

Inativação fotocatalítica da *Staphylococcus aureus* usando TiO_2NT a $Ag-TiO_2NT$

Photocatalytical inactivation of *Staphylococcus aureus* by TiO_2NT and $Ag-TiO_2NT$

RESUMO

As matrizes de dióxido de titânio nanotubulares (TiO_2NT) tem ficado em evidencia por suas diversas aplicações, dentre elas a sua alta atividade fotocatalítica, tanto na degradação de moléculas quanto de microrganismos patogênicos. A prata por sua vez é reconhecida por sua alta atividade antimicrobiana. Desta forma, o presente trabalho investigou a eficiência na fotoinativação da bactéria gram positiva, *Staphylococcus aureus*, pelo método fotocatalítico utilizando uma lâmpada UVA, e nanotubos de dióxido de titânio sintetizados eletroquimicamente pelo processo de anodização. Os filmes foram expostos a um processo de fotodeposição da prata. Verificou-se que quanto maior o tempo de deposição da prata, maior a eficiência na inativação, porém, notou-se que o filme contendo somente os nanotubos (filme puro) obteve resultados equivalentes ao modificado com prata. Os resultados mostram que pequenas quantidades de prata podem ocupar os sítios ativos do semicondutor prejudicando o processo. Com maiores quantidades de prata, a atividade antimicrobiana pode estar relacionada não somente ao fotocatalisador mas também com a presença elevada de prata no material.

PALAVRAS-CHAVE: Dióxido de titânio. Fotocatálise. Fotodeposição de prata.

ABSTRACT

The nanotubular titanium dioxide (TiO_2NT) matrices have been highlighted by their diverse applications, including their high photocatalytic activity, both in the degradation of molecules and pathogenic microorganisms. Silver in turn is recognized for its high antimicrobial activity. Thus, the present work investigated the efficiency in photoinactivation of gram positive bacteria, *Staphylococcus aureus*, by the spread plate method (surface method) using a UVA lamp, and titanium dioxide nanotubes synthesized electrochemically by the anodization process. The films were exposed to a silver photo deposition process. It was found that the longer the silver deposition time, the greater the efficiency in inactivation, however, it was noticed that the film containing only the nanotubes (pure film) obtained results equivalent to those modified with silver. The results show that small amounts of silver can occupy the active sites of the semiconductor, impairing the process. With greater amounts of silver, the antimicrobial activity may be related not only to the photocatalyst but also to the high presence of silver in the material.

KEYWORDS: Photocatalysis. Silver photodeposition. Titanium dioxide.

Kauani Caldato

kauani96caldato@gmail.com

Departamento de química,
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, UTFPR, Pato Branco,
PR, Brasil.

Mariana de Souza Sikora

marianasikora@professores.utfpr.edu.br

Departamento de química,
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, UTFPR, Pato Branco,
PR, Brasil.

Taila Sabrina Mazzucato

tailamazzucatto@alunos.utfpr.edu.br

Departamento de química,
Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, UTFPR, Pato Branco,
PR, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

As matrizes nanotubulares de dióxido de titânio obtidas através do processo de anodização ficaram em evidência nos últimos anos devido a várias propriedades combinadas do material, como biocompatibilidade, alta superfície de contato e semicondutividade, por esse motivo, este nanocompósito tem sido utilizado de diversas maneiras, tais como em células solares, sensores, fotocatalisadores, implantes, sistemas de liberação de drogas, entre outros (LOSIC; SIMOVIC, 2009).

A sua utilização como fotocatalisador se dá na forma cristalina de anatase e rutilo, devido a sua alta área superficial combinados a propriedade de absorver luz na região ultravioleta fazendo com que os elétrons se movimentem da banda de valência para a banda de condução quando excitados, provocando assim a quebra de moléculas orgânicas e também a destruição da parede celular de alguns microrganismos e bactérias (STENGL, 2007, BARAM, 2009)

A bactéria gram positiva, *Staphylococcus aureus*, é um dos causadores de infecções tanto simples como mais severas no corpo humano, por este motivo pode ser considerada um problema de saúde pública (CRUVINEL; SILVEIRA; SOARES, 2011).

