



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DE ARARAQUARA



CECILIA HELENA SOARES PORTO

FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA EM INSTRUMENTAL
ODONTOLÓGICO RECOBERTO COM
NANOPARTÍCULAS TiO_2 E Ag

Araraquara

2008



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DE ARARAQUARA



CECILIA HELENA SOARES PORTO

FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA EM INSTRUMENTAI
ODONTOLÓGICO RECOBERTO COM
NANOPARTÍCULAS TiO_2 E Ag

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Ortodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre em Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ary dos Santos Pinto.

Araraquara

2008

Porto, Cecília Helena Soares

Fotocatálise heterogênea em instrumental odontológico recoberto de nanopartículas TiO₂ e Ag / Cecília Helena Soares Porto. - Araraquara: [s.n.], 2008.

86 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador : Prof. Dr. Ary dos Santos Pinto

1. Nanopartículas 2. Prata 3. Esterilização 4. Bactérias 5. Raios ultravioleta I. Título

Comissão Julgadora

CECILIA HELENA SOARES PORTO

FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA EM INSTRUMENTAL
ODONTOLÓGICO RECOBERTO COM
NANOPARTÍCULAS TiO₂ E Ag.

Comissão Julgadora

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

PRESIDENTE E ORIENTADOR: _____
Prof. Dr. Ary dos Santos Pinto

2 .EXAMINADOR: -----
Prof. Dr. Elson Longo

3 .EXAMINADOR: _____
Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins

Araraquara, 2 de agosto de 2008.

DADOS CURRICULARES

CECILIA HELENA SOARES PORTO

NASCIMENTO 18/10/1957 – Ribeirão Preto-SP

FILIAÇÃO Geraldo Quariguasy Soares
Vincenzina Abbate Soares

1976/1979 Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas-PUCC/SP.

1983/1985 Curso de Especialização em Odontopediatria da Associação dos Cirurgiões-Dentistas de Araraquara, em convênio com a Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

1999/2001 Curso de Especialização em Ortodontia e Ortopedia Facial, Associação dos Cirurgiões-Dentistas de Araraquara, em convênio com a Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

2003/2004 Curso de Especialização em Administração dos Serviços de Saúde, pelo Centro de Pós-Graduação da UNAERP- Ribeirão Preto-SP.

2006/2008 Curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, nível Mestrado, Área de Ortodontia, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

SALMO 90 (Heb.91)

*Tu, que habitas sob a proteção do Altíssimo,
que moras à sombra do Onipotente,
dize ao Senhor: “Sois meu refúgio e minha cidadela,
meu Deus, em que eu confio.”*

É ele que te livrará do laço do caçador, e da peste perniciosa.

*Ele te cobrirá com suas plumas;
sob suas asas encontrarás refúgio.*

Sua fidelidade te será um escudo de proteção.

*Tu não temerás os terrores noturnos,
nem a flecha que voa à luz do dia, nem a peste que se propaga nas
trevas,*

nem o mal que grassa ao meio dia.

*Caiam mil homens à tua esquerda e dez mil à tua direita:
tu não serás atingido.*

*Porém, verás com teus próprios olhos, contemplarás o castigo dos
pecadores,*

porque o Senhor é teu refúgio.

Escolheste, por asilo, o Altíssimo.

*Nenhum mal te atingirá, nenhum flagelo chegará a tua tenda,
porque aos seus anjos Ele mandou que te guardem em todos os
caminhos.*

*Eles te sustentarão em suas mãos,
para que não tropeces em alguma pedra.*

*Sobre serpente e víbora andarás,
calcarás aos pés o leão e o dragão.*

*“Pois que se uniu a mim, eu o livrarei; e o protegerei, pois conhece
o meu nome.*

Quando me invocar, eu o atenderei; na tribulação estarei com ele.

Hei de livrá-lo e o cobrirei de glória.

Será favorecido de longos dias, e mostrar-lhe-ei a minha salvação.

DEDICO ESTE TRABALHO

Ao meu marido, Sizenando, aos meus filhos Thiago, Fernanda e Felipe, aos quais agradeço pelo imenso carinho, apoio e pela agradável convivência. Também, à minha nora, Betina, e ao meu neto Arthur.

Aos meus pais, Geraldo e Vincenzina, por todo o amor e por tudo o que fizeram para minha formação.

Aos meus irmãos, Pedro Henrique, Paulo Vitor, Ana Beatriz, pelo amor e cumplicidade.

Ao meu sogro, Sizenando, e a minha sogra, Julia (in memorian), pelo carinho com que me acolheram em sua família.

Os meus queridos, que sempre me ofereceram o ombro amigo, o incentivo, toda a força que eu precisei.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Ary dos Santos Pinto, pela orientação segura, pelos ensinamentos e pelo grande apoio na realização deste trabalho, pela convivência dedicada, incentivadora e amiga. Tomo o meu agradecimento e admiração.

Ao Prof. Dr. Elson Longo, meu reconhecimento pela sua importante contribuição na realização dos trabalhos, pela imensa paciência, boa vontade e pelo empenho.

A Profa. Dra Maria Cristina Gugelmin, pelo apoio, pela grandiosa colaboração e pelas boas idéias que contribuíram para o enriquecimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolito, por toda a atenção, disponibilidade e pelas informações transmitidas.

Ao Prof. Dr. Fábio Porto (in memorian), exemplo de profissional dedicado e competente.

Ao Prof. Dr. Celso Luis de Angelis Porto, por compartilhar afetosamente a sua sabedoria científica.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Marcos Macari, e Vice-Reitor, Prof. Dr. Herman Jacobus Cornelis Voorwald, pela oportunidade de propiciar-me o curso de Mestrado.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”–UNESP, nas pessoas de seu Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla, e de sua Vice-Diretora, Andréia Affonso Barreto Montandon.

Ao Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representado pela Chefe de Departamento, Profa. Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon, e pela Vice-Chefe, Profa. Dra. Lídia Parsekian Martins.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Jr. e pela Profa. Dra. Josimeri Hebling Costa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Dirceu Barnabé Raveli, minha imensa gratidão pela sua valiosa contribuição à realização desta pesquisa. Pelos ensinamentos, incentivo, pelo carinho e apoio que sempre recebi e pelo alegre convívio.

A Profa. Dra. Lidia Parsekian Martins, pelo exemplo de profissional e de pesquisador, pela atenção em todos os momentos em que precisei e pelas boas sugestões na qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga Gandini Junior, pelo exemplo de docente, por todo o apoio, ensinamentos transmitidos e respeito.

Ao Prof. Dr. João Roberto Gonçalves, pelo apoio, pelos ensinamentos e cordialidade.

Ao Prof. Dr. Maurício Tatsuei Sakima, pela atenção e pelo agradável convívio nas clínicas de graduação.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Dra. Josimeri Hebling Costa, Dra. Lourdes Aparecida Martins dos Santos Pinto, Dra. Elisa Maria Aparecida Giro, Dra. Ângela Cristina Cilense Zuanon, Dr. Cyneu Aguiar Pansani, Dr.

Fábio Cesar Braga de Abreu e Lima, Dra. Rita de Cássia Loiola Corc pela atenção a mim dispensada.

Às secretárias Célia Ap. Brogna B. da Silva e Sonia Maria Tircailo, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por toda a colaboração e atenção que recebi e pela cordialidade.

Aos funcionários do laboratório do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Antonio Cabrini (Totó) e Pedro César Alves, pelo apoio e por toda a boa vontade em me ajudar.

Aos funcionários do setor de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Mara Cândida Munhoz do Amaral, Rosângela Aparecida Silva Santos, Flávia Souza de Jesus e José Alexandre Garcia, pela atenção e pelo auxílio durante todo o curso.

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, sempre dedicados e atenciosos. Em especial à Ceres Maria Carvalho Galvão de Freitas, pela atenção e ajuda na formatação deste trabalho.

AGRADECIMENTOS AOS COLEGAS

À colega Amanda Fahning Ferreira Magno, um carinho especial pelo incentivo, pela amizade e pela boa vontade, pelo companheirismo que nos uniu em forças para juntas superarmos as dificuldades a nós impostas, as quais estamos vencendo uma a uma, cada uma à sua hora.

À colega Savana Maia, pela solidariedade, pelo carinho e pelos momentos alegres!

Ao colega Adriano Porto, sempre atencioso e prestativo. Obrigada pela paciência e pela amizade!

Ao colega André Monini, meu agradecimento pela agradável convivência, pelo apoio constante, pela troca, pelo carinho e respeito.

Aos colegas da turma antiga de mestrado, Deborah, por toda a sua ajuda e atenção; Luana, Renata, Rafael e Luís Guilherme, pela solidariedade, pelo apoio, companheirismo e pela prazerosa convivência. Sempre me lembrarei de vocês!

Às colegas da nova turma de mestrado, Marcela, Betina, Roberta (Bob), Fernanda, Denise e Simone, pelo apoio, carinho, pela amizade e alegria. Gosto muito de vocês!

AGRADEÇO AINDA

Ao GESTOS – Grupo de Estudos Ortodônticos e Serviços, pela disponibilidade do uso de seu equipamento, e a todas as suas funcionárias, Ozita, Juçara, Gisele, Márcia, Adriana e Natália, pela atenção a mim dispensada, pelo carinho e apoio.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos os meus familiares e amigos, que sempre torceram por mim , mesmo distantes!

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização desta pesquisa.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
3 PROPOSIÇÃO	41
4 CAPÍTULO 1	43
Introdução	45
Proposição	47
Revisão da literatura	47
Material e método	51
Resultados	57
Discussão	58
Conclusão	60
Referências	62
5 CAPÍTULO 2	64
Introdução	67
Proposição	70
Material e método	70
Resultados	79
Discussão	80
Conclusão	84
Referências	85
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	88
7 REFERÊNCIAS	91

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag	Prata
<i>bandgap</i>	Região entre a banda de condução e a banda de valência
BHI	Brain Heart Infusion
CAFHORE	Reator Fotocatalítico Coaxial
calomelano	Cloreto mercurioso
Mcl	Microlitros
Pka	Capacidade de penetração do ácido
singlete	Termo espectral em que o número quântico do spin do átomo é igual a zero
TiO₂	dióxido de titânio
Ufc	unidade formadora de bactéria
UV	Ultravioleta

PORTO, CHS. *Fotocatálise heterogênea em instrumental odontológico recoberto com nanopartículas TiO₂ e Ag*. [Dissertação]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

RESUMO

A nova fronteira científica - a nanotecnologia - permite a fabricação de produtos com características diferenciadas pela modificação das propriedades dos materiais no nível atômico, manipulando átomos e moléculas com aplicação no processo de esterilização de instrumentos odontológicos. O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação da ação autolimpante e esterilizante do recobrimento de instrumentos odontológicos com nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e prata Ag desencadeada pelo processo de fotocatalise heterogênea por ação da luz ultravioleta e da luz branca. Testes bacteriológicos foram realizados com espátulas de manipulação de cimento odontológico contaminadas com 10 mcrI para cada microrganismo, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomona aeruginosa*, e após expostas a luz branca e a luz ultravioleta. A *Pseudomona aeruginosa* foi inativada após exposição de 120 minutos à luz UV, indicando a ocorrência do processo de fotocatalise heterogênea no recobrimento com nanopartículas de TiO₂ e Ag, e não foi inativada pela exposição à luz branca, com a ocorrência de crescimento bacteriano. O *Enterococcus faecalis* não foi inativado pela exposição à luz UV e à branca. Os testes realizados com *Staphylococcus aureus*, *Bacilo Subtilis* e com *Escherichia coli* foram positivos para o crescimento das bactérias, independente do tempo de exposição à luz UV (15, 30 e 60 minutos). Os testes realizados com *Micrococcus luteus* foram negativos para o crescimento das bactérias independente do tempo de exposição à luz UV (15, 30 e 60 minutos). O processo de fotocatalise é uma tecnologia alternativa que envolve a geração de radicais hidroxilas altamente oxidantes, que podem reagir com grandes variedades de compostos orgânicos, constituindo uma tecnologia limpa e promissora.

PALAVRAS-CHAVE: Nanopartículas; Prata; Esterilização; Bactérias; ultravioleta

PORTO, CHS. *Heterogeneous photocatalysis of TiO₂ and Ag nanoparticles coating of dental instruments*. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2008.

ABSTRACT

This novel scientific development – nanotechnology – has contributed to the creation of products with unique features through the modification on the properties of the materials in relation to their atomic level by manipulating atoms and molecules to be used in the process of dental instruments sterilization. . The objective of this study is to evaluate the self-cleaning action of TiO₂ and Ag nanoparticles coating by the photocatalysis process under UV and visible light irradiation. Microbiologic tests were done using dental cement spatulas contaminated with 10 mcrl *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* and exposed to UV and visible light irradiation for 120 min, respectively. *Pseudomonas aeruginosa* proved inactive under 120 min UV light irradiation time, thus confirming the photocatalytic activity of TiO₂ and Ag, which was not confirmed under visible light irradiation. *Enterococcus faecalis* did not confirm the photocatalytic activity of TiO₂ and Ag under UV and visible light irradiation. Tests done with *Stafilococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* did not confirm the photocatalytic activity regardless the UV light irradiation time (15, 30 and 60 minutes); however, tests done with *Micrococcus luteus* confirmed the photocatalytic activity regardless the light irradiation time (15, 30 and 60 minutes). The photocatalysis process is an alternative technology which generates highly oxidizing hydroxyl radicals that react with a wide variety of organic compounds, thus developing a clean and promising technology.

