou-se com o acréscimo de pontos experimentais, como pontos centrais e pontos axiais. No entanto para chegar ao acréscimo desses pontos, houve a necessidade de encontrar uma região em que a resposta objetivo foi a mínima possível, assim, nessa região, foi realizado um novo planejamento fatorial 2^3 , juntamente com o acréscimo dos pontos centrais e axiais, tornando-se o modelo de composto central (Montgomery, 2003), a fig. 13 representa como foi feito o processo de otimização. Para todos os experimentos foram feitas análise de variância para confirmar o ajuste ao modelo.

Figura 13: Otimização da fotoinativação do biofilme multiespécies utilizando modelos matemáticos, sendo os parâmetros (Ti): tempo de incubação; (C): concentração do FS e (DL): Dose de Luz.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Preparação para Fotoinativação de *E. coli*

4.4.1 Preparo de solução dos FSs

Para a fotoinativação de *E. coli* utilizando AM e ATO dispersos em solução foram primeiramente preparadas soluções de AM e ATO na concentração $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ solubilizada em PBS, utilizando o banho de ultrassom por 1 h. Após a solubilização, a amostra foi esterilizada por filtração utilizando membrana Milipore de $0,22 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo armazenada sob refrigeração a -4°C .

4.4.2 Preparo da Suspensão de npSi

Para preparar a suspensão de npSi, foram pesadas 0,2 g dispersas em 25 mL de PBS sob sonicação durante 1 h, ajustando o pH para aproximadamente 7, seguida de esterilização em

autoclave a 121° C por 15 min. Em seguida foram preparadas as suspensões utilizadas para o processo de fotoinativação *in vitro* de *E. coli* utilizando npSi dispersas em solução, misturando 1 mL de PSB para cada 1 mL de npSi dispersas em PBS. A amostra foi mantida à temperatura ambiente até o uso.

4.4.3 Preparo da suspensão de *E. coli*

A suspensão de *E. coli* foi preparada após prévia definição da absorbância com Densidade ótica de 600 nm que corresponderia a 1×10^7 células UFC por mL. Para essa quantidade de unidade formadora de colônia a absorbância obtida foi de 0,500. Assim, para o preparo da suspensão foi realizado o cultivo descrito pelo item 4.1, porém ao invés de congelar, a amostra foi centrifugada a 1300 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e a amostra foi ressuspendida por três vezes com PBS. Em seguida a amostra foi analisada por espectrofotometria de luz visível com comprimento de onda de 600 nm, ajustando a absorbância até 0,500.

4.4.4 Quantificação de *E. coli*

Com o objetivo de obter dados quantitativos da sobrevivência de *E. coli* após os tratamentos fotodinâmicos, foi realizado o método de contagem de colônias por placa de ágar BHI. Nessa metodologia 100 µL da amostra, após os experimentos, são submetidos a uma diluição seriada em PBS sendo as diluições 10^{-4} ; 10^{-5} e 10^{-6} plaqueadas em BHI e mantidas na estufa à 37°C por 12 h. Em seguida foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia presentes no ágar. O cálculo para obter a quantidade de UFC na amostra retirada após o experimento foi feito através da Equação 13.

$$\text{UFC} = \frac{\text{Número de Colônias} \times 100 \mu\text{L}}{\text{Fator de Diluição}} \quad (\text{Equação 13})$$

4.4.5 Fonte de Luz Utilizada

Para o procedimento de fotoinativação, a fonte de luz utilizada foi um Biotable (Fig. 14) consistindo de uma série de LEDs brancos de intensidade luminosa de $30 \pm 10 \text{ mW cm}^{-2}$. O tempo necessário de irradiação para cada dose foi calculado através da Equação 14.

$$\text{Dose de Luz} = \frac{\text{Potência}_{(\text{mW cm}^{-2})} \times \text{Tempo}_{(\text{s})}}{1000} \quad (\text{Equação 14})$$

Figura 14: Biotable com um série de LEDs brancos.

4.5 Experimentos de Fotoinativação de *E. coli*

O processo de fotoinativação de *E. coli* foi estudado através de dois tipos de experimentos:

- 1) Uso de AM e ATO disperso em solução;
- 2) AM e ATO adsorvidos na superfície de npSi sem retirar excesso disperso em solução.

Para AM e ATO dispersos em solução e AM e ATO adsorvidos na superfície de npSi sem retirar o excesso da quantidade não adsorvida, foi feita uma comparação utilizando os mesmos parâmetros para avaliar a influência da presença das npSi.

4.5.1 Fotoinativação com AM e ATO em solução

Após a definição dos pontos, os experimentos foram realizados em triplicata utilizando a interação entre os níveis dos parâmetros. Para o experimento foram definidos quatro grupos:

- 1) **Grupo Controle:** Experimento sem tratamento. Para a realização foi colocado 100 µL da suspensão de *E. coli* + 100 µL de PBS sendo em seguida a amostra diluída e plaqueada em ágar BHI para posterior quantificação.
- 2) **Grupo Escuro:** Para avaliar a toxicidade do AM e ATO sem presença de irradiação, 100 µL da suspensão de *E. coli* + 100 µL da solução de FS foram mantidas incubadas no escuro em placas de 96 poços.
- 3) **Grupo Luz:** Para avaliar a toxicidade da luz para a bactéria, sem presença de AM e ATO, 100 µL da suspensão de *E. coli* + 100 µL de PBS foram irradiados em placas de 96 poços.
- 4) **Grupo Inativação Fotodinâmica:** Para avaliar a fotoinativação foi utilizado 100 µL de suspensão de *E. coli* + 100 µL de solução de AM e 100 µL de suspensão de *E. coli* + 100 µL de solução de ATO foram incubadas em placas de 96 poços.

4.5.2 Fotoinativação com AM e ATO Adsorvidos em npSi sem retirada de excesso não adsorvido

Para a fotoinativação de *E. coli* utilizando npSi com AM e ATO adsorvido sem retirada do excesso não adsorvido, foram realizados os mesmos experimentos citados no item 4.5.1. A diferença é que as npSi estavam presentes na solução de FSs. Para isso, as soluções de AM e ATO foram preparadas/diluídas em PBS com presença de npSi previamente dispersas e diluídas. Enquanto que a solução de FSs para o experimento de fotoinativação com FS disperso em solução, foram preparadas apenas em PBS, para o experimento desse item, as soluções dos FSs foram preparadas/diluídas em suspensão de PBS com npSi dispersas e diluídas. Após os experimentos serem realizados nas mesmas condições acima, foi feita uma comparação para analisar a influência da presença de npSi no processo de fotoinativação.

Através dos experimentos foi possível avaliar os efeitos de cada parâmetro bem como a interação entre eles e determinar o ponto ótimo de inativação.

4.6 Análise da interação bactéria/npSi por MEV

Para o preparo das lâminas foi colocado, sobre lâminas de vidro 1x1 cm previamente lavadas com detergente e água destilada, duas gotas da amostra npSi-FS + *E. coli*. Em seguida foi acrescentado glutaraldeído 2,5% para fixação da amostra sobre a lâmina, deixando por 1 h. A segunda etapa compreendeu a lavagem com uma solução de álcool etílico à 10, 25, 50, 75, 90 e 100% durante 20 minutos cada. Após este procedimento os substratos foram levados para a preparação da análise de MEV.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Nanopartículas de sílica

5.1.1 Análise do Tamanho das npSi por MEV

As npSi preparadas pelo método de Stober foram analisadas por MEV (Fig. 15 e 16). Pode-se observar que as partículas obtidas apresentam homogeneidade no tamanho, podendo ser vista na forma não aglomerada e aglomerada (Fig. 15 e 16). A curva de distribuição normal dos tamanhos das npSi foi obtida através do Software Image J e Origin 9. No Image J foi feita a mensuração do tamanho das npSi, com os dados obtidos, através do Origin 9, foi feito o histograma de distribuição normal dos tamanhos. A média do tamanho das npSi e o desvio padrão foi calculado pelo Microsoft Excel. Analisando a Figura 15, o tamanho médio, bem como o desvio padrão do tamanho das partículas foi definido como $74,3 \pm 6,9$ nm. Na Figura 16, as npSi apresentam média e desvio padrão de $73,8 \pm 6,4$ nm.

Figura 15: (a) Imagem de MEV de npSi preparadas com precursor TEOS, pelo método de Stober, sem aglomerados e (b) distribuição normal do tamanho das nanopartículas obtidas. Imagem feita por um Microscópio LEO modelo 440 com magnitude de 60,00 KX.

Figura 16: (a) Imagens de MEV de npSi preparadas com precursor TEOS, pelo método de Stober, com aglomerados e (b) distribuição normal do tamanho das npSi. Imagem feita por um Microscópio ZEISS modelo SIGMA, com magnitude de 290,00 KX.

5.2 Fotossensibilizadores

5.2.1 Coeficiente de Absorção Molar do AM e ATO

Os coeficientes de absorção molar do AM e ATO foram definidos em tampão PBS, a Figura 17(a) mostra os espectros obtidos no visível do AM bem com o ajuste linear dos dados

experimentais -17(b)- e a Figura 18(a) representa os espectros do ATO e 18(b) o ajuste linear aos dados experimentais obtidos. Para determinar o coeficiente de absorção molar, foi feito o ajuste utilizando-se o comprimento de máxima absorção. O coeficiente de absorção molar (ϵ) está associado com as transições eletrônicas, vibracionais ou rotacionais de cada amostra, sendo descrito como a capacidade que 1 mol de substância tem em absorver luz a um dado comprimento de onda, por um caminho ótico de 1 cm (Skoog et al, 2006).

Para o AM o comprimento de onda de máxima absorção foi 664 nm e a linearização do gráfico da concentração versus absorbância (Fig. 17) determinou o valor de $\epsilon_{664} = 8,0 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o AM em PBS, com coeficiente de correlação 99,8%. O coeficiente de absorção molar do AM em água foi condizente com os dados da literatura obtidos por Vono, 2010, sendo o $\epsilon_{664} = 7,57 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e também por Ormond, 2013, sendo o $\epsilon_{664} = 8,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 17: a) Espectros de absorção molar do AM em PBS, nas concentrações de: 1 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5 $\mu\text{g/mL}$ e b) Curva de calibração para o AM para determinação do coeficiente de absorção molar obtida pela regressão linear dos pontos experimentais.