MATERIAL E MÉTODO

Os filmes nanoestruturados de dióxido de titânio (TiO₂NT) foram sintetizados eletroquimicamente pela técnica de anodização potencioestática, a uma temperatura constante de 40°C, durante 10 minutos com voltagem constante de 40 V. Para a síntese utilizou-se 50 mL de uma solução eletrolítica organo-aquosa (H₂O 9,5% v/v, SBF 0,5% v/v e NH₄F 0,75% m/m em etilenoglicol) como eletrólito. Como eletrodo de trabalho, utilizou-se placas de Ti_{CP} e um par de eletrodos de platina foi utilizado como contra-eletrodos.

Após a anodização, os filmes passaram por um tratamento térmico, utilizando uma rampa de aquecimento de 2°C min⁻¹ até o patamar de 450°C onde permaneceram por duas horas e após foram resfriadas naturalmente até a temperatura ambiente.

Para a adsorção da prata, os filmes já tratados termicamente ficaram em contato durante 24 horas com 40 mL de uma solução 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ de nitrato de prata (AgNO₃). Após isso, a mesma solução foi transferida para um reator fotoquímico contendo uma lâmpada UVA (9 W, 315-400 nm) que ficou em contato com a solução e o filme. Cada filme ficou em contato com a solução e a lâmpada UV durante diferentes tempos, como mostrado na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1 – Nomenclatura dos filmes e o tempo de fotodeposição de prata em luz UV submetido a cada um deles

Nomenclatura	Tempo de fotodeposição da prata (minutos)
F5m	5
F15m	15
F30m	30
F60m	60

Nomenclatura	Tempo de fotodeposição da prata (minutos)
Fpuro	-

Fonte: Autoria própria (2020).

Para os ensaios de inativação, a cepa do microrganismo gram positivo, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foi cultivada em caldo Mueller Hinton (21 g L⁻¹) a temperatura de 37°C durante 48 horas. Em seguida, a massa celular foi suspensa em solução salina 0,9% m/v. A padronização do microrganismo foi feita utilizando escala de Mc Farland 0,5, indicando uma concentração de 10⁸ UFC ml⁻¹.

Após a padronização, 20 mL da suspensão (bactéria + solução salina) foram adicionadas em 200 mL de caldo Muller Hinton chegando a uma concentração final de 10⁶ UFC mL⁻¹. Para a inativação das bactérias, utilizou-se uma lâmpada de luz UVA (9 W, λ = 315-400 nm).

A solução ficou sob agitação constante e temperatura ambiente durante 100 minutos (1h40min) tanto para o ensaio de crescimento, fotólise e fotocatalise com os filmes, onde retirou-se a cada 20 minutos uma alíquota de 1 mL do reator. Diluições seriadas foram realizadas em solução salina 0,9% m/v até 10⁻⁴, após isso foram retirados 100 µL de cada tubo para serem plaqueados pelo método spread plate (método de superfície) em ágar nutritivo (Kasvi, 28 g L⁻¹). O plaqueamento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, em temperatura de 37 °C por 24 horas e posteriormente, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

Também foi realizado ensaio com o filme sem adsorção de prata, para comparação de resultados. Para o estudo da inativação da bactéria gram positiva, realizou-se ensaios controles denominados escuro e fotólise, para que posteriormente pudesse ser avaliado somente o efeito do catalisador na reação.

O ensaio denominado escuro se deu sem a utilização da luz UV e sem a presença do catalisador, somente inoculando o microrganismo em meio reacional (caldo BHI) e o ensaio de fotólise se deu da mesma maneira, porém com a utilização da luz UV.

Os cálculos das bactérias consideradas unidades formadoras de colônia por mL de solução inicial (UFC mL⁻¹) foram obtidos através das placas com diluição 10⁻³, pois estas obtiveram uma maior visualização das unidades. A média e o desvio padrão dos valores foram calculados a partir do plaqueamento em triplicata.

Para o cálculo da porcentagem de eficiência do processo de inativação foi utilizada a equação (1), onde UFCT₀ diz respeito a quantidade de colônias no tempo 0 min e UFCT₁₀₀, a quantidade de colônias no tempo 100 min:

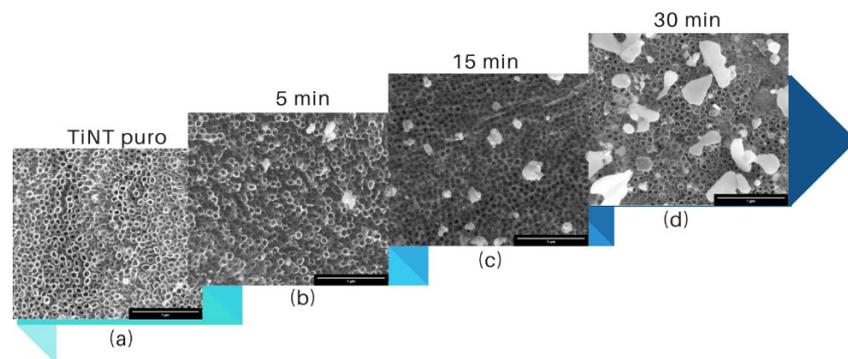
$$E\% = \frac{UFCT_0 - UFCT_{100}}{UFCT_0} \quad (1)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as micrografias dos filmes, nelas é possível verificar o efeito do tempo de fotodeposição da prata na morfologia dos filmes obtidos. Como

pode ser observado, o aumento do tempo torna mais visível as partículas de prata depositadas sobre os nanotubos de TiO₂. Em tempos curtos de fotodeposição há a presença de nanopartículas que aumentam para micropartículas em função do tempo de fotodeposição.

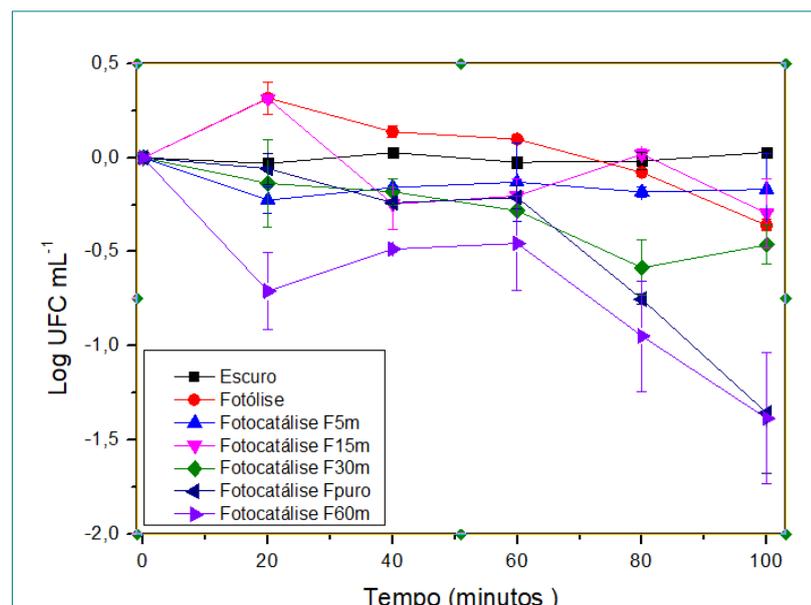
Figura 1 – Micrografias dos filmes de TiO₂ nanoestruturados crescidos à 40 V com do tempo da fotodeposição de prata (a) filme puro sem exposição à solução de AgNO₃. Filme submetido à (b) 5 min, (c) 15 min e (d) 30 min de radiação UV-A após adsorção de íons Ag⁺(1 x 10⁻³ mol L⁻¹) por 24 h.



Fonte: Autoria própria (2020).

Para a interpretação de resultados, as reações de crescimento e inativação foram consideradas como de primeira ordem (mecanismo de Langmuir), como representado na Figura 2 abaixo:

Figura 2 – Curva de inativação (fotocatálise e fotólise) e o crescimento da bactéria gram positiva *S. aureus* em função do tempo de reação.



Fonte: Autoria própria (2020).

Pode-se observar a partir da Figura 2, que a curva do ensaio escuro apresentou a manutenção de quantidade de microrganismo com o passar dos 100 minutos,

enquanto que para o ensaio de fotólise houve uma eficiência de inibição, assim como para as inativações fotocatalíticas utilizando os filmes sintetizados, como mostrado na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2 – Média e desvio padrão da eficiência dos processos fotolíticos e fotocatalíticos. As médias que compartilham uma letra não apresentam diferença estatística. médias que compartilham uma letra não apresentam diferença estatística.

Filme	Eficiência (média ± desvio padrão %)
Fotólise	56,19 ± 2,14 ^{b,c}
Fpuro	94,99 ± 2,40 ^a
F5m	50,95 ± 0,95 ^{b,c}
F15m	48,29 ± 10,8 ^c
F30m	65,07 ± 5,81 ^b
F60m	95,67 ± 2,47 ^a

Fonte: A autoria própria (2020).