KEYWORDS: Nanoparticles; Silver; Sterilization; Bacteria; Ultraviolet Rays

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Odontologia tem passado por uma conscientização em relação às doenças transmissíveis pelo atendimento a pacientes infectados, devido à grande prevalência de doenças, como hepatite B, AIDS, tuberculose e sífilis, entre outras. O cirurgião-dentista e toda a sua equipe estão vulneráveis a doenças pelo fato de os microrganismos bucais existentes fazerem parte de uma microflora natural, atuarem como comensais ou patogênicos. Saramanayaky et al.²² (1991) mostraram ser extremamente necessário o controle de sua disseminação, pois é comprovado que os cirurgiões-dentistas e equipe são suscetíveis a diversas doenças em seu local de trabalho (Cottone et al.⁹, 1996).

A infecção cruzada resulta da transmissão de agentes infecciosos entre os pacientes e a equipe que estaria lidando com eles no momento clínico. Para que ela ocorra, é necessário haver uma fonte, um veículo e uma rota de transmissão (Saramanayaky,²³ 1993). Torna-se, portanto, de vital importância que os profissionais aprendam a trabalhar de maneira segura, prevenindo assim a transmissão.

Segundo Kirchhoff¹⁴ (1987), a autoclave é usada a 121°C, em 15 libras, por 15 minutos ou com tempo reduzido, com 39 libras, a 132°C. Se utilizada autoclave química, a temperatura será de 132°C a 40-20 libras por um minuto. A estufa requer 60 minutos de 160°C a 171°C para a esterilização. Segundo Payne¹⁹ (1986), os métodos mais utilizados são autoclave a 115,5°C, com 15 libras de pressão, por 15 a 40 minutos; calor seco a 160° C, por 1 a 2 horas, e autoclave química a

115,5° C, com 20 a 40 libras e pressão por 20 minutos. Já Consolaro et al.⁷ (1991) disseram que se deve utilizar a estufa a 160°C por 60 minutos, a autoclave a 121°C e 1atm/cm² por 2 minutos, e a autoclave química a 130°C e 1,4atm/cm² por 20 minutos.

O Ministério da Saúde⁵ (1994) recomenda para a autoclave por gravidade 121°C (1atm. de pressão) por 20 minutos, para a autoclave por autovácuo 132°C por 4 minutos, e para a estufa 160°C por 2 horas ou 170°C por 1 hora. Entretanto, para a autoclave química, embora esta seja recomendada na literatura, têm sido relatados problemas, como custo e dificuldade de instalação, bem como quanto à aquisição dos produtos químicos a serem utilizados. É oportuno ressaltar outra desvantagem da autoclave química, o vapor resultante que deve ser ventilado para o exterior por ser tóxico, havendo, assim, a necessidade de se realizar uma instalação complexa para operar com esse método.

Quanto à esterilização realizada com raios ultravioleta, Brunharo et al.⁶ (1994), por meio de estudo, demonstraram que não há uma padronização desses raios dentro do aparelho e que não foi alcançada a esterilização em nenhuma área interna testada.

Em um trabalho de Johnston et al.¹² (1991), empregando fitas de esporos como indicador de esterilidade, foram testadas a efetividade da estufa Cox, a da autoclave Dentronix 5000 e a do forno convencional Farberware utilizando a temperatura e o tempo indicados pelo fabricante. Crescimento de microrganismos foi encontrado em vários setores da estufa e da autoclave. Nesse mesmo trabalho, foi encontrada

variação de temperatura em vários setores dos esterilizadores, tendo a temperatura, em alguns setores da estufa e da autoclave, ficado abaixo do recomendado.

Os ortodontistas têm usado muitos os métodos de esterilização em autoclave a 135°C por 3min30 e a estufa a 190°C por 6 minutos pelo rápido ciclo de esterilização que oferecem, diminuindo assim o problema da necessidade de um grande número de instrumentos à disposição.

A nova fronteira científica - a nanotecnologia -, que é a construção de estruturas e materiais em escala nanométrica, em medidas equivalentes a um milímetro dividido por um milhão de vezes e tem permitido a fabricação de produtos com características diferenciadas porque modifica as propriedades dos materiais no nível atômico. Nano é um prefixo grego que significa anão. Nanotecnologia refere-se a qualquer material, dispositivo ou processo cuja principal propriedade derive da nanoescala, que compreende tamanhos de 0,1 a 100 nanômetros (nm). A manipulação de átomos em uma escala um bilhão de vezes menor que o metro ou um milhão de vezes menor que o milímetro representa um espaço suficiente para, no máximo, dez átomos. Portanto, a nanotecnologia consiste em técnicas da manipulação de materiais em escala de milionésima parte de um milímetro.

O novo material nanoparticulado - forma autolimpante de instrumental - é um revestimento constituído por um filme cerâmico de dióxido de titânio (TiO₂) que agrega propriedades bactericidas à superfície

do mesmo, permitindo a esterilização sob o efeito da luz negra (Vasconcelos,²⁹ 2006). Esse processo promove a interação do dióxido de titânio que, sob a ação do UV, degrada a matéria orgânica - “esse processo físico-químico é semelhante à ferrugem que cresce sobre uma base de ferro, sob a ação da temperatura e da umidade, absorvendo e reagindo com o oxigênio”. Permite agregar sobre várias superfícies agentes - como a prata, um material conhecido por sua propriedade bactericida há séculos – que, por meio de cargas positivas (íons de prata), atraem as cargas negativas das bactérias e causam a ruptura de sua membrana celular em função da diferença de potencial entre a parte interna e a externa do microrganismo, provocando sua morte. (Vasconcelos,²⁹ 2006).

A fotocatalise heterogênea é um dos processos oxidativos que tem demonstrado uma tecnologia promissora na oxidação/degradação de contaminantes orgânicos. Muitos catalisadores têm sido testados, entre eles o dióxido de titânio, que é encontrado em várias formas. Entre elas, as mais abundantes são a anátase, a rutilo e a brookite. A forma brookite é estável apenas em baixa temperatura e, assim, praticamente não é utilizada. A forma rutilo é a única que, em altas temperaturas, desempenha suas propriedades elétricas, óticas e térmicas, sendo, portanto, estudada. As propriedades da forma anátase são pouco conhecidas (Reddy et al.,²⁰ 2002).

O processo da fotocatalise heterogênea envolve a geração do par elétron-lacuna (e^-/h^+), quando um óxido de metal semiconductor é ativado por radiação UV, com energia maior ou igual à do seu *bandgap*.

Essas espécies podem se recombinar ou migrar para a superfície dos catalisados, reagindo com espécies adsorvidas. O poder redutor dos elétrons foto gerados permite a redução de alguns metais e do oxigênio dissolvido, formando o íon radical peróxido (O_2^-). O oxigênio apresenta a função de seqüestrador de elétrons, impedindo a recombinação do par e^-/h^+ , que é apontada como o principal fator limitante para o rendimento do processo. Os buracos foto gerados, poderosos oxidantes, são capazes de gerar radicais hidroxilas ($-OH$), oxidando a molécula de água ou $-OH$ previamente adsorvidos na superfície do semiconductor. (Cordeiro et al.,⁸ 2004)

O objetivo do presente trabalho foi estudar e testar o processo de fotocatalise heterogênea na degradação protéica das bactérias que leva à morte celular. A nova metodologia permite a esterilização de instrumentais a partir do recobrimento dos mesmos com nanopartículas de dióxido de titânio, com economia de tempo e de recursos. A finalidade do estudo é a de proporcionar melhora no nível de esterilização dos instrumentais e mudança nos padrões do sistema de biossegurança.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A eficiência da esterilização depende, em parte, também do material a esterilizar, que deve estar livre de resíduos orgânicos. Na opinião de Simpson, Wittaker²⁴ (1979), a limpeza e a secagem dos instrumentos seriam fundamentais para a eficiência da esterilização. O emprego de ultra-som na limpeza de instrumentos cirúrgicos de corte seria indicado para evitar o risco de infecção durante a lavagem e eliminar os resíduos aderidos sobre os mesmos.

Bekbölet, Araz² (1996) confirmaram a inativação de *Escherichia coli*, em seu estudo sobre esterilização de amostras de superfície de água, usando TiO₂ como fotocatalizador mediante irradiação de luz ultravioleta com comprimento de onda de 360nm, 8 w. O tempo para a completa inativação das bactérias foi de após 60 minutos.

A grande sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* a UV-A foi reportada por Fernandez, Pizarro¹⁰ (1996). A exposição à UV-A (365nm, 120 kJ m⁻²h⁻¹) foi eficaz na eliminação desses microrganismos, mas não afetou a viabilidade das células de *Escherichia coli*. A ação microbicida do processo fotocatalítico com TiO₂ revelou que os vírus são mais sensíveis ao processo, seguidos pelas células bacterianas, e estas pelos esporos bacterianos. Isso sugere que diferentes microrganismos respondem de maneiras diferentes ao fotocatalizador TiO₂ devido as suas

diferenças estruturais, particularmente no que diz respeito à complexidade e à espessura do envelope celular.

Kikuchi et al.¹³ (1997) informaram que a atividade bactericida do processo fotocatalítico com TiO₂ usando irradiação UV-A e oxigênio como agente oxidante tem sido atribuída à geração de espécies reativas de oxigênio. Os radicais hidroxilas (OH) e os ânions superóxidos (O₂⁻), altamente reativos com amostras biológicas, são considerados as espécies principais produzidas durante o processo. Outras espécies, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroperóxil (HO₂) e oxigênio singlete (O₂), têm sido também consideradas.

Sunada et al.²⁵ (1998) examinaram o efeito bactericida de um filme de dióxido de titânio de 0,4 nm de espessura com a finalidade de degradar endotoxinas de *Escherichia coli* por meio da fotocatalise heterogênea. Os filmes foram preparados com uma solução de isopropóxide de titânio a 500⁰C. A ativação das bactérias de *Escherichia coli* ocorreu conforme o número padrão e os nutrientes colocados nas placas de Agar. As concentrações de endotoxinas foram determinadas pelo teste Limulus. Quando as células de *Escherichia coli* foram eliminadas pela fotocatalise de TiO₂ sob irradiação da luz ultravioleta, as endotoxinas das células também foram degradadas eficientemente, e, assim, os resultados mostraram a perfeita ação dessa técnica, com um excelente efeito bactericida. Os autores sugeriram que esse procedimento

é perfeitamente viável na proteção contra contaminações e em esterilizações na área médica.

Segundo Nogueira, Jardim¹⁶ (1998), TiO_2 , entre outros semicondutores Cds , ZnO , WO_3 , ZnS , FeO_3 , podem agir com sensibilizadores em processos de oxidação e redução mediados pela luz devido a sua estrutura eletrônica. Entretanto, a combinação de fotoatividade e fotosensibilidade não é muitas vezes satisfatória, como ocorre, por exemplo, com o semicondutor Cds que, apesar de absorver radiação de até 510nm, sofre fotocorrosão quando irradiado, gerando Cd^{2+} e enxofre, o que inviabiliza a sua utilização em processos de descontaminação. Entre os semicondutores, o TiO_2 é o mais amplamente estudado devido principalmente às suas não toxicidade, fotoestabilidade e estabilidade química em uma ampla faixa de pH. O TiO_2 existe em três formas alotrópicas: anástase, rutilo e brookite, sendo as duas primeiras as mais comuns. A forma rutilo é inativa para a fotodegradação de compostos orgânicos, não sendo ainda totalmente esclarecida a razão para tal, ainda que a baixa capacidade de adsorção de O_2 em sua superfície seja apontada como um dos possíveis fatores. Entre os diferentes fabricantes, o TiO_2 (fabricado pela Degussa, $\text{TiO}_2 \text{ P}_{25}$) é o mais comumente utilizado devido à sua alta fotoatividade quando comparado a outras fontes. Isso se deve à sua alta área superficial, em torno de $50\text{m}^2/\text{g}$, e à sua complexa microestrutura cristalina, resultante de seu

método de preparação que promove melhor separação de cargas inibindo a recombinação.

Zioli, Jardim³¹ (1998), estudando o mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisados por TiO₂, relataram que o passo primário no mecanismo oxidativo ocorre pelo ataque do radical OH sobre o substrato, não sendo, entretanto, possível adotá-lo como mecanismo exclusivo. Mecanismos de oxidação direta via lacunas fotogeradas e via estados excitados do oxigênio são também possíveis, embora com menor frequência. De fato, a contribuição de um ou outro mecanismo, em geral, dependerá de muitos fatores, tais como das cargas de superfície (pH) e das propriedades do substrato, como pka e estrutura. Independentemente do mecanismo seguido, a fotocatalise tem se mostrado uma tecnologia bastante promissora na eliminação de poluentes e, juntamente com outros tipos de processos oxidativos emergentes, certamente deverá substituir, em médio prazo, muitas das chamadas tecnologias convencionais.

