

JACQUELINE STELLA BARBOSA DE SOUZA

**Atividade Antimicrobiana de Nanopartículas de CeO₂ *in vitro* frente as bactérias
Escherichia coli e *Staphylococcus aureus***

JACQUELINE STELLA BARBOSA DE SOUZA

**Atividade Antimicrobiana de Nanopartículas de CeO₂ *in vitro* frente às bactérias
Escherichia coli e *Staphylococcus aureus***

Trabalho de Graduação apresentado ao Conselho de Curso de Graduação em Engenharia Mecânica da Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do diploma de Graduação em Engenharia Mecânica.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Zirpoli Simões

S729a

Souza, Jacqueline Stella Barbosa de

Atividade antimicrobiana de nanopartículas de CeO_2 *in vitro* frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* / Jacqueline Stella Barbosa de Souza – Guaratinguetá, 2016.

70 f : il.

Bibliografia: f. 65-70

Trabalho de Graduação em Engenharia Mecânica – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Zirpoli Simões

1. Nanopartículas 2. Óxidos de cério 3. Micro-ondas 4. Agentes anti-infecciosos I. Título

CDU 620.1

JACQUELINE STELLA BARBOSA DE SOUZA

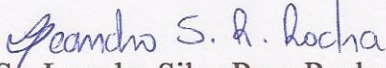
ESTE TRABALHO DE GRADUAÇÃO FOI JULGADO ADEQUADO
COMO PARTE DO REQUISITO PARA A OBTENÇÃO DO DIPLOMA DE
"GRADUADO EM ENGENHARIA MECÂNICA"

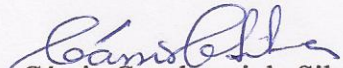
APROVADO EM SUA FORMA FINAL PELO CONSELHO DE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Prof. Dr. MARCELO SAMPAIO MARTINS
Coordenador

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Alexandre Zirpoli Simões
Orientador/UNESP-FEG


MSc. Leandro Silva Rosa Rocha
UNESP-FEG


Prof. Dr. Cássia Cavalcanti da Silva
UNESP-FEG

Dezembro de 2016

DADOS CURRICULARES

JACQUELINE STELLA BARBOSA DE SOUZA

NASCIMENTO 29.07.1985 – São Paulo / SP

FILIAÇÃO José Alberto de Souza
 Françoise Barbosa de Souza

2006/2009 Curso de Graduação
 Biologia – Centro Universitário Teresa D'Ávila - UNIFATEA
 (Lorena/SP)

2009/2010 Curso de Especialização em Análises Clínicas - Centro Universitário
 Teresa D'Ávila – UNIFATEA (Lorena/SP)

2012/2016 Curso de Graduação
 Engenharia Mecânica – Faculdade de Engenharia do Campus de
 Guaratinguetá da Universidade Estadual Paulista.

Dedico este trabalho de modo especial,
à minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter colocado em meu caminho pessoas tão maravilhosas e sábias que me auxiliaram, compreenderam e incentivaram durante a minha vida pessoal e acadêmica.

Aos meus pais, Françoise Barbosa de Souza e José Alberto de Souza, meus irmãos Jefferson Alberto de Souza, Jéssica Barbosa de Souza e Júlia Barbosa de Souza pelo apoio e compreensão em todos os momentos.

Ao meu admirável orientador Prof. Dr. Alexandre Zirpoli Simões pelo exemplo de dedicação, profissionalismo e humanidade que pretendo carregar comigo durante toda a minha vida profissional.

Ao meu querido amigo José Eduardo que teve tanta paciência auxiliando-me nos procedimentos experimentos.

Ao Laboratório Médico Vital Brasil pelo fornecimento das bactérias utilizadas no trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Teresa D'Ávila (UNIFATEA) em Lorena por ter disponibilizado o local e equipamentos para a realização do trabalho, e ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara pela realização na análise antimicrobiana.

Ao Laboratório Interdisciplinar em Cerâmica (UFSCAR e IQ-UNESP) por toda infraestrutura cedida.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A vida é como uma grande corrida de bicicleta, cuja meta é cumprir a Lenda Pessoal. Na largada, estamos juntos, compartilhando camaradagem e entusiasmo. Mas, à medida que a corrida se desenvolve a alegria inicial cede lugar aos verdadeiros desafios: o cansaço, a monotonia, as dúvidas quanto à própria capacidade. Reparamos que alguns amigos desistiram do desafio, ainda estão correndo, mas apenas porque não podem parar no meio da estrada. Eles são numerosos, pedalam ao lado do carro de apoio, conversam entre si, e cumprem uma obrigação. Terminamos por nos distanciar deles; e então somos obrigados a enfrentar a solidão, as surpresas com as curvas desconhecidas, os problemas com a bicicleta.

Perguntamo-nos finalmente se vale à pena tanto esforço.

Sim, vale. É só não desistir."