A partir dos resultados de eficiência (Tabela 2) pode-se observar que apenas duas condições, o filme puro (Fpuro) e o submetido à fotorredução de prata durante 60 min (F60m), apresentaram diferença estatística quando comparados à inativação promovida apenas pela incidência de radiação UV (fotólise).

Este resultado indica que a fotodeposição de pequenas quantidades de prata, observadas nos filmes sintetizados com até 30 min de fotorredução, não são eficientes na inativação da bactéria. Uma possível explicação é que a prata depositada possa reduzir a área ativa do material fotocatalisador. Esta redução pode ser dada pela formação de nanopartículas de prata que podem impedir a adsorção da bactéria e conseqüentemente diminuir a probabilidade de ataque da membrana celular pelo radical hidroxila.

A atividade da prata como agente bactericida não é um mecanismo totalmente compreendido ainda, porém sabe-se que os íons de prata atacam sítios do microrganismo ligados ao funcionamento fisiológico deste, os íons são capazes de se ligar a proteínas da membrana celular e causar a destruição desta, também ligam-se ao DNA e impedem a replicação, causando a morte do microrganismo (LAN *et al.*, 2013).

Este fato explica os resultados de forma crescente e diretamente proporcional a porcentagem de eficiência do processo em relação ao tempo em que a prata passou pelo processo de adsorção nos sítios ativos do dióxido de titânio.

Já o funcionamento do TiO₂ como fotocatalisador é bem conhecido, este material, quando presente na fase anatase, possui um *bandgap* de 3,2eV, e quando fótons com energias superiores a esta são incididos sobre este material o elétron que estava presente na banda de valência (BV) é promovido a banda de condução (BC) formando uma lacuna (h⁺), as lacunas reagem com a água formando espécies reativas oxigenadas como radicais hidroxila (•OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical superóxido protonado (•HO₂). Estas espécies oxigenadas são as responsáveis pela destruição da camada proteica dos microrganismos (PODPORSKA-CARROLL *et al.*, 2015) (REGONINI *et al.*, 2013).

CONCLUSÃO

Desta forma, pode-se concluir que os catalisadores com 60 minutos de fotodeposição de prata e o filme puro, estatisticamente, apresentam uma mesma eficiência no processo de inativação da bactéria gram positiva, este processo pode ser explicado possivelmente pela morfologia do material, o que será estudado em trabalhos futuros.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo fomento à pesquisa.

REFERÊNCIAS

BARAM, N.; STAROSVESTSKY, D.; STAROSVESTSKY, J.; EPSHTEIN, M. Enhanced inactivation of E. coli bacteria using immobilized porous TiO₂ photoelectrocatalysis. **Electrochimica Acta**, v. 54, n. 12, p. 3381– 3386, 2009.

CRUVINEL, A. R.; SILVEIRA, A. R.; SOARES, J. S. Perfil antimicrobiano de Staphylococcus aureus isolado de pacientes hospitalizados em uti no Distrito Federal. **Cenarium Farmacêutico**, v. 4, p. 1–11, 2011. Disponível em: http://www.unieuro.edu.br/sitenovo/revistas/downloads/farmacia/cenarium_04_16.pdf. Acesso em: 1 set. 2020.

LAN, M. Y.; LIU, C. P.; HUANG, H. H.; LEE, S. W. Both Enhanced Biocompatibility and Antibacterial Activity in Ag-Decorated TiO₂ Nanotubes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 4–11, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075364>. Acesso em: 1 set. 2020.

LOSIC, D.; SIMOVIC, S. Self-ordered nanopore and nanotube platforms for drug delivery applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 6, n. 12, p. 1363–1381, 2009.

PODPORSKA-CARROLL, J.; PANAITESCU, E.; QUILTY, B.; WANG, L.; MENON, L.; PILLAI, S. C. Antimicrobial properties of highly efficient photocatalytic TiO₂ nanotubes. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 176–177, p. 70–75, 2015.

REGONINI, D.; BOWEN, C. R.; JAROENWORALUCK, A.; STEVENS, R. A review of growth mechanism, structure and crystallinity of anodized TiO₂ nanotubes. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 74, n. 12, p. 377–406, 2013.

ŠTENGL, V. BAKARDJIEVA, S.; MURFAFA, N.; ŠUBRT, J.; ÁNKOVÁ, H. M.; JIRKOVSKÝ, J. Preparation, characterization and photocatalytic activity of optically

transparent titanium dioxide particles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 105, n. 1, p. 38–46, 2007.