Oguma et al.¹⁷ (1998) observaram que a velocidade de fotoreativação de *Escherichia coli* após irradiação UV/TiO₂ foi menores que aquela ocorrida somente com irradiação UV, apesar de nenhuma diferença ter ocorrido entre as velocidades de inativação pela irradiação UV com ou sem TiO₂. Assim, mesmo que a irradiação feita somente com UV tenha uma boa eficiência na inativação da biomassa, a presença de

TiO₂, pelos motivos acima expostos, poderá assegurar maior benefício ambiental, uma vez que promove danos irreversíveis às células bacterianas, evitando uma fotorreativação posterior.

Ainda segundo Nogueira, Jardim¹⁶ (1998), muitos catalisadores têm sido testados, sendo o dióxido de titânio, na forma cristalina anatase, o que parece ter características mais importantes, como alta estabilidade, bom desempenho e baixo custo. O processo envolve a geração do par elétron-lacuna (e-/h+) quando um óxido de metal semiconductor é ativado por radiação ultravioleta, com energia maior ou igual à do seu *bandgap*. Essas espécies podem se recombinar ou migrar para a superfície do catalisador, reagindo com espécies adsorvidas. O considerável poder redutor dos elétrons fotogerados permite a redução de alguns metais e do oxigênio dissolvido, formando o íon radical superóxido O₂⁻. O oxigênio apresenta uma importante função como seqüestrador de elétrons, impedindo a recombinação do par e-/h+, que é apontada como o principal fator limitante para o rendimento do processo. Os buracos fotogerados, poderosos agentes oxidantes, são capazes de gerar radicais hidroxila (-OH), oxidando moléculas de água (ou - OH) previamente adsorvidas na superfície do semiconductor.

Conforme nos informaram Tryk et al.²⁸ (2000), agentes oxidantes são capazes de gerar radicais hidroxilas (OH), oxidando moléculas de água ou - OH previamente adsorvidas na superfície do

semicondutor. Além de promover a total mineralização de uma grande variedade de contaminantes orgânicos, as fotooxidações com TiO_2 são promissoras para a eliminação de microrganismos em muitas aplicações, como materiais autolimpantes e auto-esterilizante. No Japão, uma das aplicações mais importantes da tecnologia fotocatalítica é o uso de azulejos de cerâmica auto-esterilizante para hospitais, particularmente em salas cirúrgicas, ao contrário dos bactericidas comuns. Os azulejos revestidos com TiO_2 são continuamente ativos enquanto houver iluminação.

Otaki et al.¹⁸ (2000) estudaram a inativação de três espécies de microrganismos, *Escherichia coli*, bacteriófago QB e *Cryptosporidium parvum*, por desinfecção fotocatalítica com TiO_2 , utilizando irradiação UV ($0,2 \text{ mwcm}^{-2}$ em 254nm) ou luz negra ($7,0 \text{ mwcm}^{-2}$, em 360nm). Como as células de *Escherichia coli* foram sensíveis às irradiações UV-C e UV-A, não houve diferença significativa entre a inativação feita com ou sem TiO_2 . Quanto ao vírus, estes apresentaram sensibilidade somente para irradiação UV-C, e, assim, o efeito do TiO_2 não pôde ser observado nessa irradiação. Contudo, o efeito aditivo do TiO_2 pôde ser observado claramente na inativação de QB com irradiação UV-A e de *Cryptosporidium parvum* com irradiação UV-C ou UV-A, porque esses microrganismos foram resistentes à irradiação de luz apesar de a eficiência fotocatalítica para o protozoário ter sido mais rápida com UV-C do que com UV-A.

De acordo com Ashikaga et al.¹ (2000), TiO_2 absorve UV-A eficientemente e exibe atividade fotocatalítica. A ação bactericida da fotocatalise heterogênea UV-A/ TiO_2 vem sendo testada em microrganismos com diferentes fotossensibilidades e alta eficiência foi encontrada em todos os casos estudados, particularmente o mais resistente, o *Enterobacter* cloacal. Este microrganismo normalmente é encontrado no solo e na água e, devido a um eficiente sistema defensivo antioxidante, não é inativado pela irradiação UV-A. Entretanto, em todos os casos estudados, doses subletais de UV-A na presença de TiO_2 foram eficientes na eliminação microbiana.

Bertazzoli, Pelegrini³ (2002) testaram o tratamento de efluentes aquosos industriais baseados em processos biológicos de degradação através das variações de pH e processo eletroquímico de oxidação anódica com óxido metálico envolvendo a formação de radicais hidroxilas (OH). Os autores salientaram que os resultados conseguidos com a aplicação dessa técnica indicam metodologia eficiente, com real possibilidade de aplicação, em grande escala, na indústria de papel e celulose, na indústria têxtil, no tratamento de efluente de aterros sanitários, bem como no campo da esterilização hospitalar.

Kondo et al.¹⁵ (2003) avaliaram a eficiência de um sistema fotocatalítico na destruição de microrganismos presentes em ambientes interiores contaminados, baseando-se no emprego do catalisador TiO_2 na

presença de irradiação UV. Um fotorreator anular contendo uma suspensão de TiO_2 (anástase P₂₅, Degussa) foi estimulado por meio de uma lâmpada de luz negra de 30 W de potência, com máxima de emissão em 365nm, o qual foi conectado à saída de um aparelho de ar condicionado de 7500 BTUs para que todo o ar que saísse do aparelho de ar fosse então forçado a passar pelo fotorreator. Assim, os microrganismos presentes (bactérias e fungos) foram caracterizados pelo contato com uma placa de Petri contendo os meios de cultura APC e Agar Batata durante 30 minutos. Após a exposição às mesmas, foram incubados durante 48 horas a uma temperatura de 37⁰C. Todos os experimentos foram em triplicatas. Os resultados apresentados nesse trabalho demonstraram a possibilidade de se utilizar o catalisador TiO_2/UV na destruição de microrganismos presentes no ar de ambientes fechados, já que o fotorreator requer manutenção mínima. No entanto, ainda são necessários estudos mais aprofundados para viabilizar o seu uso em escala comercial.

Sunada et al.²⁶ (2003), estudando o mecanismo de inativação de células *Escherichia coli* através da ação oxidativa exercida pelo processo UV/ TiO_2 , observaram que a reação é iniciada por uma decomposição parcial da membrana externa, causada pelas espécies reativas produzidas no processo fotocatalítico. Observaram também que, nessa etapa, não há a perda total da viabilidade. Contudo, há alterações na permeabilidade da membrana externa, o que possibilita que as

espécies reativas alcancem a membrana citoplasmática e que ocorra a peroxidação dos lipídeos da membrana citoplasmática, a perda da viabilidade e, finalmente, a morte celular.

Em estudo de desinfecção fotocatalítica, Cordeiro et al.⁸ (2004) testaram os microrganismos *Escherichia coli* e *Pseudomonas SP*, obtidos de um sistema ambiental poluído. Esses organismos foram cultivados em meio de gelose simples e incubados a 35^o-37^oC, por 24-48 horas, e as culturas, após o crescimento, estocadas a 5^oC. As bactérias, conseguidas a partir das culturas-estoque, foram obtidas pelo crescimento em caldo simples a 30^oC e 15 rpm por 24 horas. O fotocatalizador usado nesse trabalho foi o TiO₂ (P₂₅Degussa), adicionado às soluções contendo as suspensões celulares imediatamente antes da reação fotocatalítica. Os experimentos foram conduzidos em sistemas distintos, todos em duplicata, com e sem TiO₂, variando-se o tempo de exposição à irradiação UV de 5 a 20 minutos, na concentração de TiO₂ de 0 a 1mg ml⁻¹ e concentração celular inicial de 10⁴ a 10¹⁰UFCmL⁻¹. Dos resultados obtidos nas condições experimentais utilizadas, concluiu-se que a taxa de sobrevivência das espécies bacterianas estudadas diminui quando se reduz a concentração celular inicial, aumentando-se a intensidade luminosa, o tempo de exposição à irradiação UV ou a dosagem de TiO₂ até a concentração de 1mg/ml. Foi detectada maior resistência para *Escherichia coli* em relação à *Pseudomonas sp* para os dois processos. O desempenho dos processos de fotodegradação, com ou sem TiO₂,

mostrou-os eficientes na descontaminação de água, podendo-se considerá-los métodos viáveis no tratamento de água.

Rincón, Pulgarin.²¹ (2005) reportaram-se à desinfecção por fotocatalise de água contaminada com *Escherichia coli* e *Bacillus sp* em uma larga comunidade de bactérias. As reações de fotocatalise foram conduzidas por um comum reator coaxial CAPHORE, utilizando TiO₂ P-25 da Degussa. *Escherichia coli* foi mais sensível do que *Bacillus sp* no tratamento de fotocatalise. A inativação da comunidade de bactérias foi dependente da matéria orgânica e da concentração de oxigênio dissolvido. A *Escherichia coli* foi mais sensível ao tratamento do que *Enterococcus sp*, coliformes e Gram negativos. Depois da fotocatalise, nenhuma bactéria foi observada após 24 horas no escuro. Entretanto, um pequeno número de bactéria esteve presente na água usada. O tempo efetivo para a total inativação da bactéria foi subsequente a um período no escuro entre 24 e 48 horas, este tempo apenas para *Enterococcus sp* e grupo de coliformes.

Segundo Tuboy²⁷ (2005), a luz ultravioleta é uma radiação eletromagnética com menor comprimento de onda que a luz visível, entretanto com maior comprimento de onda que os raios X (quanto menor o comprimento de onda, maior a energia). A luz UV tem comprimento de onda entre 100 nm a 400 nm e compreende menos que 7% do espectro

solar e pode ser subdividida em UV- a, UV- b, UV- c.* Luz UV-A - 320 nm a 400 nm, (3,10 eV - 3,94 eV) e comprimento de onda longo (luz negra). Sofre pouca absorção pelo O₃ estratosférico. É importante para sintetizar vitamina D. Excesso de exposição pode causar queimaduras e, a longo prazo, envelhecimento precoce. Luz UV-B - o comprimento de onda média se concentra entre 280 nm a 320 nm (3,94 eV - 4,43 eV). É fortemente absorvida pelo ozônio estratosférico. É prejudicial à saúde humana, podendo causar queimaduras e, a longo prazo, câncer de pele. É utilizada para medir a concentração de ozônio. Luz UV-C – com comprimento de onda curto, compreendem o espectro de 100 nm a 280 nm, (6,20eV-10,2eV) e são completamente absorvidos pelo O₂ e O₃ estratosférico e, por isso, não chegam à superfície da terra, sendo utilizados na esterilização da água e material cirúrgico.

Yuranova et al.³⁰ (2006) avaliaram a inativação de *Escherichia coli* em tecidos de algodão por meio da fixação de nanopartículas de prata. A avaliação da ação bactericida da composição algodão-prata foi comparada com a de tecidos de algodão contendo camadas de Ag e TiO₂. Os resultados indicaram que nos tecidos de algodão sem camadas de Ag ou Ag-TiO₂ e apenas submetidos à irradiação UV não foi obtida eficiência na eliminação da *Escherichia coli* e, apenas quando existiu a cobertura de nanopartículas de Ag ou Ag-TiO₂,

* Fonte: <http://satelite.cptec.inpe.br/uv/R-UV.html#espectro>.

houve eficiência no tempo de inativação da *Escherichia coli*, tendo sido a melhor “performance” em escala escura e não no claro.

A desinfecção por fotocatalise de bactérias patogênicas em água foi investigada por Hu et al.¹¹ (2007) pela aplicação de uma irradiação de luz visível sobre uma película de óxido de titânio/prata. A fotocatalise mostrou ser um método efetivo para matar *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O processo de destruição da parede celular e o da membrana celular ocorreram devido à absorção de radicais OH, e isso foi verificado por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados sugeriram que a degradação fotocatalítica (interação das forças eletrostáticas) da estrutura celular causa a morte da célula.

Bidoia et al.⁴ (2007) relataram que o tratamento eletrolítico é potencialmente útil especificamente como um processo de desinfecção de águas de abastecimento. Avaliaram o anodo de titânio com 70% de TiO₂ mais Ru O₂ para desinfecção da água contaminada com *Escherichia coli* ou *Streptococcus aureus* por meio de tratamento eletrolítico. Um reator eletroquímico (anodo TiO₂ Ru O₂) e catodo de aço inoxidável na razão de 500l h⁻¹ a 3 amperes inviabilizaram os microrganismos por oxidação anódica, pela formação de radicais OH e outros oxidantes gerados pela eletrólise, bem como pelo gradiente de pH próximo aos eletrodos, que é alto, de aproximadamente 14, e que afeta os microrganismos. A *Escherichia coli* teve decréscimo de 80% das colônias em 60 minutos de

tratamento, enquanto as colônias de *Staphylococcus aureus* foram inviabilizadas em 100% após 30 minutos de tratamento.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propõe avaliar in vitro a esterilização do instrumental odontológico com ativação de nanopartículas de TiO₂ pelo processo de fotocatalise heterogênea, desencadeada pela luz UV. Dessa forma, o propósito desta pesquisa foi analisar, mediante a elaboração de dois estudos, os seguintes objetivos específicos:

1. o processo de fotocatalise heterogênea ativada pela exposição à luz UV e à branca em espátulas odontológicas recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag e contaminadas com as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus Faecalis*;

2. o processo de fotocatalise heterogênea ativada por diferentes tempos de exposição à luz UV, de 15, 30 e 60 minutos, em espátulas odontológicas recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag, e contaminadas pelas bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus Luteus*.