Para o ATO, o comprimento de onda de máxima absorção foi 624 nm e a linearização do gráfico da concentração versus absorbância (Fig. 18) determinou o valor de $\epsilon_{624} = 3,4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o ATO em PBS (coeficiente de correlação 99,9%). Os resultados também mostraram ser condizentes com os dados da literatura: Ormond, 2013 determinou $\epsilon = 5,1 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e Alves, 2014 obteve $\epsilon = 3 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Figura 18: a) Espectros de absorção molar do ATO em PBS, nas concentrações de: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10,0 µg/mL e b) Curva de calibração para o ATO para determinação do coeficiente de absorção molar.

5.2.2 Influência da alteração do pH

A estrutura planar e a área superficial dos FSs em meio aquoso pode favorecer a agregação devido à distribuição de cargas e assim, pelo pH (Rubires R, 1999). Sendo assim, foi monitorada a variação do espectro do AM e ATO variando o pH do meio reacional.

A Figura 19 ilustra os espectros de absorção em PBS do AM em função do pH. Nota-se que no pH 0,54 e 1,07 há a presença de bandas protonadas do AM, apresentando uma banda em 744 nm (pH 0,54) e a 747 nm (pH 1,07). Ao aumentar o pH da solução, é visto que a intensidade das bandas aumentou até o pH 4 (curva de cor azul escuro), sendo observadas duas bandas intensas. Em pHs maiores que 4 as curvas apresentam um comportamento semelhante, porém com diminuição de energia das bandas.

Figura 19: Espectros de absorção do AM em PBS em função do pH.

A Figura 20, ilustra os espectros de absorção em PBS do ATO em função do pH. Nota-se que o ATO se degrada, formando outra espécie, quando em $\text{pH} > 12$. No pH de 10,08 a 11,06 a banda apresenta uma diminuição da sua intensidade, no entanto ocorre aumento da intensidade da banda na faixa de pH entre 2,08 a 4,86.

Figura 20: Espectros de absorção do ATO em PBS em função do pH.

5.3 Cinética de Adsorção

5.3.1 Cinética de Adsorção do AM e ATO por npSi

As Figuras 21 e 22 apresentam as cinéticas comparativas de adsorção de AM e ATO por npSi em diferentes concentrações de AM e ATO: 20, 50, 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em que o eixo Y primário é referente às concentrações de 20 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (utilizando 0,1 g de npSi) e o eixo Y secundário, refere-se a 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (utilizando 0,2 g de npSi).

Figura 21: Adsorção do AM nas concentrações: 20, 50, 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por npSi.

Figura 22: Adsorção do ATO nas concentrações: 20, 50, 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ por npSi.

Nota-se que o equilíbrio atingido no processo de adsorção apresenta tempos diferentes em relação à concentração do AM e ATO, bem como à quantidade em massa do adsorvente. Para o AM na concentração inicial de 20 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com 0,1 g de npSi, o equilíbrio é atingido em 240 min, enquanto que para 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com 0,2 g de npSi, ocorre em 120 min. Para o ATO na concentração inicial de 20 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com 0,1g npSi, o equilíbrio é atingido em 180 min, enquanto que para 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com 0,2g de npSi, ocorre em 120 e 60 min, respectivamente.

Ocorre uma adsorção instantânea logo após o contato do adsorvente com o adsorbato, em seguida o processo se torna mais lento, até o equilíbrio. Segundo Skoog et al, quando se aumenta a concentração de um reagente a velocidade da reação para a formação do produto se

torna mais rápida, o que pode explicar a adsorção mais rápida do AM e ATO pelas npSi em concentrações mais altas. A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração dos reagentes, ao se aumentar a concentração do AM e ATO o equilíbrio se desloca no sentido de consumi-los, sendo deslocado para o lado contrário ao aumento, ou seja, ao processo adsorptivo. Isso é explicado pela Lei de Ação das Massas de Guldberg e Waage (Skoog et al, 2006).

Quando o AM e ATO presente em solução atinge a superfície das npSi, a força residual resultante do desequilíbrio das forças de van der Waals que age na superfície das npSi, cria um campo de forças que atrai e aprisiona as moléculas do AM e ATO. O tempo em que o AM e ATO permanece ligado à superfície das npSi depende da energia com que a molécula é presa, resumindo, na relação entre a força exercida das npSi sobre o AM e ATO e as forças de campo entre moléculas vizinhas. A rápida adsorção do AM e ATO pelas npSi é explicada por um mecanismo de fisissorção, em que a adsorção ocorre por diferenças de energia e/ou forças atrativas de van der Waals, apesar dessas interações terem um longo alcance, elas são consideradas fracas e o equilíbrio é estabelecido rapidamente. A interação entre npSi-AM/ATO é simplesmente eletrostática.

Observa-se que com o aumento da concentração do AM e ATO de 20 para 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 g npSi e de 100 para 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,2 g npSi, aumenta-se a quantidade em mol adsorvida pela superfície das npSi, sendo adsorvida maior quantidade de ATO em relação ao AM. Utilizando-se a Equação 9, os valores adsorvidos em μmol de AM e ATO por 0,1 e 0,2 g de npSi foram calculados como pode-se observar na Tabela 1.

Tabela 1: Valores adsorvidos do AM e ATO em função da concentração, por quantidade em massa de npSi.

Concentração AM e ATO ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	20	50	100	1000
Massa npSi (g)	0,1	0,1	0,2	0,2
Quantidade adsorvida ($\mu\text{mol de AM}$) e %	2,8119 14%	7,4340 15%	9,7795 9,8%	67,531 6,8%
Quantidade adsorvida ($\mu\text{mol de ATO}$) e %	2,0229 10%	10,2257 20%	10,7110 11%	97,8676 9,8%

Com os dados cinéticos experimentais, foi analisado se há um ajuste ao modelo de Pseudo-primeira ordem ou Pseudo-segunda ordem. Para a análise foram utilizadas as Equações 10 e 11. As Figuras de 23 a 26 representam o ajuste aos modelos de Pseudo-primeira e Pseudo-segunda ordem para AM nas concentrações de 20, 50, 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 23: Dados experimentais utilizando 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: **a)** Pseudo –primeira ordem e **b)** Pseudo-segunda ordem.

Figura 24: Dados experimentais utilizando 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: **a)** Pseudo –primeira ordem e **b)** Pseudo-segunda ordem.

Figura 25: Dados experimentais utilizando 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: **a)** Pseudo –primeira ordem e **b)** Pseudo-segunda ordem.

Figura 26: Dados experimentais utilizando 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: **a)** Pseudo –primeira ordem e **b)** Pseudo-segunda ordem.

As Figuras de 27 a 30 representam o ajuste aos modelos de Pseudo-primeira e Pseudo-segunda ordem para ATO nas concentrações de 20, 50, 100 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 27: Dados experimentais utilizando 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: **a)** Pseudo –primeira ordem e **b)** Pseudo-segunda ordem.

Figura 28: Dados experimentais utilizando $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: **a)** Pseudo –primeira ordem **b)** Pseudo-segunda ordem.

Figura 29: Dados experimentais utilizando $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: **a)** Pseudo –primeira ordem **b)** Pseudo-segunda ordem.

Figura 30: Dados experimentais utilizando $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AM ajustados ao modelo: **a)** Pseudo –primeira ordem **b)** Pseudo-segunda ordem.

Como pode-se observar, os dados experimentais não se ajustam à uma cinética de Pseudo-Primeira ordem, resultando em baixos coeficientes de determinação para o AM e ATO em todas as concentrações e quantidades em massa das npSi.

Os dados cinéticos resultaram em valores altos de R^2 para o modelo de Pseudo-Segunda ordem para o AM e ATO em todas as concentrações, apresentando boa linearidade. O modelo de Pseudo-Segunda ordem também foi confirmado devido à proximidade obtida entre os valores de Q_e determinado experimentalmente e os valores de Q_e calculados pelo modelo. Os valores de Q_e calculado e Q_e experimental de ambos os modelos para o AM e ATO, bem como as constantes de velocidades estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos de adsorção de AM e ATO sobre npSi para o modelo de Pseudo-Segunda Ordem.

Adsorbato ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Massa Adsorvente (g)	k_2 (min^{-1})	Q_e Experimental ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	Q_e Calculado ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	h ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}$)	R^2
AM 20	0,1	0,2098	2,8118	2,8332	1,6586	0,9982
AM 50	0,1	0,1132	7,4340	7,0175	6,2555	0,9994
AM 100	0,2	0,1986	9,7795	9,7656	18,9933	0,9999
AM 1000	0,2	0,0131	67,5312	67,5312	59,8158	0,9994
ATO 20	0,1	0,9404	2,0229	2,0234	3,8452	0,9999
ATO 50	0,1	0,4251	10,2257	10,2249	44,4513	0,9999
ATO 100	0,2	0,1955	10,7110	10,6724	22,4334	0,9998
ATO 1000	0,2	0,0183	97,8676	98,0392	174,8251	0,999

Nota-se que com o aumento da concentração de 20 para 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 0,1 g npSi houve um aumento da quantidade adsorvida (Q_e) de 2,811 para 7,434 ($\mu\text{mol g}^{-1}$) para o AM e para o ATO de 2,022 para 10, 225 ($\mu\text{mol g}^{-1}$). Também foi observado o aumento de Q_e quando a concentração passa de 100 para 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, apresentando um Q_e de 9,779 e 67,531 ($\mu\text{mol g}^{-1}$) para o AM em 0,2 g npSi, e para o ATO de 10,711 para 97,87 ($\mu\text{mol g}^{-1}$). Quanto à constante k_2 , há uma diminuição quando há aumento da concentração de AM e ATO, sendo totalmente dependente da concentração.

Quando há aumento da concentração de AM e ATO é de se esperar que a velocidade da reação para a formação do produto npSi-AM/ATO se torne mais rápida, o que condiz com os resultados obtidos. Com o aumento da concentração houve diminuição da constante de velocidade k_2 , e conseqüentemente, houve uma velocidade de adsorção maior.

Segundo Skoog et al, a reação de pseudo ordem é prevista quando, a concentração de um dos reagentes é muito maior do que a concentração de outros reagentes envolvidos na reação. No caso a concentração das npSi é mais elevada que a concentração do AM e ATO, mesmo nas concentrações mais elevadas. O modelo de Pseudo-Segunda ordem é considerado um modelo empírico, não apresentando um significado físico, porém é muito utilizado na literatura. Devido ao ajuste, o modelo de Pseudo-segunda ordem foi o utilizado para representar o processo cinético de adsorção para ambos os corantes.