Paulo Coelho

SOUZA, J. S. B. **Atividade antimicrobiana de nanopartículas de CeO₂ *in vitro* frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***. 2016. 67f. Trabalho de Graduação (Graduação em Engenharia Mecânica) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

RESUMO

Nanopartículas de óxido de cério foram obtidas pela técnica de síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas e avaliadas frente ao crescimento das espécies *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Tais interações foram monitoradas em função da dimensão das partículas de óxido de cério, meio de crescimento, pH, surfactante e concentração inibitória mínima. Este estudo teve como objetivo investigar as propriedades bactericidas dos cristais de CeO₂ sintetizados a partir de soluções aquosas de seus sais e processados em sistema hidrotérmico assistido por radiação de micro-ondas. Os cristais obtidos foram caracterizados por: difração de raios X (DRX), espectroscopia de espalhamento Raman, FT-IR, espectroscopia de absorção, UV-Vis, microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FEG-SEM) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), área superficial específica (BET). Foi avaliada a atividade antimicrobiana destes cristais frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, assim como a influência dos surfactantes hexametiltrietilamina (HMTA) e polietilenoglicol (PEG) nas características estruturais, morfológicas e biológicas destas nanopartículas. O método de síntese hidrotermal assistido por micro-ondas (HAM) demonstrou ser um método de síntese eficiente na obtenção de nanopartículas, permitindo o emprego de baixas temperaturas de síntese (100°C) e baixo tempo de processamento. Os resultados indicam a formação de nanopós com estrutura cúbica, grupo espacial Fm3m, partículas monodispersas com “band gap” em torno 3,0 eV. Dados indicam que as nanopartículas obtidas são livres de contaminantes e que o mecanismo de crescimento dessas no reator hidrotermal corresponde ao processo de dissolução-precipitação. Os ensaios microbiológicos indicam inibição de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*) quando colocados frente a solução coloidal de 1000 ppm, já a solução coloidal de 18 ppm, por outro lado, não apresentaram atividade antimicrobiana, devido à baixa concentração de CeO₂ nessa solução coloidal. A adição do surfactante permitiu a obtenção de nanopartículas de CeO₂ cristalinas com diferentes tamanhos de cristalitos e a redução na formação de aglomerados.

PALAVRAS-CHAVE: CeO₂. Hidrotermal micro-ondas. Atividade antimicrobiana. Nanopartículas.

SOUZA, J. S. B. **Atividade antimicrobiana de nanopartículas de CeO₂ *in vitro* frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***. 2016. 67f. Undergraduate Work (Undergraduate in Mechanical Engineering) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2016.

ABSTRACT

Cerium oxide nanoparticles were obtained by the microwave-assisted hydrothermal synthesis technique and evaluated against the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* species. Such interactions were monitored as a function of particle size of cerium oxide, growth medium, pH, surfactant and minimum inhibitory concentration. The goal of this study was to investigate the bactericidal properties of crystals of CeO₂ synthesized from aqueous solutions of their salts and processed in hydrothermal system assisted by microwave radiation. The obtained crystals were characterized by X ray diffraction (DRX), Raman scattering spectroscopy, FT-IR, absorption spectroscopy, UV-Vis, field emission scanning electron microscopy (FEG-SEM) and transmission electron microscopy (TEM), specific surface area (BET). The antimicrobial activity of these crystals was evaluated against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, as well as the influence of the hexamethyltriethylamine (HMTA) and polyethylene glycol (PEG) surfactants on the structural, morphological and biological characteristics of these nanoparticles. The microwave-assisted hydrothermal synthesis (HAM) method has been shown to be an efficient synthesis method for obtaining nanoparticles, allowing the use of low synthesis temperatures (100°C) and low processing time. The results indicate the formation of nanophos with cubic structure, space group Fm3m, monodisperse particles with “band gap” around 3.0 eV. Data indicate that the nanoparticles obtained are free of contaminants and that the growth mechanism of these in the hydrothermal reactor corresponds to the dissolution-precipitation process. The microbiological assays indicated the inhibition of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) when placed in front of the colloidal solution of 1000 ppm, and the colloidal solution of 18 ppm, on the other hand, showed no antimicrobial activity due to low CeO₂ concentration is the colloidal solution. The addition of the surfactant allowed to obtain crystalline CeO₂ nanoparticles with different sizes of crystallites and the reduction in the formation of agglomerates.