CAPÍTULOS

4 CAPÍTULO 1

FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA ATIVADA POR LUZ UV E BRANCA EM ESPÁTULAS COM REVESTIMENTO (UMA OU TRÊS CAMADAS DE NANOPARTÍCULAS TiO₂ E Ag) CONTAMINADAS COM *ENTEROCOCCUS FAECALIS* E *PSEUDOMONAS AUREGINOSA*

HETEROGENEOUS PHOTOCATALYSIS OF TiO₂ AND Ag NANOPARTICLES
COATING OF DENTAL INSTRUMENTS (ONE OR THREE LAYERS)
CONTAMINATED WITH *ENTEROCOCCUS FAECALIS* AND *PSEUDOMONAS
AERUGINOSA* UNDER UV AND VISIBLE IRRADIATION

Cecilia Helena Soares PORTO*

Ary dos Santos PINTO*

Elson LONGO*

Antonio Carlos PIZZOLITO*

Sizenando de Toledo PORTO NETO*

RESUMO**

A nanotecnologia, ciência do minúsculo, tem gerado produtos capazes de manipular átomos e moléculas com aplicação no processo de esterilização de instrumentais odontológicos. OBJETIVO - O objetivo do trabalho foi realizar uma avaliação da ação autolimpante e esterilizante do recobrimento de instrumentos odontológicos com nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e prata (Ag), desencadeada pelo processo de fotocatalise heterogênea, pela luz ultravioleta (UV) e luz branca. MATERIAL E

* Pós-graduando em Odontologia, Faculdade de Odontologia-UNESP, Araraquara-SP, Brasil

* Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia-UNESP, Araraquara-SP, Brasil

* Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica, Instituto de Química-UNESP /UFSCar, Araraquara-SP, Brasil.

* Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP, Araraquara-SP, Brasil.

* Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia-UNESP, Araraquara-SP, Brasil

** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas – Área de Ortodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre em Ortodontia.

Endereço para correspondência: Rua Capitão Adão Pereira de Souza Cabral, 766; São Carlos-SP, CEP 13560-000

e-mail : ceciliaporto@uol.com.br

MÉTODO - Testes bacteriológicos foram realizados em espátulas de manipulação de cimento odontológico com dois tipos de revestimento (uma ou três camadas) recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag (*coating*), contaminadas com 10mcrI para cada microrganismo, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Após a contaminação, as espátulas foram expostas à luz ultravioleta e à luz branca por 120 minutos. Em seguida, transferidas para tubos contendo meio BHI (Brain Heart Infusion), incubados a 35°-37°C. Foram feitas leituras em intervalos de 24 horas até 96 horas para verificação do crescimento das bactérias, e testes de controle e recuperação foram realizados. **RESULTADO** - A *Pseudomonas aeruginosa* foi inativada após exposição de 120 minutos à luz UV, indicando a ocorrência do processo de fotocatalise heterogênea no recobrimento com nanopartículas de TiO₂ e Ag, e não foi inativada pela exposição à luz branca, com a ocorrência de crescimento bacteriano. O *Enterococcus faecalis* não foi inativado pela exposição à luz UV e à branca nas espátulas de cimento odontológico recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag, nas leituras de até 96 horas. **CONCLUSÃO** - Não houve influência do tipo de revestimento, uma ou três camadas, nos resultados. Verificou-se a ocorrência da fotocatalise heterogênea pela exposição à luz UV da *Pseudomonas aeruginosa*, mas não para o *Enterococcus fecalis*.

Palavras-chave: Nanopartículas de dióxido de titânio e prata; Fotocatalise Heterogênea; Esterilização de instrumentais odontológicos; Testes bacteriológicos; Luz ultravioleta e branca

ABSTRACT

Nanotechnology, the science of minuscule, has developed products which are able to manipulate atoms and molecules that could be applied in the sterilization process of dental instruments. **OBJECTIVES** - The objective of the present study is to evaluate the self-cleaning action of TiO₂ and Ag nanoparticles coating on dental instruments by the photocataliys process under UV and visible light irradiation. **MATERIAL AND METOD** - Microbiologic tests were done using

dental cement spatulas coated with coating of TiO₂ and Ag nanoparticles (one or three layers), and contaminated with 10 mcrl *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*, respectively. After contamination, they were exposed to ultraviolet light and visible light for 120 minutes. Next, they were transferred to and stored in test tubes with BHI (Brain Heart Infusion) and incubated at range 35° - 37°C. Checking times for bacterial growth and for control and retrieval tests were done at: 24 h, 48 h, 72 h and 96 hours. **RESULT** -*Pseudomonas aeruginosa* proved inactive under 120 minute of ultraviolet light irradiation time, thus confirming the heterogeneous photocatalytic activity of TiO₂ and Ag which was not confirmed under visible light irradiation. *Enterococcus faecalis* did not confirmed the heterogeneous photocatalytic activity of TiO₂ and Ag under UV and visible light irradiation up to 96 hours. **CONCLUSION** - *Pseudomonas aeruginosa* confirmed the photocatalytic activity of TiO₂ and Ag under UV light irradiation; however *Enterococcus faecalis* did not confirmed the photocatalytic activity of TiO₂ and Ag under UV light irradiation and visible lights irradiation.

Keywords: Silver and titanium dioxide nanoparticles; Heterogen fotocatalises; Dental instruments esterilization; Bacterial tests; Visible and ultraviolet light.

INTRODUÇÃO

A grande prevalência de doenças infecciosas motiva a classe odontológica a buscar mais informações na tentativa de minimizar as chances de contaminação entre pacientes e profissionais envolvidos nos atendimentos. A prevenção da disseminação de microrganismos tem se mostrado eficaz; entretanto, o cirurgião-dentista e toda a equipe estão vulneráveis a muitas doenças infecciosas por trabalharem em contato com secreções e mucosas.

A esterilização em Ortodontia, como em Odontologia, tem recebido especial atenção nos últimos anos, e merece bastante destaque a busca por novos métodos de esterilização. Richard (1987)¹ verificou que os ortodontistas têm a segunda incidência de hepatite infecciosa entre os profissionais da odontologia e que a saliva é

tão contaminante quanto o sangue, sendo os aerossóis dentais e o instrumental odontológico os principais transmissores de microrganismos, que podem sobreviver durante várias semanas, representando um importante risco de infecção cruzada nos procedimentos de rotina.

O Ministério da Saúde (1994)² recomenda, para a esterilização de instrumentos clínicos, o uso da autoclave por gravidade a 121°C (1 atm de pressão) por 20 minutos, e da autoclave por autovácuo a 132°C por 4 minutos. Para a estufa de esterilização, 160°C por 2 horas ou 170°C por 1 hora.

Entre os meios de esterilização existentes no mercado, sem dúvida nenhuma a autoclave e a estufa são os que oferecem maiores vantagens dentro do consultório ortodôntico em relação a tempo de esterilização e baixo custo. Porém, esses métodos causam corrosão e danos ao instrumental metálico de corte, limitando sua real efetividade. (CRAWFORD, 1977; MASUNAGA, 1987; GANDINI Jr et al., 1997). Embora a autoclave química seja recomendada na literatura, têm sido relatados problemas, como custo e dificuldade de instalação, bem como na aquisição dos produtos químicos a serem utilizados e quanto ao seu vapor resultante, tóxico, que deve ser ventilado para fora do ambiente, havendo a necessidade de uma instalação complexa para operar esse aparelho. (RICHARD, 1987).

O advento de novos materiais que utilizam método de recobrimento com nanopartículas de óxido de titânio (TiO₂) para aplicação em processo de esterilização de materiais tais como água, vidro, cerâmica tem se mostrado promissor. Nesta nova forma autolimpante, o instrumental é revestido por filme nanométrico de dióxido de titânio (TiO₂), que agrega propriedades bactericidas à sua superfície. Essas propriedades são ativadas na presença da luz ultravioleta (UV), cuja radiação interage com o dióxido de

titânio, que degrada a matéria orgânica por um processo denominado de fotocatalise heterogênea.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar uma nova metodologia de esterilização de instrumental a partir do recobrimento do mesmo com nanopartículas de dióxido de titânio, com a possibilidade de economia de tempo e recursos, em virtude da real necessidade de melhora no método de esterilização e de atenção aos padrões do sistema de biossegurança.

PROPOSIÇÃO

Avaliar o comportamento das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* mediante à exposição à luz UV e à branca em espátulas número 24 recobertas com uma ou três camadas de nanopartículas de TiO₂ e Ag, pelo processo de fotocatalise heterogênea.

REVISÃO DE LITERATURA

Segundo Pruden e Ollis⁶, o princípio da fotocatalise heterogênea envolve a ativação de um semicondutor (geralmente TiO₂) por luz solar ou artificial. Um semicondutor é caracterizado por bandas de valência (BV) e bandas de condução (BC), sendo a região entre elas chamada de *bandgap*. A absorção de fótons com energia superior à energia do *bandgap* resulta na promoção de um elétron de banda de valência para banda de condução, com geração concomitante de uma lacuna (h⁺) na banda de valência. Essas lacunas mostram potenciais bastante positivos, na faixa de +2,0 a +3,5V medidos contra um eletrodo de calomelano saturado, dependendo do semicondutor e do

pH. Esse potencial é suficientemente positivo para gerar radicais hidroxilas (OH) a partir de moléculas de água absorvidas na superfície do semicondutor e, subseqüentemente, oxidar o contaminante orgânico. A eficiência da fotocatalise depende da competição entre o processo em que o elétron é retirado da superfície do semicondutor e o processo de recombinação do par elétron/lacuna, que resultam na liberação de calor.

Wong et al.⁷ demonstraram que o mecanismo de degradação não se dá exclusivamente por meio do radical hidroxila, mas também por meio de outros radicais derivados do oxigênio, tais como O_2 e H_2O_2 , formados pela captura de elétrons fotogerados. Um dos aspectos interessantes da fotocatalise heterogênea é a possibilidade de utilização de luz solar para ativação do semicondutor. A degradação de contaminantes orgânicos (fenol, hidrocarbonetos clorados, clorofenóis, inseticidas, corantes e outros) na presença de TiO_2 iluminado com luz solar é limitada pela absorção desse semicondutor de radiações de até 385nm (que corresponde a aproximadamente 3% do espectro solar ao nível do mar) devido ao seu *bandgap* de 3,2 eV. Novos fotocatalizadores que apresentem maior absorção na região da luz visível são necessários para o desenvolvimento da fotocatalise utilizando luz solar e aumentando sua eficiência.

Hoffmann et al.⁸ discutiram a aplicação ambiental de fotocatalise por semicondutores, discorrendo sobre os mecanismos da fotocatalise, a cinética da reação, os tipos de semicondutores, a espessura das películas dos semicondutores, a importância da formação dos radicais OH para oxidação, a utilização dessa técnica no tratamento de água e a sua aplicação na área médica.

Conforme publicação sobre TiO_2 no livro de resumos da Second International Conference (1996), entre as mais recentes aplicações da fotocatalise

heterogênea, algumas estão sendo desenvolvidas por companhias japonesas e já começam a ser industrializados, como: a) desodorização de ambientes pela utilização de filtros impregnados com TiO_2 que, sob iluminação, é capaz de degradar substâncias causadoras de mau odor; b) tintas fotocatalíticas para revestimentos antibactericidas e autolimpantes de paredes de centros cirúrgicos; c) vidros e espelhos antiembassantes, onde a característica super-hidrofílica do TiO_2 , quando iluminado com UV, é aproveitada. Neste caso, a água espalha-se rapidamente formando um filme uniforme sobre a superfície em vez de gotículas, evitando o embassamento; d) vidros autolimpantes para iluminação de túneis, onde a formação de filme de poeira oleosa na superfície dos holofotes pode ser destruída por fotocátalise, mantendo assim o vidro limpo.

Segundo Huang et al.¹⁰, a descontaminação feita com radiação UV e TiO_2 é assegurada pelos maiores prejuízos nas células causados com o uso do catalisador TiO_2 . A ação oxidativa exercida pelo processo UV/ TiO_2 ocasiona danos na parede celular e na membrana citoplasmática. A ação fotocatalítica aumenta progressivamente a permeabilidade celular, permitindo o efluxo livre do conteúdo intracelular, que conduz finalmente à morte celular. As partículas livres de TiO_2 podem também penetrar nas células danificadas, e o ataque direto posterior nos componentes intracelulares, como enzimas e DNA, pode acelerar a morte celular. Com esse mecanismo, eles enfatizam a importância da parede celular e da membrana citoplasmática como os alvos principais do ataque do TiO_2 .