5.4 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho

A Espectroscopia Vibracional no Infravermelho foi empregada para identificar a diferença estrutural de npSi pura e com AM e ATO adsorvida na superfície. A técnica baseia-se na observação de que ligações químicas apresentam frequências específicas as quais vibram a níveis de energias bem definidos. As frequências são determinadas pelos níveis de energia, massa do átomo e frequências de vibração. Na Figura 31, pode ser visto que antes e depois da adsorção de AM e ATO, as amostras exibiram picos nas bandas atribuídas à flexão Si-O-Si (472 cm^{-1}), estiramento simétrico de Si-O-Si (800 cm^{-1}), grupos externos a Si-O (955 cm^{-1}), alongamento assimétrico Si-O-Si (1104 cm^{-1}), moléculas de água retidas pelas npSi (1650 cm^{-1}) e alongamento do grupo -OH (3460 cm^{-1}) (Singh, 2011).

Após a adsorção de AM e ATO, houve intensidade aumentada de todos os modos de vibração Si-O. Em 1104 cm^{-1} houve um aumento da intensidade, sugerindo a existência de forte interação Si-O-Si em presença de moléculas diferentes. As bandas entre 1550 a 1350 cm^{-1} surgem após o processo de adsorção, correspondendo às ligações C=C aromática e ligações aromáticas C-N (Karim, 2012).

Figura 31: Espectros de transmitância de npSi pura, npSi-AM e npSi-ATO no infravermelho.

5.5 Análise Semi-Quantitativa por Fluorescência de Raios-X no Modo Dispersivo em Energia (EDXRF) das npSi

De acordo com Skoog, quando os elétrons da camada mais interna do átomo interagem com fótons com energia na região dos raios-X, pode ocorrer a foto ejeção desses elétrons, criando-se uma vacância. Para manter a estabilidade, há o preenchimento das vagas por elétrons das camadas mais próximas. O resultado é o excesso de energia no processo, sendo manifestado na forma de linhas espectrais e energias características do elemento, sendo as intensidades relacionadas com a concentração.

A análise foi feita em três amostras: npSi, npSi-AM e npSi-ATO. Os resultados das porcentagens dos componentes encontram-se na Tabela 3. Nota-se que há um aumento na porcentagem de S de acordo com o aumento da concentração em amostras com AM e ATO adsorvido. Devido à baixa concentração adsorvida na superfície das npSi, há uma baixa quantidade de S quantificada pela técnica. Isso se deve ao fato de que em cada molécula de

AM, há apenas um átomo de S, correspondendo a apenas 10,025% de sua massa total. O mesmo ocorre com o ATO, em que S representa apenas 11,860% de sua massa total.

Tabela 3: Resultados da quantificação em porcentagem de S pela técnica EDXRF.

AMOSTRAS	Média $\pm$ DP
npSi	-
npSi-AM 20	0,149 $\pm$ 0,030
npSi-AM 50	0,158 $\pm$ 0,021
npSi-AM 1000	0,187 $\pm$ 0,031
npSi-ATO 20	0,144 $\pm$ 0,023
npSi-ATO 50	0,161 $\pm$ 0,020
npSi-ATO 1000	0,199 $\pm$ 0,018

5.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica das amostras: npSi, npSi-AM e npSi-ATO é apresentada na Figura 34. É possível notar que na temperatura final de 300°C, as npSi-AM e npSi-ATO apresentam uma perda de massa maior em comparação com as npSi sem FS adsorvido. Essa perda de massa é referente ao AM e ATO adsorvido na superfície da npSi. As perdas de massa iniciam logo no início do aquecimento, havendo a maior perda de massa em temperatura inferior a 150 °C. Pode-se atribuir essa perda de massa inicial, ao processo de desidratação das amostras.

Analisando a curva de perda de massa de npSi-AM, nota-se que ocorre uma degradação mais acentuada em relação às npSi, à 95°C, podendo ser o marco do início da degradação do AM. Já para o ATO, a degradação se inicia em torno dos 180°C. De acordo com Januário et al 1997, os grupos alcóxido não hidrolisados do TEOS, no preparo das npSi, são degradados a partir de 300 °C e a partir de 600 °C há uma perda de massa referente à desidroxilação e condensação dos grupos silanóis.

Figura 32: Curva de degradação térmica de npSi, npSi-AM e npSi-ATO.

6. Experimentos Microbiológicos

6.1 Curva de crescimento da *E. coli*

A curva de crescimento da *E. coli* (Figura 33) foi feita objetivando conhecer a duração das diversas fases de crescimento dessas bactérias. De acordo com a curva pode-se observar que de 0 a 3 h a *E. coli* está na fase lag, na qual ainda está em adaptação metabólica ao novo ambiente. A nova fase, a log, inicia-se após 3 h, nesse momento os micro-organismos estão com divisão máxima, sendo o número de população dobrado a cada geração. Após 7 h há ainda o crescimento, porém não em escala log, iniciando a fase estacionária em 20 h, devido à escassez de nutrientes e/ou acúmulo de metabólitos (Tortora, 2005).

Ainda na Figura 33, pode ser visto a aplicação da primeira derivada, em que se observa o pico que inicia o crescimento na fase log da *E. coli*, em 3 h, em que se tem a certeza que a mesma se encontra em plena atividade metabólica.

Figura 33: Curva de crescimento da *E. coli* em meio BHI e a representação da primeira derivada no tempo da curva de crescimento.

Fonte: elaborada pelo autor

6.2 Experimentos de Fotoinativação de *E. coli*

Inicialmente foi testada a citotoxicidade do AM e ATO em solução para a *E. coli* sem presença de luz. Pelos resultados comparando ao grupo controle (1×10^7 UFC mL⁻¹), nota-se que ambos em solução, sem presença de irradiação com concentração de 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 16 min de tempo de incubação, apresentaram citotoxicidade, ou seja, houve alteração na quantidade em log de UFC mL⁻¹, decaindo 0,5 e 0,3 em comparação ao controle.

Quanto ao grupo luz, constata-se que não houve decréscimo em log UFC mL⁻¹ quando a *E. coli* foi submetida a diferentes doses de irradiação, não apresentando toxicidade. Isso se deve ao fato de que a mesma não apresenta produção de porfirinas endógenas como ocorre em outros micro-organismos como, por exemplo, a *Propionibacterium acnes* (Ashkenaki, 2003).

6.2.1 Fotoinativação com AM e ATO em Solução – Planejamento Experimental

Para os experimentos de fotoinativação com AM e ATO em solução, primeiramente foi feito o planejamento fatorial 2³ objetivando avaliar os efeitos dos parâmetros, bem como as interações entre eles. Os parâmetros e seus níveis foram: (1) tempo de incubação de 8 e 16 min; (2) Dose de luz de 15 e 30 J cm⁻² e (3) concentração do FS de 20 e 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Também foram

feitos experimentos com pontos centrais sendo eles: 12 min de tempo de incubação; dose de luz de 22 J cm^{-2} e concentração de $32 \mu\text{mol L}^{-1}$. A Tabela 4 representa o planejamento fatorial 2^3 com os níveis utilizados e os resultados obtidos.

Tabela 4: Planejamento Fatorial 2^3 e resultados obtidos no processo de fotoinativação utilizando AM e ATO em solução. T_i = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm^{-2}) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Ensaio	T_i (min)	DL (J cm^{-2})	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	log UFC mL^{-1} AM em Solução	log UFC mL^{-1} ATO em Solução
1	8	15	20	6,52	6,84
2	16	15	20	6,62	5,94
3	8	30	20	5,41	4,85
4	16	30	20	4,39	2,73
5	8	30	45	4,45	4,88
6	16	15	45	3,66	3,41
7	8	15	45	4,55	3,25
8	16	30	45	3,73	2,23
9	12	22	32	4,59	4,1
10	12	22	32	4,65	4,3
11	12	22	32	4,76	4,65

A inativação por AM e ATO em solução, em alguns pontos apresentou ser eficiente, sendo necessária uma maior exploração da área de maior rendimento do processo de inativação. Nota-se que a máxima inativação utilizando AM em solução, chegou a $3,66 \text{ log UFC mL}^{-1}$ com 16 min de tempo de incubação, dose de luz de 30 J cm^{-2} e concentração de $45 \mu\text{mol L}^{-1}$. Já para o ATO em solução a máxima inativação chegou a $2,23 \text{ log UFC mL}^{-1}$ nas mesmas condições.

Através das Figuras 34(a) e 34(b) pode-se analisar com mais clareza os efeitos dos parâmetros. Para o AM (Fig. 34a), nota-se que os parâmetros: concentração, dose de luz e tempo de incubação, bem como a interação do tempo de incubação com concentração, apresentam significância estatística, estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95%. Quando há aumento da concentração de 20 para $45 \mu\text{mol L}^{-1}$; tempo de incubação de 8 para 16 min e dose de luz de 15 para 30 J cm^{-2} , há diminuição na sobrevivência em log UFC mL^{-1} de 2,38; 1,52 e 1,09 respectivamente, e a interação entre tempo de incubação com dose de luz, propicia um decréscimo em log de 0,88 (Fig. 34b). A concentração é o parâmetro mais importante seguido da dose de luz e tempo de incubação.

Figura 34: (a) Diagrama de Pareto em função do teste t para AM e (b) Diagrama de Pareto em função dos efeitos em que DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.

Quanto ao ATO, nota-se que apenas os parâmetros: dose de luz, tempo de incubação e concentração apresentam significância estatística (Figura 35a). Quanto aos efeitos, pode-se notar que quando há aumento da concentração de 20 para 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$; dose de luz de 15 para 30 J cm^{-2} e tempo de incubação de 8 para 16 min, há diminuição na redução em log de 2,02; 1,67 e 1,38 respectivamente (Fig. 35b). Para o ATO o parâmetro mais importante é a dose de luz seguida da concentração e do tempo de incubação.

Figura 35: (a) Diagrama de Pareto em função do teste t para ATO e (b) Diagrama de Pareto em função dos efeitos em que DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.

Pelas figuras ficam evidentes as tendências para uma melhor inativação. Serão necessários mais experimentos para definir os melhores parâmetros A Tabela 5 apresenta os

valores da análise de variância ANOVA. Nota-se que os dados se ajustaram bem ao modelo linear.

Tabela 5: Resultado da análise de variância (ANOVA) para AM e ATO em solução, em que SQ= Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ= Média Quadrática.