De acordo com Ashikaga et al.¹¹, TiO_2 absorve UV-A eficientemente e exibe atividade fotocatalítica. A ação bactericida da fotocátalise heterogênea UV-A/ TiO_2 vem sendo testada em microrganismos com diferentes fotossensibilidades, e alta eficiência foi encontrada em todos os casos estudados, particularmente para o mais

resistente, *Enterobacter cloacal*. Este microrganismo normalmente é encontrado no solo e na água e não é inativado pela irradiação UV-A, devido a um eficiente sistema defensivo antioxidante. Entretanto, em todos os casos estudados, doses subletais de UV-A na presença de TiO_2 foram eficientes na eliminação microbiana.

Segundo Reddy; Manorama e Reddy¹², o TiO_2 é encontrado em várias formas, sendo as mais conhecidas a anátase, a rutilo e a brookite. A fase brookite é estável mediante baixas temperaturas, mas não é muito usada na prática. A rutilo é a única que obtém calcificação, sendo uma propriedade fundamental na elétrica e na óptica. Já a fase anátase não é muito compreendida, mas sabe-se que ela é a mais fotoativa.

Segundo Toledo e Castro¹³, a luz UV é empregada como agente esterilizante. Sua ação deve-se em parte à produção de peróxidos (R-O-OR) no meio, os quais, por sua vez, funcionam como agentes oxidantes. Algumas das radiações mais penetrantes, como raios X, ionizam e, assim, inativam os constituintes celulares pelos quais passam. Entretanto, alguns dos efeitos da irradiação pelos raios X podem ser atribuídos novamente à formação de peróxidos, considerando-se que as células podem ser protegidas parcialmente pela exclusão do oxigênio durante a irradiação. Grande parte da ação letal da radiação é conseqüente ao efeito direto sobre os ácidos nucléicos da célula. O efeito mais importante da absorção ultravioleta pelo DNA consiste na produção de ligações cruzadas entre resíduos pirimídicos vizinhos (produção de dímeros pirimídicos). As bactérias contêm vários sistemas enzimáticos para reparar o DNA que contenha dímeros pirimídicos. Um sistema de fotoreativação é formado por uma enzima capaz de clivar os dímeros pirimídicos. Essa enzima é ativada pela luz visível de modo que as células “mortas” pela luz ultravioleta podem ser reativadas pela exposição à luz intensa de comprimento de onda em torno de 400nm. Assim, a resistência relativa das

diferentes cepas bacterianas à radiação e a outros agentes que agrirem diretamente o DNA deve-se à relativa eficácia de seus sistemas enzimáticos de reparação.

MATERIAL E MÉTODO

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizadas espátulas de cimentação odontológicas nº 24, as quais receberam o revestimento de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) e 5% de prata (Ag) (Figura 1) por imersão em recipiente contendo um polímero líquido à base de água e íons de titânio à temperatura ambiente, levadas a um forno com temperatura entre 300° e 400°C. O tratamento térmico foi realizado de forma que os íons de titânio transformassem-se em dióxido de titânio. Entre quatro e seis horas, formou-se um filme nanoestruturado na superfície das espátulas, incorporando uma película de recobrimento. O *coating* foi realizado pela firma NANOX Tecnologia S/A, do Centro Multidisciplinar para Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CMDMC), um dos dez Centros de Pesquisa de Inovação e Difusão (CEPID) da FAPESP.

As espátulas utilizadas para o ensaio foram as de cimentação nº 24, marca Mocar, de aço inox 420, com baixo teor de carbono para não enferrujar. Essas espátulas receberam dois tipos de tratamento, Nanox A, com uma camada, e Nanox B, com três camadas. Após o processo de recobrimento, as espátulas foram lavadas, enxaguadas, secas com papel absorvente e empacotadas, cinco a cinco, em embalagem plástica (Figura 2) para serem esterilizadas em autoclave da Dabi-Atlante, modelo Speedclave M7, a 120°C por 20 minutos. (Figura 3)



FIGURA 1 - Espátulas de cimento nº 24 com coating de nanopartícula de TiO_2 e 5% de prata (Ag).



FIGURA 2 - Espátulas de cimento nº 24 com nano-partículas de TiO_2 e 5% de prata (Ag) autoclavadas.



FIGURA 3 - Autoclave M7 speedclave, DABI ATLANTE, onde foram autoclavadas as espátulas.

A coleta dos microrganismos para o procedimento de contaminação das espátulas durante a realização dos experimentos seguiu as seguintes regras: uso de luvas descartáveis pelo instrumentador a fim de manter a cadeia asséptica durante a realização dos ensaios e o instrumental livre de qualquer tipo de contaminação antes do procedimento. Para que a área de trabalho (caixa de madeira, com 0,50 mm x 0,32 mm x 0,31 mm, revestida de papel alumínio) estivesse asséptica, luz ultravioleta foi ligada internamente por 30 minutos. A padronização do inóculo utilizado foi uma cultura em BHI com turvação padrão de 10^6 ufc/ml (unidade formadora de colônia) da amostra bacteriana.

A contaminação foi realizada com os seguintes indicadores biológicos, abaixo relacionados:

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Cada grupo ensaiado teve cinco amostras contaminadas pelas bactérias indicadas, acima mencionadas. Uma face das espátulas foi contaminada com alça calibrada descartável de 10 micrl (Figura 4), que carrega uma suspensão de bactérias na escala de MacFarland 0,5 (Figura 5), que corresponde a 15.000ufc/ml.



FIGURA 4 - Alça calibrada descartável de 10 micrl.



FIGURA 5- Escala de MacFarland 0,5.

Um conjunto de cinco espátulas foi exposto à luz UV e outro conjunto de cinco espátulas foi exposto à luz branca, ambos por 120 minutos, tempo este definido como base para ativação da ação antimicrobiana das nanopartículas de TiO₂ e Ag após ensaios prévios. A luz UV foi emitida por uma lâmpada Starlux 15w-F 15T18, base G 13, tubo T8 (Figura 6), comprimento de onda de 365nm, com vida útil de 4.000 horas, posicionada a uma distância de 10 cm da superfície das espátulas que foram dispostas lado a lado dentro da caixa. A luz branca foi emitida por lâmpada Osram 15w/765 daylight recicable Germany CE (Figura 7), comprimento de onda de 438 nm, em meio ambiente, posicionada a uma distância de 10 cm da superfície das espátulas a fim de que ambos os grupos recebessem a incidência de luz perpendicularmente. A luz UV e a luz branca deveriam ativar as nanopartículas revestidas com o dióxido de titânio (TiO₂, que é o semicondutor), que reveste as espátulas, e que deveriam conferir a propriedade antimicrobiana ao produto.



FIGURA 6 - Luz UV lâmpada Starlux 15 w-F15T18, base 13, tubo 18.



FIGURA 7 - Luz branca lâmpada Osram 15 w/765 daylight recicable Germany.

As espátulas, após a ação da luz, foram removidas da caixa e inseridas individualmente no meio de cultura em tubo (20 mm x 200 mm) contendo *Brain Heart Infusion* (BHI-DIFCO).

Os tubos de cultura foram levados à incubação (Figura 8) em estufa bacteriológica FAVEM Ltda, modelo retilínea, a 35°–37°C (Figura 9). Foram realizadas leituras diárias até 96 horas para verificar a possível ocorrência de crescimento das bactérias que causariam turvação do meio de cultura. A leitura final teve como referencial a presença ou não de turvação.



FIGURA 8 - Prova de Recuperação em caldo BHI, material utilizado para comprovar o crescimento ou não da bactéria.



FIGURA 9 - Estufa bacteriológica Favem LTDA modelo retilínea, onde os tubos de ensaio permanecerão durante o tempo de incubação.

Para cada microrganismo ensaiado foram realizados dois controles positivos para comprovar a viabilidade da cepa e um controle negativo para comprovar a esterilidade inicial da espátula. Assim, um dos controles positivos foi realizado com espátula revestida com nanopartículas, esterilizada e submetida à contaminação microbiana, mas não à ativação da luz UV ou branca; o outro controle positivo foi feito da mesma maneira que o primeiro, com exceção de que as espátulas não estavam revestidas com nanopartículas. O controle negativo foi realizado utilizando uma

espátula revestida com nanopartículas, esterilizada, mas que não tinha sido contaminada com nenhum indicador biológico e nem sido submetida à luz UV.

A análise microbiológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP e sob a orientação do Centro Multidisciplinar para o Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CMDMC) - Instituto de Química do Campus de Araraquara (LIEC), Universidade de São Carlos e Faculdade de Odontologia Campus de Araraquara-UNESP.

PROTOCOLO DE TRABALHO:

1. Uso dos indicadores bacteriológicos *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Concentração da solução de inóculo escala de Mcfarland 0,5.
3. Tempo de exposição à luz UV e à branca por 120 minutos
4. Incidência de luz perpendicular.
5. Material: espátulas de cimentação odontológica sem revestimento, com uma camada (Nanox A) ou três camadas (Nanox B) de dióxido de titânio e prata a 5%.
6. Leitura de testes microbiológicos a intervalos de 24 horas até completar 96 horas: negativo caso não houvesse turvação e positivo caso houvesse turvação.
7. Seqüência de ensaios laboratoriais.
 - 7.1. Cinco espátulas com recobrimento Nanox B, contaminadas com o microrganismo *Enterococcus faecalis*, expostas à luz branca (fora da caixa) por 120 minutos.
 - 7.2. Cinco espátulas com recobrimento Nanox B, contaminadas com o microrganismo *Enterococcus faecalis*, expostas à luz UV (dentro da caixa) por 120 minutos.

Tabela 2. Fotocatálise heterogênea da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em instrumentais odontológicos revestidos com nanopartículas de dióxido de titânio e prata (coating) com 120 minutos de exposição, luz branca e luz UV								
Exposição à luz	1 CAMADA RECOBRIMENTO NANOX A				3 CAMADAS RECOBRIMENTO NANOX B			
Leitura do teste	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Luz branca	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Luz UV	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Todos os testes realizados com microrganismos *Enterococcus faecalis* foram positivos para crescimento das bactérias, independente do tipo de recobrimento e exposição à luz branca ou à UV (Tabela 1).

Nos testes realizados com o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa* com exposição à luz branca, verificou-se crescimento positivo, e negativo para a exposição à luz UV, independente do recobrimento, uma ou três camadas, que não interferiram nos resultados (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Foi comprovada a ação antimicrobiana das nanopartículas no microrganismo (bactéria) *Pseudomonas aeruginosa*, pois não houve seu crescimento; enquanto com o microrganismo *Enterococcus faecalis* ocorreu turvação, comprovando a ocorrência do crescimento microbiano após 24 horas de incubação a uma temperatura de 35°- 37°C.

Foi reportada por Fernandez e Pizarro¹⁴ a grande sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* à exposição à luz UV-A (365nm, 120kj m⁻²h⁻¹), que se

mostrou eficaz na eliminação desse microrganismo. O mesmo não foi observado para a *Escherichia coli*, que não foi afetada em sua viabilidade. Assim sendo, a ação microbicida do processo fotocatalítico com TiO_2 revelou que os vírus são mais sensíveis ao processo, seguidos pelas células bacterianas, e estas pelos esporos bacterianos. Isso sugere que diferentes microrganismos respondem de maneiras diferentes ao fotocatalizador TiO_2 devido às suas diferenças estruturais, particularmente no que diz respeito à complexidade e à espessura do envelope celular. Desta forma, este achado é concordante com os resultados de nosso trabalho, pois a *Pseudomonas aeruginosa* não apresentou crescimento enquanto ocorreu crescimento do microrganismo *Enterococcus faecalis*.

Conforme nos informou Tosa e Hirata¹⁵ e Toledo e Castro¹³, as bactérias contêm vários sistemas enzimáticos para reparar o DNA que contenham dímeros pirimídicos. Um sistema de fotoreativação é formado por uma enzima capaz de clivar os dímeros pirimídicos. Esta enzima é ativada pela luz visível, de modo que as células “mortas” pela luz ultravioleta podem ser reativadas pela exposição à luz intensa de onda em torno de 400 nm. Isso explica o ocorrido em nosso trabalho quando o conjunto com cinco espátulas foi exposto à luz branca (ao meio ambiente) emitida por lâmpada Osram 15w/765, daylight recicable Germany CE, por 120 minutos. Esta lâmpada tem comprimento de onda que vai de 400 nm a 800 nm, que pode promover uma reativação das células mortas.

No presente trabalho, as espátulas receberam revestimento de nanopartículas de dióxido de titânio e 5% de prata por imersão. Conforme nos informaram Hu et al.¹⁶ e Falaras et al.¹⁷, ocorre uma melhora da eficiência da fotocatalise com o emprego de prata, pois esta aumenta o nível de oxidação das células. Encontramos subsídio no trabalho de Huang et al.¹⁰, que explicaram que a ação

oxidativa exercida pelo processo UV - TiO₂ promove danos na parede celular e na membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade celular e permitindo o fluxo livre do conteúdo intracelular, que conduz finalmente à morte celular.

A utilização de uma ou três camadas de recobrimento (*coating*) com as nanopartículas de TiO₂ e Ag não interferiu nos resultados, indicando que a fotocatalise heterogênea ativada pela luz UV não foi influenciada pela espessura da camada de nanopartículas. Entretanto, de acordo com Simões et al.¹⁸, essa película não é estável em aço inox, pois sofre uma abrasão de 30% no seu *coating*.

CONCLUSÃO

- A *Pseudomonas aeruginosa* foi inativada pela exposição à luz UV das espátulas de cimento odontológica recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag, indicando a ocorrência do processo de fotocatalise heterogênea.
- A *Pseudomonas aeruginosa* não foi inativada pela exposição à luz branca das espátulas de cimento odontológica recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag.
- O *Enterococcus faecalis* não foi inativado pela exposição à luz UV e à branca das espátulas de cimento odontológico recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag.
- A utilização de uma ou três camadas de recobrimento com nanopartículas de TiO₂ e Ag não interferiu no processo de fotocatalise heterogênea.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em várias instituições do mundo acadêmico têm sido desenvolvidas muitas pesquisas visando maior adequação e otimização do processo fotocatalítico para utilização no âmbito industrial, assim como na saúde pública.

A fim de implementar o sistema fotocatalítico contínuo em grande escala, diversos estudos sobre a inativação de microrganismos envolvendo bactérias, protozoários, vírus e fungos vêm sendo realizados tanto na água como no ar e em metais objetivando a desinfecção de abastecimentos de água, ambientes e instrumentais sujeitos a contaminação.

Os diferentes resultados obtidos são justificados pela utilização de diferentes bactérias, uma vez que estas apresentam uma variedade de propriedades morfológicas e fisiológicas que levam a distintas respostas celulares, mesmo sendo submetidas às mesmas condições experimentais. Estudos de Cordeiro; Leite e Dezzoti (2004) sugeriram que diferentes microrganismos respondem de maneiras diferentes ao fotocatalisador TiO_2 devido às suas diferentes estruturas, particularmente no que diz respeito à complexidade e à espessura do envelope celular.

No tratamento com radiação UV e TiO_2 ocorre a combinação de dois processos, o ataque das células pelos radicais hidroxila ($-\text{OH}$) gerados pela degradação na superfície do fotocatalisador e também a absorção direta da radiação UV pelas células, sendo esta, sem dúvida, a responsável pela parte significativa da inativação celular. (CORDEIRO; LEITE e DEZOTTI, 2004)

A fotocatalise heterogênea é um processo oxidativo avançado (POA), que é uma tecnologia alternativa que envolve a geração de radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$), altamente oxidantes devido à sua alta reatividade e que podem reagir com uma grande variedade de compostos orgânicos. O interesse pelo POA tem crescido enormemente, por ser considerada tecnologia limpa e processo biológico bastante promissor do ponto de vista econômico. Extrapolando nossos resultados para a clínica odontológica, é um sistema avançado, que pode levar a uma modificação no processo de esterilização dos instrumentos odontológicos.

REFERÊNCIAS

1. Richard JA. Sterilization in orthodontics. **J Clin Orthod.** 1987; 21: 326-36.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente transmissíveis/AIDS. Hepatite, AIDS e herpes na prática odontológica. Brasília, 1994.
3. Crawford JJ. **Sterilization, disinfection and asepsis in dentistry.** 2 nd. Ed Philadelphia: Lea & Febiger, 1977.
4. Masunaga MI. Sterilization, disinfection and corrosion of instruments-part 3. **J Clin Orthod.** 1987; 21:231-2.
5. Gandini Jr LG , Souza RS, Martins JCR, Sakima T, Gandini MREAS. Controle da Infecção cruzada em ortodontia. Parte 1. Hepatite B, desinfecção e aparatologia pessoal. **Rev Dental Press Ortodon Ortop Facial.** 1997; 2: 77-82.
6. Pruden AL, Ollis, DF. Degradation of chloroform by photoassisted heterogeneous catalysis in dilute aqueous suspensions of titanium dioxide. **Environ Sci Technol.** 1983; 17: 628.
7. Wong JCS, Linsebigler A, Lu G, Fan J, Yates JTJr. Photooxidation of CH₃ Cl on TiO₂(110) single crystal and powdered TiO₂. **J PhysChem.** 1995; 9: 335.
8. Hoffmann MR, Martin ST, Choi W, Bahnemann DW. Environmental applications of Semiconductor Photocatalysis. **Chem Rev.** 1995; 95: 69-96.
9. The Second International Conference on TiO₂ photocatalytic purification and treatment of water and air. Cincinnati, Ohio, EUA. Livro de Resumos, 1996
10. Huang Z, Maness P-H, Blake DM, Wolfrum EJ, Smolinski SL. Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. **J Photochem Photobiol A Chem.** 2000; 130: 163-70

11. Ashikaga T et al. Effect of the photocatalytic activity of TiO₂ on plasmid DNA. **Mutat Res.** 2000, 466:1-7.
12. Reddy KM; Manorama AR; Reddy AR. Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticles. **Mat Chem Phys.** 2002; 78: 239-45.
13. Toledo MRF, Castro AFP. **Outras bactérias aeróbias e anaeróbias.** IN: Trabulsi LR. Microbiologia. 2 ed. São Paulo: Ed Atheneu, 1998. Cap. 33: 176.
14. Fernandez RO, Pizarro RA. Lethal effect induced in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to ultraviolet A radiation. **Photochem Photobiol.** 1996; 64: 334-9.
15. Tosa K, Hirata T. Photoreactivation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* following UV disinfection. **Water Res.** 1999; 33: 361-6.
16. Hu C et al. Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO₂ under visible light irradiation. **Langmuir.** 2007; 23: 4982-7.
17. Falaras P, Arabatziz IM, Stergiopoulos T, Bernard MC. Enhanced activity of silver modified thin-film TiO₂ photocatalysts. **Int J Photoenergy.** 2003, 5: 123-9.
18. Simões LGP, Araujo AL, Minozzi DT, Longo E. Aço inox bactericida. **Rev Esc Minas.** 2007; 60: 1-11.

5 CAPÍTULO 2

**FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA ATIVADA POR DIFERENTES
TEMPOS DE EXPOSIÇÃO À LUZ UV EM ESPÁTULAS COM
REVESTIMENTO DE NANOPARTÍCULAS TiO₂ E Ag CONTAMINADAS
COM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *BACILLUS SUBTILIS* ,
ESCHERICHIA COLI E *MICROCOCCUS LUTEUS***

**HETEROGENEOUS PHOTOCATALYSIS USING TIO₂ AND AG
NANOPARTICLES COATING OF DENTAL INSTRUMENTAL
CONTAMINATED BY *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ,*BACILO
SUBTILLIS*, *ESCHERICHIA COLI* AND *MICROCOCCUS LUTEUS*
UNDER DIFFERENT IRRADIATION TIMES**

Cecilia Helena Soares PORTO *

Ary dos Santos PINTO *

Elson LONGO *

Maria Cristina M. de Souza GUGELMIN *

Sizenando de Toledo PORTO NETO *

* Pós-graduanda em Odontologia, Faculdade de Odontologia-Unesp, Araraquara-SP, Brasil

* Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia-Unesp, Araraquara-SP, Brasil

* Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica, Instituto de Química-UNESP /UFSCar, Araraquara-SP, Brasil.

* Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, Ribeirão Preto-SP, Brasil

* Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia-UNESP, Araraquara-SP, Brasil

RESUMO

A nanotecnologia, ciência do minúsculo tem gerado produtos capazes de manipular átomos e moléculas com aplicação no processo de esterilização de instrumentais odontológicos. O objetivo do trabalho foi realizar uma avaliação da ação autolimpante e esterilizante do recobrimento de instrumentos odontológicos com nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) e prata (Ag) desencadeada pelo processo de fotocatalise heterogênea, pela luz ultravioleta (UV) e pela luz branca. Cinco espátulas para cimento odontológico para cada um dos microrganismos - *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus* - foram utilizados para os testes bacteriológicos. Depois de cinco minutos de contaminação, elas foram colocadas dentro de uma caixa de madeira revestida de papel alumínio e expostas à luz UV por 15, 30 e 60 minutos e incubadas em tubos de BHI (Brain Heart Infusion) por 20 minutos. As leituras dos testes foram feitas após 24 horas e 48 horas. Os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* não foram inativados, sendo observado o crescimento bacteriano nas leituras de 24 e 48 horas nas exposições à luz UV nos três tempos. Não houve crescimento da bactéria *Micrococcus luteus* quando da leitura de 24 e 48 horas nas exposições à luz UV nos três tempos, ocorrendo seu processo de inativação pela fotocatalise heterogênea, o que não aconteceu com as demais bactérias. O tempo de exposição à luz ultravioleta não influenciou o resultado.

PALAVRAS-CHAVE: Nanopartículas de dióxido de titânio e prata; Fotocatalise Heterogênea; Esterilização de instrumentais odontológicos; Testes bacteriológicos; Luz ultravioleta e branca

ABSTRACT

Nanotechnology, the science of minuscule, has developed products which are able to manipulate atoms and molecules in order to cause the sterilization process of dental instruments, which is the objective of the present work. A study on the self-cleaning action of the TiO₂ and Ag nanoparticles coating on dental instruments originated by the photocatalysis process through ultraviolet light was done. Five(5) cement spatulas for each microorganism, *Staphylococcus aureus* , *Bacilo subtilis*, *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*, were used for microbiologic tests. After 5-minute contamination, they were placed in a wooden box, covered with aluminum foil, exposed to ultraviolet light for 15, 30, and 60 minutes, and stored in test tubes in BHI (Brain Heart Infusion) for 20 minutes. Checking times for bacterial growth were at 24 and 48 hours. *Staphylococcus aureus* , *Bacilo subtilis*, *Escherichia coli* did not proved inactive under 60-minute ultraviolet light exposure. Bacterial growth was observed at 24 and 48, under 15-30 and 60-minute exposure. No *Micrococcus luteus* growth was observed at 24, 48, under 15-, 30-, and 60-minute exposure, respectively. By means of heterogeneous photocatalysis process using Tio₂ and Ag nanoparticles and after 15 ,30 and 60-minute ultraviolet light exposure, inactivation of *Micrococcus luteus* occurrence of the bactericidal process was proved effective and *Staphylococcus aureus* , *Bacilo subtilis*, *Escherichia coli* was not observed it. The UV time exposure did not influence the results

KEYWORDS: Silver and titanium dioxide nanoparticles; Heterogen fotocatalises; Dental instruments esterilization; Bacterial tests; Visible and ultraviolet light.

INTRODUÇÃO

A esterilização do instrumental odontológico utilizado e o controle das fontes de contaminação são medidas preventivas fundamentais que devem constituir-se em comportamentos habitualmente utilizados pelos cirurgiões-dentistas, assim como devem ser atitudes básicas para qualquer profissional da saúde (CAMPOS et al., 1989). A esterilização, em Ortodontia, como em Odontologia, tem recebido especial atenção nos últimos anos, merecendo destaque a busca por novos métodos.

Consolaro et al. (1991) defenderam que a lavagem prévia do instrumental antes da esterilização diminui o tempo necessário para a realização do ciclo. Se possível, após a lavagem, os instrumentos devem ser colocados num aparelho de ultra-som, garantindo maior limpeza em curto espaço de tempo, visto que, pela alta rotatividade que há no consultório ortodôntico, procura-se cada vez mais um método de esterilização rápida.

Segundo Campbell e Phenix (1986), os esterilizadores de esferas de vidro têm se mostrado efetivo quando utilizados por 5 segundos a 230^oC, inclusive contra o vírus da hepatite B. Em trabalho com testes bacteriológicos, Miller; Harrower e Costello (1992) demonstraram que, desde que não seja necessário aquecer todo o instrumental, a esterilização das superfícies ocorre somente com um tempo de 30 segundos a 250^oC para alicates ortodônticos no esterilizador

por esferas de vidro. Segundo eles, um período de um minuto dará uma segurança extra de esterilização, e não chega a aquecer a área de pega dos instrumentais suficientemente para causar desconforto. A grande desvantagem desse método é que ele não esteriliza a área de pega dos instrumentais, podendo ser utilizado um material envolvendo o cabo. Esse método não esteriliza também as articulações dos alicates, onde freqüentemente penetra algum tipo de fluido (saliva ou sangue), contaminando a articulação do alicate e o paciente. A falha se deve à espessura do alicate, não havendo tempo suficiente para aquecer adequadamente o interior da articulação, o que não o torna um método adequado para esterilização em ortodontia.

Quanto à esterilização realizada com raios ultravioleta, Brunharo; Pacca e Almeida (1994), por meio de um estudo, demonstraram que não há uma padronização desses raios dentro do aparelho e que não foi alcançada a esterilização em nenhuma área interna testada.