Análise	AM			ATO		
	SQ	GL	MQ	SQ	GL	MQ
Regressão	20,57	2	10,28	18,30	2	9,15
Resíduo	0,57	8	0,07	0,36	8	0,05
F. Ajuste	0,48	6	0,08	0,27	6	0,04
Erro puro	0,09	2	0,045	0,08	2	0,04
Total	21,14	10		18,66	10	
	% de variação explicada: 97,30			% de variação explicada: 98,07		
	% de variação explicável: 99,5			% de variação explicável: 99,52		

A partir desses resultados chegou-se a um modelo ajustado de primeira ordem para o AM e o ATO em solução que foi obtido pelo Statistica podendo ser visto pelas equações (apenas parâmetros e interações significativas) 15 (para AM) e 16 (para ATO), sendo TI = tempo de incubação (min); DL = dose de luz (J cm^{-2}) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Com o objetivo de definir uma região de melhor inativação, foi necessário um ajuste ao modelo de segunda ordem. Pôde-se observar, pela ANOVA que o modelo linear apresentou um bom ajuste, no entanto, como o objetivo é a otimização da resposta, um deslocamento para a região ótima é necessário, objetivando minimizar a sobrevivência de *E. coli*. O deslocamento se dá ao longo do caminho de máxima inclinação, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

Minimização da sobrevivência de *E. coli* para AM = (Equação 15)

$$4,65 - 0,54 \text{ (TI)} - 0,76 \text{ (DL)} - 1,19 \text{ (C)} - 0,44 \text{ (TI*C)}$$

$(\pm 0,11)$ $(\pm 0,13)$ $(\pm 0,12)$ $(\pm 0,14)$ $(\pm 0,12)$

Minimização da sobrevivência de *E. coli* para ATO = (Equação 16)

$$4,30 - 0,68 \text{ (TI)} - 1,0 \text{ (DL)} - 0,83 \text{ (C)}$$

$(\pm 0,09)$ $(\pm 0,11)$ $(\pm 0,10)$ $(\pm 0,11)$

Escolheu-se o parâmetro de maior coeficiente, da regressão linear, em módulo e deslocou-se uma unidade codificada, o deslocamento dos demais parâmetros foi definido pela

Equação 17, em que $\frac{b_j}{b_i}$ é a razão dos estimadores dos parâmetros e X_i e X_j são os fatores. A Tabela 6 apresenta os deslocamentos e resultados obtidos.

$$\Delta_{X_j} = \frac{b_j}{b_i} \Delta_{X_i} \quad (\text{Equação 17})$$

Tabela 6: Valores dos deslocamento e resultados obtidos para AM e ATO em solução, em que TI = Tempo de incubação (min); DL = dose de Luz (J cm^{-2}) e C = Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

AM					ATO			
Ensaio	Ti (min)	DL (J cm^{-1})	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	log UFC AM em Solução	TI (min)	DL (J cm^{-1})	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	log UFC ATO em Solução
1	16	23	31	4,56	3	8	10	5,93
2	20	25	30	1,51	6	15	20	4,82
3	24	27	29	0,20	8	23	30	4,15
4	28	29	28	0,41	10	30	40	3,11
5	32	30	27	0,25	14	38	50	0,91

Com os resultados obtidos foi feito um novo planejamento fatorial 2^3 com o ensaio que apresentou melhor resultado quanto à inativação. Para o AM foi escolhido o ensaio 3 e para o ATO foi definido o ensaio 5 como pontos centrais para o novo planejamento fatorial 2^3 . A Tabela 7 representa o novo planejamento fatorial 2^3 com os resultados obtidos.

Tabela 7: Resultados do segundo Planejamento fatorial 2^3 , em que Ti = tempo de incubação; DL = Dose de luz e C = concentração.

AM					ATO			
Ensaio	Ti (min)	DL (J cm^{-1})	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Log UFC AM em Solução	TI (min)	DL (J cm^{-1})	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	log UFC ATO em Solução
1	20	19	17	1,85	10	31	40	3,40
2	28	19	17	1,35	18	31	40	1,75
3	20	35	17	1,37	10	50	40	0,45
4	28	35	17	0,90	18	50	40	0,41
5	20	19	40	0,73	10	31	65	5,55
6	28	19	40	0,66	18	31	65	5,35
7	20	35	40	0,55	10	50	65	4,30
8	28	35	40	0,45	18	50	65	4,05
9	24	27	29	1,51	14	38	50	0,98
10	24	27	29	0,89	14	38	50	1,22
11	24	27	29	0,60	14	38	50	1,35

A fotoinativação apresentou um aumento significativo na redução bacteriana restando apenas uma população de log 0,45 para AM nas condições de 28 min de incubação; dose de luz de 35 J cm⁻² e concentração de FS 40 µmol L⁻¹. Para o ATO o log mínimo de inativação foi de 0,41 com tempo de incubação de 18 min; dose de luz de 50 J cm⁻² e concentração igual a 40 µmol L⁻¹.

O aumento drástico em log UFC mL⁻¹ com o aumento da concentração para 65 µmol L⁻¹ é explicado pelo fato de que o ATO pode estar formando agregados. De acordo com Alves 2014, a absorção ótica transiente para o ATO, em meio aquoso, varia a partir de 100 µmol L⁻¹ e segundo Bathi e colaboradores 1997, quando há aumento da concentração de ATO de 40 para 163 µmol L⁻¹ não é possível obter uma maior inativação devido à alta concentração fazer uma barreira para a entrada da luz.

Pela análise de variância ANOVA mostrada pela Tabela 8, nota-se que o modelo linear não se ajustou aos dados experimentais, justificado pela porcentagem de variância explicada estar muito abaixo da porcentagem máxima de variância explicável. A falta de ajuste também foi confirmada pela comparação da razão entre as médias quadráticas da regressão e do resíduo, e também através da razão da média quadrática da falta de ajuste e erro puro com os respectivos valores de F críticos.

Para provar que o modelo está ajustado aos dados, deve-se ter MQ (regressão)/MQ (residual) > F(tabelado) e MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) < F (tabelado). Para esse modelo, utilizando AM em solução, o valor de MQ (regressão)/MQ (residual) foi igual a 4,16, sendo o F_{2,11} igual a 3,98. Já o valor de MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) foi igual a 18,52 e o F_{6,5} igual a 4,95, provando a falta de ajuste. Para o ATO em solução o valor de MQ (regressão)/MQ (residual) foi igual a 1,64, sendo o F_{2,11} igual a 3,98 e o valor de MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) foi igual a 1334,6, e o F_{6,5} igual a 4,95, provando também a falta de ajuste. Portanto, devido à falta de ajuste, foi alterado o planejamento fatorial, para o planejamento composto central.

Tabela 8: Tabela ANOVA do segundo planejamento fatorial para AM e ATO em solução, em que SQ = Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ = Média Quadrática

	AM			ATO		
Análise	SQ	GL	MQ	SQ	GL	MQ
Regressão	9,48	2	4,74	9,56	2	4,78
Resíduo	12,54	11	1,14	32,05	11	2,91
F. Ajuste	12,00	6	2,00	32,03	6	5,34
Erro puro	0,54	5	0,12	0,02	5	0,004
Total	22,02	13		41,61	13	
	% de variação explicada: 43,05			% de variação explicada: 22,97		
	% de variação explicável: 97,54			% de variação explicável: 99,95		

A conversão do planejamento fatorial 2³ em planejamento composto central foi iniciada com a adição de seis pontos axiais ao experimento anterior. Os pontos axiais foram calculados através da Equação 16, em que o α para o planejamento fatorial 2³, é correspondente a $\pm 1,682$, e Δ é igual ao deslocamento do ponto central aos pontos cúbicos. A Tabela 9 mostra os pontos axiais para o AM e ATO em solução com os resultados obtidos.

$$\text{Ponto axial } (\pm) = \text{Ponto central} + (\pm\alpha \times \Delta) \quad (\text{Equação 18})$$

Tabela 9: Planejamento Composto Central para AM e ATO em solução, em que TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm⁻²) e C = concentração (μmol L⁻¹).

	AM				ATO			
Ensaio	Ti (min)	DL (J cm ⁻¹)	C (μmol L ⁻¹)	log UFC AM em Solução	Ti (min)	DL (J cm ⁻¹)	C (μmol L ⁻¹)	log UFC ATO em Solução
12	17	27	29	3,52	7	38	52	5,52
13	30	27	29	0,17	21	38	52	0,33
14	24	14	29	0,23	14	25	52	3,51
15	24	39	29	0,20	14	51	52	0,19
16	24	27	8	3,24	14	38	31	3,00
17	24	27	50	2,81	14	38	73	5,95

Com os resultados obtidos foi analisado o modelo de acordo com o planejamento composto central. O valor do coeficiente de determinação explica de forma satisfatória a variância dos dados obtidos nos experimentos de fotoinativação com AM e ATO em solução. Nota-se que para o AM em solução, MQ (regressão)/MQ (residual) apresentou um valor de 28,74 e F_{2,17} igual a 3,59. O MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) é igual a 3,60 e o F_{12,5} igual a 4,68. Para o ATO em solução, MQ (regressão)/MQ (residual) apresentou um valor de 86,61 e

$F_{2,17}$ igual a 3,59. O MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) é igual a 4,21 e o $F_{12,5}$ igual a 4,68 Os resultados da ANOVA estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10: Tabela ANOVA do Planejamento Composto Central para AM e ATO em solução, em que em que SQ = Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ = Média Quadrática.

	AM			ATO		
Análise	SQ	GL	MQ	SQ	GL	MQ
Regressão	12,7	2	6,36	70,21	2	35,11
Resíduo	0,40	17	0,03	6,89	17	0,41
F. Ajuste	0,27	12	0,02	6,27	12	0,52
Erro puro	0,13	5	0,03	0,62	5	0,12
Total	13,10	19		77,10	19	
	% de variação explicada: 96,94			% de variação explicada: 91,06		
	% de variação explicável: 99,00			% de variação explicável: 99,20		

Através do Software Statistica foi possível obter os pontos ótimos em que ocorre 100% de inativação. Com o objetivo de minimizar a função $f(x) = (\text{Log UFC mL}^{-1})$, através do modelo quadrático, foi definido como ponto ótimo para o AM em solução: tempo de incubação 28 min, dose de luz 31 J cm^{-2} e concentração de AM $32 \mu\text{mol L}^{-1}$. Pode-se ver através da Fig 36 os gráficos de superfície/contorno para o AM em solução.