Os ortodontistas têm usado muito os métodos de esterilização em autoclave a 135°C por 3min30 e a estufa a 190°C por 6 minutos pelo rápido ciclo de esterilização que oferecem, diminuindo assim o problema da necessidade de um grande número de instrumentos à disposição.

Cordeiro; Leite e Dezotti (2004) relataram que muitos segmentos da sociedade, preocupados com a biossegurança de setores como a indústria, assim como na saúde, no âmbito hospitalar e saúde

pública, estão desenvolvendo materiais autolimpantes e auto-esterilizantes para a eliminação de microrganismos por meio da nanotecnologia, que permite a fabricação de produtos com características diferenciadas e que modifica as propriedades dos materiais no nível atômico. A nanotecnologia consiste de técnicas de manipulação de materiais em escala de milionésima parte de um milímetro.

O advento de novos materiais nanoparticulados possibilita agregar sobre várias superfícies agentes - como a prata, um material conhecido por sua propriedade bactericida há séculos – que, por meio de cargas positivas (íons de prata), atraem as cargas negativas das bactérias e causam a ruptura de sua membrana celular em função da diferença de potencial entre a parte interna e a externa do microrganismo, provocando a sua morte. (VASCONCELOS, 2007)

Esta tecnologia é conhecida como Processo Oxidativo Avançado (POA), que, embora faça uso de diferentes sistemas de reação, envolvem a geração de radicais hidroxilas (OH) altamente oxidantes. Entre os POA, a fotocatalise heterogênea tem mostrado ser uma tecnologia promissora na oxidação e na degradação de contaminantes orgânicos, visando o controle ambiental e a aplicação hospitalar.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o processo fotocatalítico em diferentes bactérias, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, a partir do recobrimento das mesmas com nanopartículas de dióxido de titânio, com a possibilidade de economia de tempo e de recursos, em virtude de real necessidade de

melhora no nível de esterilização dos instrumentais e de mudança nos padrões do sistema de biossegurança.

PROPOSIÇÃO

Avaliar o comportamento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*, mediante diferentes tempos de exposição à luz UV em espátulas número 24 recobertas com nanopartículas de TiO₂ e Ag, pelo processo de fotocatalise heterogênea.

MATERIAL E MÉTODO

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram utilizadas 60 espátulas odontológicas de cimentação nº 24, as quais receberam o revestimento de nanopartículas de TiO₂ e Ag. O revestimento foi realizado pela imersão das espátulas em recipiente contendo um polímero líquido à base de água e íons de titânio à temperatura ambiente, levadas a um forno com temperatura entre 300°C a 400°C. O tratamento térmico foi realizado de forma que os íons de titânio transformassem-se em dióxido de titânio. De quatro a seis horas, o filme nanoestruturado bactericida foi formado na superfície da espátula de cimentação, incorporando uma

película de recobrimento. O *coating* foi realizado pela firma NANOX Tecnologia S/A, do Centro Multidisciplinar para Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CMDMC), um dos dez Centros de Pesquisa de Inovação e Difusão (CEPID) da FAPESP. Foram utilizadas espátulas para cimentação nº 24, marca Mocar, de aço inox 420 com baixo teor de carbono para não enferrujar (Figura 1).



FIGURA 1 - Espátulas de cimento nº 24 com coating de nanopartícula de TiO₂

As espátulas, após o processo de revestimento, foram lavadas com água, detergente e esponja de limpeza abrasiva, do lado amarelo para limpeza delicada, e foram enxutas com toalha de papel, sendo acondicionadas em embalagens de esterilização, cada uma contendo cinco espátulas. Foram autoclavadas, a 120°C por 20 minutos, na autoclave da Dabi-Atlante, modelo Speedclave M7 (Figura 2).



FIGURA 2- Autoclave M7 speedclave, DABI ATLANTE, onde serão autoclavadas as espátulas.

A contaminação foi realizada com os seguintes indicadores biológicos:

<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 9341
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10538
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633

A coleta dos microrganismos durante a realização dos experimentos seguiu as seguintes regras:

1. manutenção da cadeia asséptica durante a coleta;
2. certeza de que a amostra seria viável;
3. certeza de que os instrumentais estariam livres de qualquer tipo de contaminação antes do ensaio;
4. manter área de trabalho asséptica.

Cada grupo teve cinco amostras contaminadas pelos indicadores acima mencionados.

Os experimentos foram feitos dentro do Fluxo Laminar Vertical (VECO) – equipamento do Laboratório da Disciplina de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológica e Bromatológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP – e o experimentador usou luvas descartáveis e pinça estéril para pega dos instrumentos FIGURA 2 - Fluxo laminar.



FIGURA 3 - Fluxo laminar (Veco) local, onde será colocada a capela para realização dos os experimentos.

Os pacotes foram abertos, e os instrumentos expostos gradualmente, dentro do fluxo laminar. Com o auxílio de pinças estéreis, as espátulas foram contaminadas. Para cada indicador, houve a exposição à contaminação de cinco espátulas por cinco minutos no bequer de 250 mL contendo 50 mL de solução (caldo de microrganismos).

Após a contaminação, as espátulas permaneceram 5 minutos escorrendo em outro bequer (Figura 4 e 5).



Figura 4 – Contaminação das espátulas pelos microrganismos.



Figura 5 – Remoção do excesso do caldo de contaminação.

A diluição do caldo foi determinada pela quantidade de concentração bacteriana, sendo assim exemplificada: a partir de microrganismos cultivados em meio sólido de cultura (por exemplo, Brain Heart Infusio Ágar), incubados à temperatura de 37⁰C e em condições respiratórias adequadas aos microrganismos indicadores, células microbianas foram suspensas em solução fisiológica esterilizada. Em todos os casos, a suspensão-teste deve ser ajustada, com o auxílio do mesmo diluente, ao tubo número 1 da Escala de Macfarland, na concentração aproximada de 10⁸ células por ml (Figura 6).



FIGURA 6 - Escala de Macfarland, que será usada para determinar o grau de contaminação do meio.

Decorridos os cinco minutos de exposição à contaminação, o excesso do material contaminado foi escorrido e, em seguida, as espátulas foram transferidas e dispostas aleatoriamente nas estantes. Dentro da caixa de madeira com luz UV, revestida de papel alumínio, ficaram suspensas aleatoriamente a fim de receberem a incidência de luz negra. A irradiação por luz foi fornecida por uma lâmpada Day light F15 T8 BLB posicionada a uma distância de 10 cm da superfície das espátulas (Figura 7).



FIGURA 7 - Capela, forrada de papel alumínio, local onde serão colocadas as espátulas para a realização do experimento.

A luz negra ativou a propriedade antimicrobiana das nanopartículas (TiO_2 , que é o semicondutor) que revestiam as espátulas utilizando os tempos de exposição de 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos com a fim de determinar o menor tempo necessário para a ativação da ação antimicrobiana das nanopartículas. O objetivo foi saber em qual tempo ocorreria a degradação da proteína que compõe a bactéria. As espátulas foram removidas da caixa e inseridas em meio de

cultura em tubo de ensaio (20 mm x 200 mm) contendo Brain Heart Infusion (BHI-DIFCO), onde permaneceram por 20 minutos em contacto com a solução nutritiva (Figura 8).



Figura 8 - inserção da espátula no meio de cultura

Os tubos foram agitados e os instrumentais removidos. Os procedimentos acima citados foram realizados dentro do Fluxo Laminar Vertical. Os tubos de ensaio semeados foram encaminhados para o processo de incubação, realizado em estufa bacteriológica FAVEM Ltda, modelo retilínea, a 37⁰C. Foi realizada leitura após 24 horas e 48 horas para a verificação do crescimento microbiano nos tubos.

A leitura teve como referencial a presença ou não de turvação. A ação antimicrobiana das nanopartículas foi comprovada quando os meios da cultura permaneceram límpidos e, portanto, sem crescimento microbiano durante 48 horas de incubação a 37⁰C (Figuras 9a e 9b).



FIGURAS 9a e 9b - Prova de Recuperação em caldo BHI, material utilizado para comprovar o crescimento ou não da bactéria.

Após a incubação a 37⁰C, por 24-48 horas, em aerobiose para todos os microrganismos, foi realizada a identificação pela morfologia macroscópica apresentada Figura 10.



FIGURA 10 - Estufa bacteriológica Favem Ltda modelo retilínea, onde os tubos de ensaio permanecerão durante o tempo de incubação.

PROVA DE RECUPERAÇÃO

Para a análise da ação antimicrobiana (pela qual foi verificado o sucesso do processo de esterilização), realizou-se a leitura nos períodos de 24 horas e 48 horas, no local, com a temperatura a 37^oC.

Foram determinados três grupos controle:

- C-1 - espátulas com nanopartículas sem serem contaminadas e sem passar pela luz foram direto para a prova de recuperação (mostra que as espátulas estavam esterilizadas);
- C-2 - espátulas com nanopartículas contaminadas e sem passar pela luz foram para a prova de recuperação (mostra a viabilidade dos microrganismos);
- C-3 - espátulas sem nanopartículas contaminadas e sem passar pela luz (mostra viabilidade dos microrganismos e que as nanopartículas sem exposição à luz negra não tiveram ação antimicrobiana desde o início do experimento).

A análise microbiológica foi realizada no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológica e Bromatológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP e sob a orientação do Centro Multidisciplinar para o Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CMDMC) - Instituto de Química (LIEC), Universidade Federal de São Carlos e Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

Tabela 3 . Fotocatálise heterogênea do <i>Micrococcus luteus</i> em instrumentais odontológicos revestidos com nanopartículas de dióxido de titânio e prata (coating) com diluição (30/3/07)						
Exposição à luz	15 minutos		30 minutos		60 minutos	
Leitura do teste	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Teste	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Controle 1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Controle 2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Controle 3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabela 4 . Fotocatálise heterogênea da <i>Escherichia coli</i> em instrumentais odontológicos revestidos com nanopartículas de dióxido de titânio e prata (coating) com diluição (28/3/07)						
Exposição à luz	15 minutos		30 minutos		60 minutos	
Leitura do teste	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Teste	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Controle 1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Controle 2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Controle 3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho apontaram para a ocorrência da fotocatalise heterogênea do *Micrococccus luteus*, mas não para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Essa divergência nos resultados provavelmente seja devido à baixa patogenicidade da bactéria, segundo Toledo e Castro (1998). O *Micrococccus luteus* foi inativado em curto período de ativação das nanopartículas pela luz UV (15 minutos), permanecendo inativo até o período de 48 horas de observação. Por outro lado, os demais

microrganismos permaneceram viáveis mesmo nos maiores tempos de exposição das nanopartículas à luz UV.

No tratamento com radiação UV e TiO_2 e Ag ocorre a combinação de dois processos: pelo ataque das células pelos radicais hidroxila (OH), gerados pela degradação na superfície fotocatalisadora, e pela absorção direta da radiação UV pelas células, sendo esta, sem dúvida, a responsável por parte significativa da inativação celular. (CORDEIRO; LEITE e DEZOTTI, 2004) Essas ocorrências foram confirmadas por Fernandez e Pizarro (1996) e Kikuchi et al. (1997). Não foram detectadas diferenças nos resultados em função do tempo de exposição do revestimento de nanopartículas de TiO_2 à luz UV, quer seja aos 15, 30 ou 60 minutos.

A luz ultravioleta é absorvida por muitos compostos intracelulares, mas o DNA é o que sofre o maior dano. A maior atividade bactericida ocorre em 260 nm, que é o comprimento de onda mais fortemente absorvido pelo DNA. Após o DNA ter sido exposto à luz UV, ocorre a formação de dímeros de pirimidina. Caso esses dímeros não sejam removidos por enzimas específicas de reparo intracelular, a replicação do DNA pode ser inibida ou alterada, causando mortes ou mutações. Assim, uma desvantagem significativa dos processos de desinfecção UV seria a capacidade dos microrganismos para reparar os danos causados na estrutura do seu DNA caso uma dose subletal fosse usada, segundo Harris e Tosa (1987).

Segundo Tuboy (2005), a luz ultravioleta (UV) é a radiação eletromagnética em que os raios ultravioletas têm um comprimento de onda menor que o da luz visível e maior que o dos raios X. No que se refere aos efeitos à saúde humana e ao meio ambiente, classifica-se como *UVA* (400 nm – 320 nm, também chamada de "luz negra" ou onda longa), *UVB* (320 nm – 280 nm, também chamada de onda média) e *UVC* (280 nm - 100 nm, também chamada de UV curta ou "germicida"). No presente trabalho, foi utilizada uma luz UV daylight BLB, com comprimento de onda de 264 nm. Esse tipo de luz pode ter favorecido uma reativação dos microrganismos. As bactérias possuem vários sistemas enzimáticos para reparar o DNA, que contém os dímeros pirimídicos. A exposição à luz intensa de comprimento de onda em torno de 400 nm pode reativar as células mortas pela clivagem dos dímeros pirimídicos por enzimas formadas pela fotoreativação que ocorre principalmente sob a ação da luz visível. A resistência relativa das diferentes cepas bacterianas à radiação e a outros agentes que agredem diretamente o DNA deve-se à eficácia relativa de seus sistemas enzimáticos de reparação. (JAWETZ ; MELNICK e ADELBERG, 1984) Especula-se que a lâmpada utilizada no presente trabalho (black light blue fluorescente bulb) possa ter essa ação por ser uma luz visível ou que seu comprimento de onda não tenha sido suficiente para ativar o TiO_2 no processo de fotocatalise .