Figura 36: Gráficos de superfície/contorno do planejamento composto central para AM (a) TI x DL; (b) TI x C e (c) DL x C.

O ponto ótimo de inativação utilizando ATO em solução foi definido: tempo de incubação 18 min; dose de luz 39 J cm⁻² e concentração 37 μmol L⁻¹. Pela Figura 37, pode-se ver os gráficos de superfície/contorno para o ATO em solução.

Figura 37: Gráficos de superfície/contorno do planejamento composto central para ATO (a) TI x DL; (b) TI x C e (c) DL x C.

(c)

É possível ver na literatura que a concentração utilizada de ATO e AM em solução para os experimentos fotodinâmicos variam de acordo com o micro-organismo utilizado, bem como com o tempo de incubação e doses de luz, não havendo um estudo aprofundado com a utilização de modelos matemáticos para o processo de fotoinativação para se chegar a um ponto ótimo entre os parâmetros envolvidos no processo.

De acordo com Santos, R 2014, a inativação total foi atingida utilizando AM em solução com concentração de $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e tempo de incubação de 20 min. Nunez S. 2007 inativou a *E. coli* com tempo de incubação de 15 e 30 min, notando uma maior queda de 4 log em 30 min, enquanto que para o ATO também houve uma queda de 4 log com 30 min de incubação nas concentrações de $40 \mu\text{mol L}^{-1}$, utilizando laser para o AM e LED vermelho para ATO.

Nota-se pelos resultados obtidos, que o aumento da concentração não favorece o processo de inativação. Em alguns pontos pode-se notar que há um aumento significativo em log UFC mL^{-1} quando há aumento exagerado da concentração de ATO e AM, sendo explicado pela formação de agregados (Nunez, S 2014).

Bhatti et al 1997, relataram que o aumento da concentração de ATO de 40 para 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ mostrou piores resultados, atribuídos ao possível efeito “filtro” para a entrada da luz, promovido por altas concentrações e consequente agregação.

6.2.2 Fotoinativação com AM e ATO Adsorvido em npSi – Planejamento Experimental

Para o processo de fotoinativação de *E. coli* utilizando npSi com AM e ATO adsorvido na superfície foi realizada a mesma metodologia descrita pelo item 6.2.1. A diferença foi que o preparo da solução de FSs, foi feita com a utilização da suspensão de npSi.

Antes dos experimentos, foi testada a toxicidade das npSi para a *E. coli*. Para isso, 100 μL de suspensão de *E. coli* + 100 μL de suspensão de npSi; npSi-AM e npSi-ATO, sem irradiação e variando tempo de incubação. Os tempos utilizados foram de 8 e 16 min. Após a quantificação, notou-se que para o grupo utilizando npSi por 8 min, houve diminuição de 0,32 log e para 16 min 0,53 log UFC mL^{-1} . Para os grupos com npSi-AM e npSi-ATO, houve decaimento em 8 min de 0,76 e 0,98 e para 16 min, 0,91 e 1,23 log UFC mL^{-1} respectivamente.

O fato de haver uma inativação discreta utilizando apenas npSi é explicada por ser uma nanopartícula biocompatível segundo Mebert 2013, sendo facilmente aderida à superfície da *E. coli*, levando à desintegração da membrana, sendo a intensidade relacionada com a concentração de npSi e com o tempo de contato. A biocompatibilidade está relacionada com a estabilidade química e térmica das npSi.

A afinidade e a inativação de *E. coli* por npSi-AM e npSi-ATO é explicada pelas diferenças de cargas entre a parede celular da *E. coli* e a superfície das npSi-AM/ATO, sendo a parede da *E. coli* carregada negativamente e as npSi-AM e ATO positivamente. A carga negativa da *E. coli* é devido a presença de lipolissacarídeos na estrutura (Lopes, S 2013) que atrai eletrostaticamente as npSi-AM/ATO.

O planejamento fatorial 2^3 inicial para descrição dos efeitos dos parâmetros foi feito com os mesmos níveis dos parâmetros para a fotoinativação de *E. coli* utilizando AM e ATO em solução. A Tabela 11 retratada as respostas obtidas.

Tabela 11: Planejamento Fatorial 2^3 e resultados obtidos no processo de fotoinativação de *E. coli* utilizando npSi-AM e npSi-ATO. TI = tempo de incubação; DL = Dose de luz e C = concentração.

Ensaio	Ti (min)	DL (J cm^{-2})	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	log UFC npSi-AM	log UFC npSi-ATO
1	8	15	20	5,31	6,31
2	16	15	20	4,67	4,67
3	8	30	20	2,68	5,68
4	16	30	20	1,22	3,22
5	8	30	45	4,72	5,72

6	16	15	45	3,60	3,60
7	8	15	45	2,87	4,87
8	16	30	45	1,38	2,35
9	12	22	32	3,51	4,51
10	12	22	32	3,68	4,68
11	12	22	32	3,77	4,77

A inativação de *E. coli* por npSi-AM e npSi-ATO, em alguns pontos apresentou uma boa eficiência levemente mais acentuada que utilizando AM e ATO em solução em alguns experimentos, sendo necessária uma maior exploração da área de maior rendimento do processo de inativação. O número em log UFC mL⁻¹ menor para npSi-AM (1,22) ocorre utilizando tempo de incubação de 16 min, dose de luz de 30 J cm⁻² e concentração de 20 µmol L⁻¹. Já para o ATO nota-se que a quantidade mínima em log UFC mL⁻¹ (2,35) ocorre no tempo de 16 min, dose de luz 30 J cm⁻² e concentração 45 µmol L⁻¹.

Apartir das Figuras 38 e 39 pode-se analisar com mais clareza os efeitos dos parâmetros. Para npSi-AM (Fig. 38a), nota-se que os parâmetros: dose de luz e tempo de incubação apresentam significância estatística, estando dentro do intervalo de confiabilidade de 95%. Quando há aumento do tempo de incubação de 8 para 16 min e dose de luz de 15 para 30 J cm⁻², há diminuição na sobrevivência de *E. coli* em log UFC mL⁻¹ de 2,19 e 1,19 respectivamente (Fig. 38b). A dose de luz é o parâmetro mais importante seguido do tempo de incubação.

Figura 38: (a) Diagrama de Pareto em função do teste t para AM adsorvido na superfície de npSi e (b) Diagrama de Pareto em função dos efeitos em que DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.

Quanto ao ATO, nota-se que os parâmetros: dose de luz, tempo de incubação e concentração apresentam significância estatística, podendo ser visto pela Figura 39a. Quanto aos efeitos, pode-se notar que quando há aumento da concentração de 20 para 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$; dose de luz de 15 para 30 J cm^{-2} e tempo de incubação de 8 para 16 min, há diminuição em log de 1,69; 2,02 e 1,37 respectivamente (Fig. 39b). Para o ATO o parâmetro mais importante é a dose de luz seguida da concentração e do tempo de incubação.

Figura 39: (a) Diagrama de Pareto em função do teste t para ATO adsorvido na superfície de npSi e (b) Diagrama de Pareto em função dos efeitos em que DL= Dose de luz; C = concentração e TI = Tempo de incubação.

A Tabela 12, apresenta os valores da análise de variância ANOVA. Nota-se que os dados se ajustaram bem ao modelo linear.

Tabela 12: Tabela ANOVA para npSi-AM e npSi-ATO, em que SQ= Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ= Média Quadrática.

Análise	npSi-AM			npSi-ATO		
	SQ	GL	MQ	SQ	GL	MQ
Regressão	16,75	2	8,37	12,75	2	9,15
Resíduo	0,18	8	0,02	0,36	8	0,05
F. Ajuste	0,15	6	0,03	0,27	6	0,04
Erro puro	0,03	2	0,02	0,09	2	0,04
Total	16,93	10		13,11	10	
	% de variação explicada: 98,93			% de variação explicada: 97,26		
	% de variação explicável: 99,82			% de variação explicável: 99,32		

O modelo ajustado de primeira ordem pode ser visto pelas equações 19 (para npSi-AM) e 20 (para npSi-ATO). Em seguida foi aperfeiçoado objetivando definir uma região de melhor

inativação de *E. coli*. Para isso foi necessário um ajuste ao modelo de segunda ordem. Sendo assim, iniciou-se o deslocamento em busca de melhores respostas escolhendo-se o parâmetro de maior coeficiente em módulo o que deslocou uma unidade codificada, sendo que o deslocamento dos demais parâmetros foram definidos pela Equação 15. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 13.

Minimização da sobrevivência de *E. coli* para npSi-AM = (Equação 19)

$$3,30 - 0,60 \text{ (TI)} - 1,15 \text{ (DL)}$$

(± 0,06) (± 0,07) (± 0,08)

Minimização da sobrevivência de *E. coli* para npSi-ATO = (Equação 20)

$$4,51 - 1,09 \text{ (TI)} - 0,39 \text{ (DL)} + 0,45 \text{ (C)}$$

(± 0,05) (± 0,07) (± 0,06) (± 0,05)

Tabela 13: Valores dos deslocamentos e resultados obtidos para fotoinativação de *E. coli* com npSi-AM e npSi-ATO, em que TI = Tempo de incubação (min); DL = dose de Luz (J cm⁻²) e C = Concentração (μmol L⁻¹) para os dois FSs incorporados às npSi.

npSi-AM					npSi-ATO			
Ensaio	Ti (min)	DL (J cm ⁻¹)	C (μmol L ⁻¹)	log UFC npSi-AM	Ti (min)	DL (J cm ⁻¹)	C (μmol L ⁻¹)	log UFC npSi-ATO
1	14	29	28	1,25	16	28	33	2,91
2	16	37	24	0,15	20	35	32	0,25
3	18	44	20	0,40	24	42	31	0,42
4	20	52	17	0,43	28	49	30	1,19
5	22	60	13	2,15	32	56	29	2,11

Com o objetivo de ajustar a um planejamento composto central foram feitos mais experimentos com o planejamento fatorial 2³ que apresentou o melhor resultado quanto à inativação. Para npSi-AM e npSi-ATO foi escolhido o ensaio 2. A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos com o novo planejamento fatorial 2³.

Tabela 14: Resultados do segundo Planejamento fatorial 2³, em que TI = tempo de incubação; DL = Dose de luz e C = concentração para fotoinativação de *E. coli* com AM e ATO incorporados às npSi.

npSi-AM					npSi-ATO			
Ensaio	Ti (min)	DL (J cm ⁻¹)	C (μmol L ⁻¹)	log UFC npSi-AM	Ti (min)	DL (J cm ⁻¹)	C (μmol L ⁻¹)	log UFC npSi-ATO
1	12	30	13	2,42	16	23	20	2,31
2	20	30	13	0,75	24	23	20	1,55

3	12	44	13	1,39	16	43	20	2,34
4	20	44	13	0,45	24	43	20	0,85
5	12	30	37	0,98	16	23	44	1,23
6	20	30	37	0,61	24	23	44	1,22
7	12	44	37	0,60	16	43	44	2,25
8	20	44	37	0,22	24	43	44	0,52
9	16	37	24	0,94	20	36	32	0,53
10	16	37	24	0,68	20	36	32	0,67
11	16	37	24	0,82	20	36	32	0,69

Nota-se por esta tabela que houve a diminuição na sobrevivência da *E. coli* representada pelos valores de log UFC mL⁻¹ em relação aos valores obtidos para a fotoinativação com npSi-AM no primeiro planejamento sendo agora o valor mínimo de 0,22 na concentração de 37 µmol L⁻¹, dose de luz de 44 J cm⁻² e tempo de incubação de 20 min. Para o ATO a quantidade mínima em log UFC mL⁻¹ foi 0,52 utilizando tempo de incubação de 24 min, dose de luz de 43 J cm⁻² e concentração de 44 µmol L⁻¹.

A análise de variância ANOVA mostrada na Tabela 15, mostrou que o modelo linear não se ajustou aos dados experimentais. Para esse modelo, utilizando npSi-AM, o valor de MQ (regressão)/MQ (residual) foi igual a 3,79, sendo o F_{2,11} igual a 3,98, e o valor de MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) foi igual a 15,71 e o F_{6,5} igual a 4,95, provando a falta de ajuste. Para npSi-ATO o valor de MQ (regressão)/MQ (residual) foi igual a 7,42, sendo o F_{2,11} igual a 3,98 e o valor de MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) foi igual a 63,33, e o F_{6,5} igual a 4,95, provando também a falta de ajuste. Portanto, foi alterado o planejamento fatorial, para o planejamento composto central.

Tabela 15: Tabela ANOVA referente ao segundo planejamento fatorial para a fotoinativação de *E. coli* com npSi-AM e npSi-ATO, em que SQ = Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ = Média Quadrática

	npSi-AM			npSi-ATO		
Análise	SQ	GL	MQ	SQ	GL	MQ
Regressão	0,96	2	0,48	3,12	2	1,56
Resíduo	1,40	11	0,13	2,31	11	0,21
F. Ajuste	1,32	6	0,22	2,28	6	0,38
Erro puro	0,07	5	0,014	0,03	5	0,006
Total	2,35	13		5,43	13	
	% de variação explicada: 40,85			% de variação explicada: 57,46		
	% de variação explicável: 97,02			% de variação explicável: 99,44		

A conversão do planejamento fatorial em planejamento composto central foi iniciada com a adição dos seis pontos axiais ao experimento anterior. Os pontos axiais foram calculados

através da Equação 18. A Tabela 16 mostra os pontos axiais para npSi-AM e npSi-ATO em solução com os resultados obtidos.

Tabela 16: Planejamento Composto Central para a fotoinativação de *E. coli* com npSi-AM e npSi-ATO, em que TI = tempo de incubação (min); DL = Dose de luz (J cm^{-2}) e C = concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$).

Ensaio	npSi-AM				npSi-ATO			
	Ti (min)	DL (J cm^{-1})	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	log UFC npSi-AM	Ti (min)	DL (J cm^{-1})	C ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	log UFC npSi-ATO
12	10	37	25	1,11	13	36	32	1,8
13	23	37	25	0,24	27	36	32	0,24
14	16	25	25	0,74	20	23	32	0,59
15	16	49	25	0,15	20	48	32	0,07
16	16	37	4	4,31	20	36	11	2,30
17	16	37	46	1,51	20	36	53	1,51

Com os resultados obtidos analisou-se o modelo de acordo com o planejamento composto central. Nota-se que para npSi-AM, MQ (regressão)/MQ (residual) apresentou um valor de 66,84 e $F_{2,17}$ igual a 3,59. O MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) foi igual a 0,16 e o $F_{12,5}$ igual a 4,68. Para npSi-ATO, MQ (regressão)/MQ (residual) apresentou um valor de 2973 e $F_{2,17}$ igual a 3,59. O MQ (falta de ajuste)/MQ (erro puro) foi igual a 1,39 e o $F_{12,5}$ igual a 4,68. Os resultados da ANOVA estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17: Tabela ANOVA do Planejamento Composto Central para a fotoinativação de *E. coli* com npSi-AM e npSi-ATO, em que em que SQ= Soma dos Quadrados; GL= Graus de Liberdade e MQ= Média Quadrática.

Análise	npSi-AM			npSi-ATO		
	SQ	GL	MQ	SQ	GL	MQ
Regressão	20,21	2	10,105	18,18	2	9,09
Resíduo	2,57	17	0,15	0,052	17	0,003
F. Ajuste	0,69	12	0,06	0,04	12	0,004
Erro puro	1,88	5	0,38	0,012	5	0,0024
Total	22,78	19		18,24	19	
	% de variação explicada: 88,71			% de variação explicada: 99,71		
	% de variação explicável: 91,74			% de variação explicável: 99,93		

Minimizando a função $f(x) = (\text{Log UFC mL}^{-1})$ através do modelo quadrático utilizando o Software Statistica, foi definido o ponto ótimo para o npSi-AM: tempo de incubação de 22 min, dose de luz 40 J cm^{-2} e concentração de AM de $26 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os gráfico de superfície/contorno para npSi-AM pode ser visto na Figura 40.

Figura 40: Gráficos de superfície/contorno do planejamento composto central para a fotoinativação de *E. coli* com npSi-AM **(a)** TI x DL; **(b)** TI x C e **(c)** DL x C.

(c)

O ponto ótimo de inativação de *E. coli* utilizando npSi-ATO foi definido: tempo de incubação igual a 25 min; dose de luz de 48 J cm⁻² e concentração de 18 μmol L⁻¹. Pela Figura 41, pode-se ver os gráficos de superfície/contorno para npSi-ATO.

Figura 41: Gráficos de superfície/contorno do planejamento composto central para a fotoinativação de *E. coli* com npSi-ATO (a) TI x DL; (b) TI x C e (c) DL x C.

Os modelos matemáticos responderam bem ao processo de fotoinativação de *E. coli*, em todas as condições. Nota-se que o uso de npSi mostrou bastante eficiência em relação a sua não utilização, devido ao uso de uma concentração mais baixa de AM e ATO.

O uso de nanopartículas tem chamado muita atenção para a área de TFD, uma vez que elas apresentam alta área superficial, a superfície pode ser alterada para aumentar a eficiência de adsorção de FSs, são penetráveis em células biológicas e são mais foto-estáveis que a maioria dos compostos orgânicos (Benabbou et al, 2011).

Para a inativação de *E. coli*, recentemente há várias pesquisas, como a utilização de nanopartículas de prata integradas com vários tipos de materiais como polímeros (Phong N, 2009; Gangadharan, D et al 2010 e Heidarpour et al, 2011), membranas (Yang et al, 2009) e compostos de sílica (Zhang et al, 2011). A utilização de nanopartículas semicondutoras, também tem sido muito utilizada com o objetivo de inativar *E. coli*, como: ZnO; ZrO₂; CeO₂; FeO₃ e WO₃ (Hoffmann, et al 1995; Seven, et al 2004), sendo o mais comum o TiO₂ (Malowski et al, 2001 e Benabbou et al, 2007).

A sílica diante desse universo de variedades de nanoestruturas utilizadas para inativação de *E. coli* não foi muito utilizada na sua forma coloidal, sem modificações, para essa finalidade. Isso devido a sua baixa capacidade de adsorção por não ser mesoporosa e também por precisar de modificações em sua superfície para que o adsorbato possa fazer ligações de hidrogênio com o adsorvente, evitando a dessorção.

No entanto as suas características como a ampla variedade de formas e tamanhos, superfície fácil de modificar podendo ser obtida a partir de precursores relativamente baratos e além de sua afinidade por membranas lipídicas (Benabbou et al, 2011 e Qingshan et al, 2012) fez com que esse estudo fosse realizado, objetivando apenas avaliar a influência da presença de npSi no processo de fotoinativação da *E. coli*.

Nota-se através dos resultados que para ambos os FSs, o uso de npSi permitiu uma inativação com uma concentração mais baixa de AM e ATO. Para o AM em solução foi necessário $32 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que utilizando as npSi, foi necessário apenas $26 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, uma diminuição de 20%. Para o ATO em solução foi necessário $37 \mu\text{mol L}^{-1}$ e utilizando npSi, $18 \mu\text{mol L}^{-1}$, ou seja, uma importante diminuição na concentração de 51%.

6.3 Análise da interação *E. coli*/npSi-AM/ATO por MEV

Objetivando analisar a interação das npSi-AM/ATO com a *E. coli*, foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura. Pode-se ver através da Figura 44 que ocorre desestruturação da integridade bacteriana na presença das npSi. A desestruturação ocorre pela atração eletrostática das cargas do AM e ATO na superfície de npSi (carregada positivamente) pela parede celular da *E.coli* que é uma bactéria gram-negativa (carregada negativamente), sendo desfeita a integridade da parede celular quando as bactérias incubadas com os FSs veiculados em npSi são submetidas à irradiação.

Figura 42: Microfotografias da interação *E. coli*/npSi-AM/ATO. a) *E. coli* isolada sem tratamento. As demais figuras referem-se a diferentes tratamentos. b) experimento com 8 min de incubação, concentração de npSi-AM de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e dose de luz de 15 J cm^{-2} . c) é referente às mesmas condições que 42(b), no entanto utilizou-se $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de npSi-ATO. d) e e) 16 minutos de incubação, dose de luz de 20 J cm^{-2} e concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de npSi-AM (42d) e de npSi-ATO (42e). f) e g) referem-se a 20 min de incubação; dose de luz de 30 J cm^{-2} e concentração de $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ npSi-AM (42f) e npSi-ATO (42g).

7. CONCLUSÕES

Neste estudo foram empregadas duas formas para fotoinativar *E. coli*, sendo com o azul de metileno e o azul de toluidina dispersos em solução e ambos adsorvidos na superfície de npSi. Para o processo foi utilizado o planejamento de experimentos (planejamento fatorial modelado ao planejamento composto central) como ferramenta matemática para otimizar as respostas, alcançando-se uma condição de máxima inativação por AM e ATO dispersos em solução e veiculados por npSi.