Watts et al. (1995), com o propósito de investigar a possibilidade do TiO_2 atuar como fotocatalisador para desinfecção de

bactérias e vírus em águas efluentes secundárias por meio de processos sem luz e com luz, utilizaram uma suspensão de dióxido de titânio a 250mg l^{-1} irradiando com uma lâmpada fluorescente F40BL a bactéria coliforme e o polivírus 1. Aproximadamente 150 minutos foram necessários para a inativação da bactéria coliforme na presença da luz. Porém, para a inativação do polivírus 1, foram necessários 30 minutos. Quando a desinfecção fotocatalítica foi conduzida em pH entre 5 e 8, não foram encontradas diferenças estatísticas. Os resultados mostraram que o polivírus 1 foi efetivamente inativado pela fotocatalise de dióxido de titânio e bem mais rápido do que a bactéria coliforme. Entretanto, a desinfecção de efluentes utilizando TiO_2 sem luz pode conseguir baixos índices de inativação e necessitar de longos períodos de contato quando comparada com métodos convencionais de desinfecção.

A redução da transmissão da radiação UV pode surgir também em decorrência da deposição de sais pouco solúveis em volta da lâmpada pelo processo de uso da mesma. Compostos como ferro, sulfeto, nitrito e fenol, que absorvem radiação UV no comprimento de onda de 254 nm, podem afetar a eficiência da desinfecção por radiação UV. A presença de matéria orgânica do meio nutriente reduz a cinética da inativação, competindo ostensivamente com as bactérias pelo radical hidroxila (CORDEIRO; LEITE e DEZOTTI, 2004). Foi encontrada nas extremidades da lâmpada utilizada no trabalho a presença dos sais acima citados, que podem ter reduzido a eficiência do processo.

A presença de prata (Ag) na composição do filme cerâmico de nanopartículas de TiO₂ tem papel de intensificador do processo de fotocatalise devido à sua propriedade bactericida.

Yuranova et al. (2006) avaliaram a inativação de *Escherichia coli* em tecidos de algodão por meio da fixação de nanopartículas de prata. A avaliação da ação bactericida da composição algodão-prata foi comparada com a tecidos de algodão contendo camadas de Ag e TiO₂. Os resultados indicaram que tecidos de algodão sem camadas de Ag ou Ag-TiO₂ e apenas submetidos à irradiação UV não obtiveram eficiência na eliminação da *Escherichia coli* e, apenas quando existiu a cobertura de nanopartículas de Ag ou Ag-TiO₂, houve eficiência na inativação da *Escherichia coli*, tendo a melhor “performance” sido em escala escura e não no claro. Assim, muito embora tenha sido utilizada a combinação TiO₂-Ag no presente trabalho, não foram obtidos resultados satisfatórios, o que pode estar relacionado ao fato de os ensaios terem sido realizados em ambiente com luz natural.

CONCLUSÃO

- As bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* não foram inativadas pelo processo de fotocatalise heterogênea em espátulas revestidas com TiO₂ e Ag e irradiadas com luz UV.
- O tempo de exposição à luz UV não influenciou, o processo de fotocatalise para a inativação das bactérias.

- A bactéria *Micrococcus Luteus* foi inativada pelo processo de fotocatalise heterogênea em espátulas revestidas com TiO₂ e Ag e irradiadas com luz UV.

REFERÊNCIAS

Brunharo IHVP, Pacca CAA, Almeida MAO. Esterilização em ortodontia: avaliação de um método utilizando radiação ultravioleta. **Rev Bras Odontol.** 1994; 51: 26-31.

Campbell PM, Phenix N. Sterilization in the orthodontic office. **J Clin Orthod.** 1986; 20: 684-6.

Campos H, Marcenes VS, Souki, BQ et al. Procedimentos utilizados no controle de infecção em consultórios odontológicos de Belo Horizonte. **Arq Cent Estud Curso de Odontologia.** 1989; 25: 46-52.

Consolaro A P, Ursi WJ, Cuoghi OA, Diaz CMA. A hepatite B e a clínica de ortodontia. **Ortodontia.** 1991; 24: 53-8.

Cordeiro ACS , Leite SGF, Dezotti M. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* **Quím Nova.** 2004; 27: 689-94.

Fernandez RO, Pizarro RA. Lethal effect induced in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to ultraviolet A radiation. **Photochem Photobiol.** 1996; 64: 334-9.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. Cap.7, p. 97.

Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K, Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO_2 thin films :dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. **J Photochem Photobiol. A: Chem.** 1997; 106: 51.

Miller JA, Harrower KM, Costello MJ. A novel method of sterilization orthodontic instruments. **Austr Orthod J.** 1992;12:151-2.

Toledo MRF, Castro AFP. Outras bactérias aeróbias e anaeróbias. IN: Trabulsi LR. **Microbiologia**. 2 ed. São Paulo: Ed Atheneu, 1998. Cap. 33: 176.

Tuboy AM. **A Física do laser**. Uma breve introdução. MM OPTICS LTDA. março 2005. 38 p.

Vasconcelos Y. Nanotecnologia: Múltipla utilidades. **Pesquisa FAPESP**. 2007 junho; 136: 72-5.

Watts JR et al. Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent. **Water Res.** 1995; 29: 95-100.

Yuranova T et al. Performance and characterization of Ag-cotton and Ag/ TiO_2 loaded textiles during the abatement of *E. coli*. **J Photochem Photobiol. A: Chem.** 2006; 181: 363-9..

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em várias instituições do mundo acadêmico têm sido desenvolvidas muitas pesquisas visando maior adequação e otimização do processo fotocatalítico para utilização no âmbito industrial, assim como na saúde pública.

A fim de implementar o sistema fotocatalítico contínuo em grande escala, diversos estudos sobre a inativação de microrganismos envolvendo bactérias, protozoários, vírus e fungos vêm sendo realizados tanto na água como no ar e em metais objetivando a desinfecção de abastecimentos de água, ambientes e instrumentais sujeitos a contaminação.

Os diferentes resultados obtidos são justificados pela utilização de diferentes bactérias, uma vez que estas apresentam uma variedade de propriedades morfológicas e fisiológicas que levam a distintas respostas celulares, mesmo sendo submetidas às mesmas condições experimentais. Estudos de Cordeiro et al.⁸ (2004) sugeriram que diferentes microrganismos respondem de maneiras diferentes ao fotocatalisador TiO_2 devido às suas diferentes estruturas, particularmente no que diz respeito à complexidade e à espessura do envelope celular.

No tratamento com radiação UV e TiO_2 ocorre a combinação de dois processos, o ataque das células pelos radicais hidroxila (-OH) gerados pela degradação na superfície do fotocatalisador e também a

absorção direta da radiação UV pelas células, sendo esta, sem dúvida, a responsável pela parte significativa da inativação celular. (Cordeiro et al.⁸, 2004)

Os Processos Oxidativos Avançados (POA) são tecnologias alternativas que envolvem a geração de radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$), altamente oxidantes devido à sua alta reatividade e que podem reagir com uma grande variedade de compostos orgânicos. O interesse pelos POA tem crescido enormemente, por serem consideradas tecnologias limpas e processos biológicos bastante promissores do ponto de vista econômico. Extrapolando nossos resultados para a clínica odontológica, é um sistema avançado, que pode levar a uma modificação no processo de esterilização dos instrumentos odontológicos.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS *

1. Ashikaga T et al. Effect of the photocatalytic activity of TiO₂ on plasmid DNA. *Mutat Res.* 2000, 466:1-7.
2. Bekbölet M, Araz CV. Inactivation of *Escherichia coli* by photocatalytic oxidation. *Chemosphere.* 1996; 32: 959-65.
3. Bertazzoli R, Pelegrini R. Descoloração e degradação de poluentes orgânicos em soluções aquosas através do processo fotoeletroquímico. *Quím Nova.* 2002; 25: 470-6.
4. Bidoia ED, Moraes PB, Gusmão ICCP. Desinfecção eletroquímica usando TiO₂/RuO₂ em suspensões de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. 2007 set. 24. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_rab/317.PDF
5. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente transmissíveis/AIDS. Hepatite, AIDS e herpes na prática odontológica. Brasília; 1994.
6. Brunharo IHVP, Pacca CAA, Almeida MAO. Esterilização em ortodontia: avaliação de um método utilizando radiação ultravioleta. *Rev Bras Odontol.* 1994; 51: 26-31.
7. Consolaro A P, Ursi WJ, Cuoghi OA, Diaz CMA. A hepatite B e a clínica de ortodontia. *Ortodontia.* 1991; 24: 53-8.

* De acordo com o estilo Vancouver.

Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

8. Cordeiro ACS, Leite SGF, Dezotti M. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.* Quím Nova. 2004; 27: 689-94.
9. Cottone JA, Terezhalmay GT, Molinari JA, editors. Practical Infection Control in Dentistry. 2 ed: Media: Willims & Wilkins 1996.
10. Fernandez RO, Pizarro RA. Lethal effect induced in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to ultraviolet A radiation. Photochem Photobiol. 1996; 64; 334-9.
11. Hu C, Guo J, Qu J, Hu X. Photocatalytic Degradation of Pathogenic Bacteria with AgI/TiO₂ under Visible Light Irradiation. Langmuir. 2007; 23: 4982-7.
12. Johnston MW, Moore WC, Rodu B. Comparison of convention heat sterilization units for the orthodontics office. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1991; 99: 57-63.
13. Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K, Fujishima; Fujishima A. Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films :dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. J Photochem Photobiol A Chem. 1997; 106: 51-56.
14. Kirchhoff ST. Sterilization and Desinfection-part 1. J Clin Orthod. 1987; 21: 327-8.

15. Kondo MM, Orlanda JFF, Ferreira MGAB, Grassi T. Proposição de um reator fotocatalítico para destruição de microrganismos em ambientes interiores. *Quím Nova*. 2003, 26: 133-5.
16. Nogueira RFP, Jardim FW. A fotocatalise heterogênea e sua aplicação ambiental. *Quím Nova*. 1998; 21: 69-72.
17. Oguma K, Otaki M, Ohgaki S. Proceedings of the 53a Annual Conference of the JSCE. 1998; 7: 250.
18. Otaki M, Hirata T, Ohgaki S. Aqueous microorganisms inactivation by photocatalytic reaction. *Water Sci Technol*. 2000; 42:103-8.
19. Payne GS. Sterilization and disinfection in the ortodontics office : a practical approach. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1986; 90: 250-2.
20. Reddy KM; Manorama AR; Reddy AR Bandgap studies on anatase titanium dioxide nanoparticlesz . *Mat Chem Phys*. 2002; 78: 239-45.
21. Rincón AG, Pulgarin C. Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO₂ photo-assisted treatment of mixed *E.coli* and *Bacillus sp.* and bacterial community present in wastewater. *Catalysis Today*. 2005; 101: 331-44.
22. Saramanayake LP, Scheutz F, Cottone JA, editors. Infection control for the dental team. Copenhagen: Munksgaard; 1991.

23. Saramanayake LP. Rules of infection control. *Int Dent J.* 1993; 43: 578-84.
24. Simpson JP, Whittaker DK. Serum contamination of instruments in dental practices *Br Dent J.* 1979; 146: 76-8.
25. Sunada K, Kikuchi Y, Hashimoto K, Fujishima A. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysis. *Environ Technol.* 1998; 32: 726-8.
26. Sunada K, Watanabe T, Hashimoto K. Studies on photokilling of bacteria on TiO₂. *J Photochem Photobiol A: Chem.* 2003, Is.1-3, 156: 227-33.
27. Tuboy AM. A Física do laser. Uma breve introdução. MM OPTICS LTDA. Março 2005. 38 p.
28. Tryk DA, Fujishima A, Honda K. Recent topics in photoelectrochemistry: achievements and future prospects. *Electrochimica Acta.* 2000, 45: 2363-76.
29. Vasconcelos Y. Novos materiais: bisturi autolimpante Pesquisa FAPESP. 2006. 121: 72-3.
30. Yuranova T, Rincon AG, Pulgarin C, Laub D, Xantopoulos N, Mathieu HJ et al. Performance and characterization of Ag-cotton

and Ag/TiO₂ loaded textiles during the abatement of *E. coli*. J Photochem Photobiol A: Chemistry. 2006, 181: 363-9.

31. Ziolli RL, Jardim WF. Mecanismo de fotodegradação de compostos orgânicos catalisada por TiO₂. Quím Nova. 1998; 21: 319-25.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 23 de setembro de 2008.

CECILIA HELENA SOARES PORTO