Os pontos ótimos de inativação de *E. coli*, em que há 100% de morte, com AM em solução, foi tempo de incubação de 28 min, dose de luz de 31 J cm^{-2} e concentração de 32 µmol L^{-1} e empregando-se ATO em solução tempo de incubação de 18 min, dose de luz de 39 J cm^{-2} e concentração de 37 µmol L^{-1} . Também obtiveram-se os pontos ótimos de inativação: para npSi-AM 22 min de incubação; dose de luz de 40 J cm^{-2} e concentração de 26 µmol L^{-1} . Já para npSi-ATO o tempo de incubação foi de 25 min, dose de luz de 48 J cm^{-2} e concentração de 18 µmol L^{-1} . Foi demonstrado que a utilização de npSi com FS adsorvido favoreceu o processo de fotoinativação de *E. coli*, sendo necessária uma concentração mais baixa de AM e ATO, 20 e 51% respectivamente.

Apesar do azul de metileno e o azul de toluidina apresentarem similaridades em sua estrutura química, o azul de toluidina apresenta mais vantagem em relação ao Azul de metileno quando adsorvido na superfície de nanopartículas de sílica, o que pode ser explicado devido a

sua característica hidrofílica mais acentuada acarretando uma maior afinidade à bactéria e assim, maior toxicidade quando irradiado como mostrados pelos resultados obtidos.

Além do azul de toluidina ser mais hidrofílico em relação ao azul de metileno, ele também se destaca em relação à atividade fotodinâmica com eficiência de $4,6 \pm 0,2 \text{ m}^2 \text{ J}$ e para o azul de metileno $2,6 \pm 0,4 \text{ m}^2 \text{ J}$ como descrito por Buck, 2009, sendo mais tóxico à viabilidade bacteriana devido à uma produção mais acentuada de oxigênio singlete.

O uso do planejamento composto central foi utilizado de forma inédita e bastante promissora nesse estudo, uma vez que em TFD antimicrobiana normalmente é feita uma análise univariada dos parâmetros como tempo de incubação, dose de luz e concentração do FS, ou seja, variação de um desses parâmetros por vez. Com o planejamento experimental, pode-se fazer uma análise multivariada, em que podem ser variados todos os parâmetros ao mesmo tempo, proporcionando várias respostas com menos tempo, experimentos, gastos e maior precisão nos resultados obtidos, sendo assim considerado de grande utilidade para aplicações em TFD.

8. REFERÊNCIAS

Alarcón, J., Ponce, S., Paraguay-Delgado, F. e Rodríguez, J. **Effect of γ -irradiation on the growth of ZnO nanorod films for photocatalytic disinfection of contaminated water.** Journal of Colloid and Interface Science Volume 364, Issue 1, Pages 49–55, 2011.

Alves, E., Rodrigues, J., Faustino, M., et al. **A new insight on nanomagnet–porphyrin hybrids for photodynamic inactivation of microorganisms.** Dyes and Pigments, Volume 110, Pages 80–88, 2014.

Alves, L. P. **Absorção óptica transiente no composto fenotiazínico azul de toluidina.** Tese de doutorado em Engenharia Biomédica, 2014.

Allinger, N.L. **Química Orgânica.** Rio de Janeiro: Guanabara dois S.A., 1978, 5.ed, cap 11.

Ashkenaji, K et al. **Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light.** Fems Immunology and medical microbiology, v. 35, n. 1, 17-24. ISSN: 0928-8244, 2003.

Bae, B.C; Na, K. **Development of Polymeric Cargo for Delivery of Photosensitizer in Photodynamic Therapy.** International Journal of Photoenergy. Article ID 431975,doi:10.1155/2012/431975, 2012.

Baccile, N; Babonneau, F; Thomas, B and Coradin, B. **Introducing ecodesign in silica sol-gel materials.** J. Mater. Chem. 19, 8537, 2009.

Barros Neto, B.; Scarminio, I.S.; Bruns, R.S. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na indústria.** 4ªed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

Batterman,S.; Zhang, L. ; Wang, S. **Quenching of Chlorination Disinfection By product Formation in Drinking Water by Hydrogen Peroxide.** Water Research. V 34, n. 5, p. 1652-1658, 2000.

Bhatti, M et al. **Effects of dosimetric and physiological factors on the lethal photosensitization of *Porphyromonas gingivalis* in vitro.** Photochem. Photobiol., v.65, p. 1026-1031, 1997).

Benabbou, A.K; Guillard, C; Cantau, C., et al. **Water Disinfection Using Photosensitizers Supported on Silica.** Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 219 101–108, 2011.

Bertolini, T. C. R. e Fungaro, D.A. **Estudos de Equilíbrio e Modelagem Cinética da Adsorção do Corante Cristal Violeta sobre Zeólitas de Cinzas Leve e Pesada de Carvão.** 3rd International Workshop Advances in Cleaner Production initiatives and challenges for a sustainable world. São Paulo – Brazil – May 18th-20ndth – 2011.

Bezman, S.A. et al. **Photodynamic inactivation of *E. coli* by rose-bengal immobilized on polystyrene beads.** Photochemistry and Photobiology, v. 28, n. 3, p. 325-329, 1978.

Bezerra et al. **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry**. Talanta, v.76, n.5, p. 965-977, 2008.

Bonnet, R. **Photosensitizer of the Porphyrin and Phthalocyanine series for Photodynamic therapy**: Chemical Society Reviews. 24: 19-33 p. 1995.

Bonnet, R; Krysteva, M.A; Lalov, I.G; Artarsky,S.V. **Water Disinfection Using Photosensitizers Immobilized on Chitosan**. Water Research. V. 40, p. 1269-1275, 2006

Brinker, C. J.; *J. Non-Cryst. Solids*.100, 31, 1988.

Buck, S.T.G. Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica. Dissertação, Instituto de química de São Carlos, 2009.

Camporotond D, et al. **Antimicrobial properties of silica modified nanoparticles, Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**, 2013.

Capeletti, L.D; Oliveira, L.F; Gonçalves, K.A et al. **Tailored sílica-antibiotic nanoparticles: overcoming bacterial resistance with low cytotoxicity**. Langmuir, American chemical society,v.30, p. 7456-7464, 2014.

Chatterjee, D. K; Fong, L.S et al. **Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm**. Advanced Drug Delivery reviews. 60:1627-1637, 2008.

Crutchley, R.J e Rosa, M.C. **Photosensitized singlet oxygen and its applications**. Coordination Chemistry Reviews 233- 234, 351-371, 2002.

Dehghan M,A; Ghazanf, M,H; Jamialahmadi, M e Helalizadeh, A. **Adsorption of Silica Nanoparticles onto Calcite: Equilibrium, Kinetic, Ther-modynamic and DLVO Analysis**. Chemical Engineering Journal, 8947, 00944-4, 2015.

D'Ilario, L; Martinelli, A. **Toluidine blue: aggregation properties and structural aspects.** Modelling Simul Mater Sci Eng. 14:581-595, 2006.

Dzidic, S.; Bedekovic, V. **Horizontal gene transfer emerging multidrug resistance in hospital bacteria.** Aca. Pharmacol. Sin, v. 24, n.6, p.519-526, 2003.

Farias, R. F.; Airoidi, C.; Quim. Nova, v.23,p. 88, 2000.

Fernández, I.G; Calderero, I.F; Polo-López, M. I.; Ibáñez, P. F. **Disinfection of Urban Effluents Using Solar TiO₂ Photocatalysis: A Study of Significance of Dissolved Oxygen, Temperature, Type of Microorganism and Water Matrix.** Catalysis Today, Almería, Spain, 2014.

Filipponi, L; Sutherland, D. chapter 1: **Introduction to nanoscience and nanotechnologies.** Interdisciplinary nanoscience center, 2010.

Gallagher, W.M e O'connor, A.E. Porphyrin and Nonporphyrin in oncology: **Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy.** Photochemistry and Photobiology, v.85, n.5, p.1053-1078, 2009.

Gangadharan, D. et al. **Polymeric microspheres containing silver nanoparticles as a bactericidal agent for water disinfection.** Water research, 44, pp. 5481-5487, 2010.

Giraldo, A.L., Peñuela, G.A., Torres-Palma, R.A., Pino, N.J., Palominos, R.A., e Mansilla, H.D. **Degradation of the antibiotic oxolinic acid by photocatalysis with TiO₂ in suspension.** Water research Volume 44, Issue 18, Pages 5158-5167, 2010.

Graciano, T.B; Coutinho, T.S; Cressoni, C.B et al. Using Chitosan Gels as a Toluidine Blue O Delivery System for Photodynamic Therapy of Buccal Cancer: In Vitro and In Vivo Studies. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2014.

Hamblin, M. R.; Mroz, P., **Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical**. Norwood, MA: Artech House; 2008.

Hasegawa, G.K.F. **Estudo da Potencialidade da Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (TFDA) na Desinfecção de Água**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

Heidarpour F. et al. **Complete removal of pathogenic bacteria from drinking water using nano silver-coated cylindrical polypropylene filters**. Clean technologies and environmental policy, 13, pp. 499-507, 2011.

Ho, Y-S. **Selection of optimum sorption isotherm**, Carbon. 42, 2115–2116, 2004.

Hussain, S.N; Harris,F e Phoenix, D.A. **The phototoxicity of phenothiazinium based photosensitizers to bacterial membranes**. Fems Immunology and Medical Microbiology, v.46, p.124-130, 2006.

Iler, R.K. **The chemistry of sílica**. New York: John wiley e sons, 1979.

Januário, E.R; Ciuffi, K.J e Nassar, E.J. **Nanopartículas de sílica obtidas através do processo sol-gel em sistemas micelares com meio amoniacal**. Sociedade Brasileira de Química, 1997.

Karim A.H; Jalil, A.A; Triwahyono, S.; Sidik, S.M; Kamarudin, N.H.N; Jusoh, R.; Juson, N.W.C. e Hameed, B.H. **Amino modified mesostructured silica nanoparticles for efficient adsorption of methylene blue**. Journal of Colloid and Interface Science 386 307-314, 2012.

Khalil, A., Gondal, M. A. e Dastageer, M.A. **Augmented photocatalytic activity of palladium incorporated ZnO nanoparticles in the disinfection of *Escherichia coli* microorganism from water**. Applied Catalysis A: General Volume 402, Issues 1–2, Pages 162–167, 2011.

Khanmohammadi, S.; Nassaj, E.T. **Micro-porous Silica- yttria Membrane by Sol-Gel Method: Preparation and Characterization**. Ceramics International 40 9403–9411, 2014.

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

Lagergren, S. **On the theory of so-called adsorption dissolved substances**. Handlingar Band. 24, 1-39, 1898.

Lopes, D.C.S. **Efeito da carga do fotossensibilizador em lipídeos de *Escherichia coli***. Departamento de Biologia, 2013.

Lima, A. M. **Encapsulação de fotossensibilizadores em nanopartículas lipídicas sólidas para maximização da eficiência fotodinâmica e fototoxicidade**. Dissertação, Universidade de São Paulo, USP, 2013.

Machado, M. E. L. **Endodontia-da biologia à técnica**. São Paulo: Santos, 484p, 2007.

Magaraggia, M., Jori, G., Soncin, M., Schofield, C. e Russell, D. **Porphyrin–silica microparticle conjugates as an efficient tool for the photosensitised disinfection of water contaminated by bacterial pathogens**. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 12, 2170-2176, 2013.

Malato, S.; P Ibáñez, P. F.; Maldonado, M.I.; Blanco, J.; Gernjak, W. **Catalysis Today**. 147 59, 2009.

Mebert A; Camporontondi, D et al. **Controlling the interaction between cells and silica nanoparticles**. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering* Vol. 3, 108–121, 2013.

Mehrjouei, M; Müller, S. e Möller, D. **A review on photocatalytic ozonation used for the treatment of water and wastewater**. *Chemical Engineering Journal* 263 209-219, 2015.

Melo, W. C. M. A.; Castro, L. F.; Dalmas, R. M. M. T. S.; Perussi, J. R., **Effectiveness of Photodynamic Therapy on Gram-negative Bactéria**, 2011.

Melo, W. C. M.; Perussi, J. R., **Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos**. Rev Ciênc Farm Básica Apl.,33(3):331-340, ISSN 1808-4532, 2012.

Mesquita, M., Menezes, J., Pires, S. et al. **Pyrrolidine-fused chlorin photosensitizer immobilized on solid supports for the photoinactivation of Gram negative bacteria**. Dyes and Pigments, 110, 123-133, 2014.

Montgomery, D.C e Calado, V. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro, E-papers. ISBN: 85-87922-83-1, 2003.

Morais, P.C.; Garg, V.K.; Oliveira, A.C et al. **Jornal magnetism and magnetic materials**, v.225, p.37, 2001.

Nakonechny, F.; Pinkus, A.; Hai, S et al. **Eradication of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria by Photosensitizers Immobilized in Polystyrene**. Photochemistry and Photobiology, 89: 671–678, 2013.

Nozawa, K; Gailhanou, H; Raison, L; Panizza, P; Ushiki, H; Sellier, E; Delville, J and Delville, H. Smart. **Control of monodisperse Stober silica particles: Effect of reactant addition rate on growth process**. Langmuir 21, 1516, 2004.

Neto, B. B; Scarminio, I.S. e Bruns, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª Ed, Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2001.

Niu, Y.; Rongjun, Q.; Lei, M. et al. **Synthesis of Silica Supported Salicylaldehyde Modified PAMAM Dendrimers for the Effective Removal of Hg (II) from Aqueous Solution**. Journal of Hazardous Materials 278 267–27, 2014.

Ormond, A.B; Freeman, H.S. **Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy**. Materials, 6, 817-840; doi:10.3390/ma6030817, 2013.

Ortel, B.; Shea, C.R.; Calzavara, P.P. **Molecular Mechanisms of Photodynamic Therapy**, v. 14, p. 4157-4172, 2009.

Pathakoti, K., Morrow, S., Han, C., Pelaez, M., He, X., Dionysiou, D e Hwang, H. **Photoinactivation of *Escherichia coli* by sulfur-doped and nitrogen-fluorine-codoped TiO₂ nanoparticles under solar simulated light and visible light irradiation**. Environ. Sci. Technol., 47, pp. 9988–9996, 2013.

Paula, L.F; Santos, R.O; Menezes, H.D; Britto, J.R. et al. **A Comparative Study od Irradiation Systems for Photoinactivation of Microorganisms**. Journal of Brazilian Chemical Society, v. 21, n. 4, p. 694-700, 2010.

Pelaeza, N; Pillai, S.C.; Falaras, P. et al. **A Review on the Visible Light Active Titanium Dioxide Photocatalysts for Environmental Applications**. Applied Catalysis B: Environmental 125 331– 349, 2012.

Perni, S. et al. **Toluidine blue-containing polymers exhibit potente bactericidal activity when irradiated qith red laser light**. Journal of Materials chemistry, v. 19, n.18, p. 2715-2723, 2009.

Perni, S. et al. **Nanoparticles: their potencial use in antibacterial photodynamic therapy**. Photochemical and Photobiologocal sciences, v.10, n.5, p. 712-720, 2011

Perussi, J.R. Inativação **Fotodinamica de Micro-organismos**. Quimica Nova, v. 30, n.4, 2007.

Perussi, J. R.; Imasato, H., **Inativação fotodinâmica de micro-organismos**. In: Bagnato VS. **Novas técnicas ópticas para área da saúde**. São Paulo: Livraria da Física; p. 161-84, 2008.

Phong, A et al. **Fabrication of antibacterial water filter by coating silver nanoparticles on flexible polyurethane**. Joournal of Physics: Conference Series, 187, p. 012079, 2009.

Qingshan M. et al. **Mechanism of cellular uptake of genotoxic silica nanoparticles**. Particle and fibre toxicology 9-19, 2012.

Ramezani, M.; Vaezi, M.R; Kazemzadeh, A. **The Influence of the Hydrophobic Agent, Catalyst, Solvent and Water Content on the Wetting Properties of the Silica Films Prepared by One-Step Sol-Gel Method**. Applied Surface Science 326 99-106, 2015.

Rémy, S.P; Simonet, F.; Cerda, E.E; Lazzaroni, J.C; Atlan,D; Guillard, C. Photocatalysis and Disinfection of Water: **Identification of Potencial Bacterial Targets**. Applied Catalysis B: Environmental104 390–398, 2011.

Rosensweig, R.E. **Ferrohydrodynamics**. Dover publications, inc, 1997.

Santos, R.O. **Estudo da inativação fotodinâmica de *E. coli* em água utilizando Azul de metileno e rosa de bengala**. Dissertação, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2014.

Rubires R, Crusats J, El-Hachemi Z, Jaramillo T, Lopez M, Valls E, et al. **Selfassembly in water of the sodium salts of meso-sulfonatophenyl substituted porphyrins**. New J Chem. Feb;23(2):189-98, 1999.

Santos, R.O. **Estudo da Inativação Fotodinâmica de Escherichia coli em Água Utilizando Azul de Metileno e Rosa de Bengala**. Dissertação, Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

Silva, R. C. **Avaliação da Eficiência Fotodinâmica de Fotossensibilizadores com Aplicação em Terapia Fotodinâmica**. (Dissertação de Mestrado). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

Silva, A. B.; Lima N. M.F; Palha M. A.P.F. e Sarmento S.M. **Kinetics of water disinfection using UV-C radiation**. Fuel 110 114–123, 2013.

Singh, L.P; Agarwal, S.K; Bhattacharyya, S.K; Sharma, U e Ahalawat, S. **Nanomater. Nanotechnol.** 1 44, 2011.

Skoog, A. D; Crouch, S. R; James Holler, F.J e West, D. M. **Fundamentos de química analítica.** Cengage, 8 ed. ISBN-10: 8522104360 e ISBN-13: 978-8522104369, 2006.

Tanielian, C. et al. **Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen.** Photochemistry and Photobiology, v. 71, n. 1, p. 12-19. ISSN 0031-8655, 2000.

Tortora, G.L. **Microbiologia.** 8° ed. Porto Alegre, 2005.

Wainwright M, Mohr H, Walker WH. **Phenothiazinium derivatives for pathogen inactivation in blood products.** J Photochem Photobiol B. 86:45–58, 2007.

Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DR, Bolton FJ. **A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series.** FEMS Immunol Med Microbiol.19:75–80, 1997.

Weber, W. J., Morris, J. C.. **Kinetics of adsorption on carbon from solution.** Journal of Sanitary Engineering, Division ASCE. 89, 31 – 60, 1963.

Wright, J.D; Sommmerdijk, N.A.J.M. **Sol-Gel Materials Chemistry and Applications.** By Taylor e Francis Group. International Standard Book Number-10: 90-5699-326-7 (Hardcover), 2001.

Vono, L. L. R. **Estudo de Imobilização de fotossensibilizadores em nanomateriais magnéticos.** Depósito de dissertação, Instituto de Química, Universidade de São Paulo – USP, 2010.

Xiao, G., Zhang, X., Zhang, W., Zhang, S. e Su, H. **Visible-light-mediated synergistic photocatalytic antimicrobial effects and mechanism of Ag-nanoparticles@chitosan–TiO₂ organic–inorganic composites for water disinfection.** Applied Catalysis B: Environmental, Volumes 170–171, P. 255–262, 2015.

Xiaohui F. et al. **Controlling silica coating thickness on TiO₂ nanoparticles for effective photodynamic therapy.** Colloids and surfaces B: Biointerfaces v. 107, pp 220-226, 2013.

Yang,H. et al. **Application of nanosilver surface modification to RO membrane and spacer for mitigating biofouling in seawater desalination.** Water research, 43, pp. 3777-378, 2009.

Yin, R.; Dai, T.; Avci, O.; Melo, W.C et al. **Light based anti-infectives: ultravioleta C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond.** Curr Opin Pharmacol, v.13, n.5, p. 731-62, 2013.

Zha, J et al. **Sol–gel science, the physics and chemistry of sol–gel processing,** Ed. by C. J. Brinker and G. W. Scherer, Academic Press, Boston, xiv, 908 pp., bound—ISBN 0-12-134970-5, 1991.

Zhang, Y., Zhu, Y., Yu, J., et al. **Enhanced photocatalytic water disinfection properties of nanocomposites under visible light irradiation.** Nanoscale, 5 , pp. 6307–6310, 2013.

Zhang X et al. **Immobilizing silver nanoparticles onto the surface of magnetic silica composite to prepare magnetic disinfectant with enhanced stability antibacterial activity.** Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects, 375, pp. 186-192, 2011.