KEYWORDS: CeO₂. Hydrothermal microwave. Antimicrobial activity. Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-a) Representação esquemática de aglomerado de nanopartículas esféricas e b) imagem obtida por MET de aglomerado de nanopartículas de CeO ₂ .	15
Figura 2- a) Representação esquemática de agregado de nanopartículas esféricas e b) imagem obtida por FEG-SEM de agregado de nanopartículas CeO ₂ .	16
Figura 3- Estrutura cristalina da rede fluorita cúbica (Fm3m) de CeO ₂ . Átomos Ce e O são mostrados como esferas pretas e cinzas respectivamente.	19
Figura 4 - Fluxograma das aplicações dos compostos de cério.	20
Figura 5 - (a) sistema hidrotérmico micro-ondas; (b) meio reacional aquecido por micro-ondas; (c) acoplamento da água com as micro-ondas.	23
Figura 6 - Diagrama simplificado do envelope celular de bactéria Gram positiva e Gram negativa.	25
Figura 7- Fluxograma do processo de síntese, processamento e caracterização das nanopartículas de CeO ₂ puro com KOH.	28
Figura 8- Fluxograma do processo de síntese, processamento e caracterização das nanopartículas de CeO ₂ puro e com KOH e surfactantes.	29
Figura 9 - Fotos do HAM e seus principais componentes (a) copo de teflon, (b) reator hidrotérmico, (c) Transferência para o copo de teflon e para a célula de hidrotermalização e sistema hidrotermal de microondas.	30
Figura 10- Forno de micro-ondas doméstico: Sistema adaptado para sínteses de materiais cerâmicos.	31
Figura 11 - (a) Solução resultante antes da centrifugação; (b) Centrifugação e Lavagem das nanopartículas; (c) secagem das nanopartículas em estufa por 48h; (d) obtenção das nanopartículas de CeO ₂ puro e com surfactantes	31
Figura 12 - (a) Homogeneização no banho de ultrassom; (b) Inoculação do microrganismo; (c) discos de Whatman em determinado volume de solução; (d) Estufa por 24h.	33
Figura 13- Difratoograma de raios x de nanopartículas de CeO ₂ obtidas a 100 °C por 8 min em (a) KOH, (b) KOH + HMTA, (c) KOH + PEG.	41
Figura 14 - Espectroscopia de espalhamento Raman de nanopartículas CeO ₂ (a) com KOH, (b) com KOH + HMTA, (c) com KOH + PEG	45
Figura 15 - Espectroscopia de FT-IR dos pós de CeO ₂ com (a) KOH, (b) PEG e (c) HMTA.	48
Figura 16 – FEG-SEM de nanopartículas de CeO ₂ (a) com KOH, (b) com KOH + HMTA e (c) com KOH +PEG.	50

Figura 17 - Nanopartículas de CeO ₂ com KOH, t=8 min.	51
Figura 18 - Espectros de UV-Vis no modo absorvância x energia, das amostras de CeO ₂ com (a) com KOH, (b) com KOH + HMTA e (c) com KOH +PEG.	53
Figura 19 - (a) Halo de inibição frente a <i>E. coli</i> (b) Halo de inibição frente a <i>S. aureus</i>	55
Figura 20 – Nanopartículas após banho de ultrassom.	56
Figura 21 - Ensaios Antimicrobianos com nenhuma inibição.....	56
Figura 22 - Nanopartículas após banho de ultrassom.....	57
Figura 23 - Ensaios Antimicrobianos com nenhuma inibição do material.....	57
Figura 24 – (a) Nanopartículas de CeO ₂ puro, juntamente com os discos de Whatman, nas concentrações de 8mM, 15mM e 30mM, antes de irem para a estufa, (b) após secagem em estufa, (c) Nanopartículas prontas para experimento biológico.	58
Figura 25 - Halo de inibição frente a <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	58
Figura 26 - Teste de difusão utilizando cepas de (a) <i>Escherichia coli</i> (b) <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Figura 27 – Espectros de UV-Vis das soluções coloidais de NPs de CeO ₂ de 18 ppm e de 1000 ppm (diluição de 100 vezes).....	60
Figura 28 – Imagens de FEG-SEM das Nanopartículas de CeO ₂ (a) 18 ppm (b) 1000 ppm...	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Área superficial e tamanho do Cristalito.....	42
Tabela 2 – Tamanho de nanopartículas de CeO ₂ com KOH, KOH + HMTA e KOH + PEG.	49
Tabela 3 - Valores do “band gap” das nanopartículas de CeO ₂ puro com agente mineralizador KOH, KOH + HMTA e KOH + PEG.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$(\text{NH}_4)_2 \text{Ce} (\text{NO}_3)_6$ - Nitrato de Cério Amônio

CeO_2 - Óxido de Ceria

nm - nanometro

NPs - Nanopartículas

HAM – Hidrotermal Assistido por Microondas

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

BET - Isotermas de Adsorção Brunauer, Emmett e Teller

DRX - Difração de raios-X

FT-IR - Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

FEG-SEM - Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo

FEG-MEV - Microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo

HR-MET - Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

UV- Vis - Ultravioleta visível

HMTA - Hexametiltrietilamina

PEG - Polietilenoglicol

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

E. coli - *Escherichia coli*

Fm3m - Fluorita cúbica

KOH - Hidróxido de Potássio

ppm - parte por milhão

FCFAR - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

ATCC - American Type Culture Collection

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Nanomateriais.....	14
1.2	Nanoestruturas	15
1.3	Surfactantes Catiônicos e Aniônicos	16
1.3.1	Surfactante Hexametiltrietilamina (HMTA)	16
1.3.2	Surfactante Polietilenoglicol (PEG).....	17
1.4	Atividade Antimicrobiana	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Cério	19
2.2	Óxido de Cério.....	19
2.2.1	Aplicações do Ce.....	20
2.2.2	Nanocristais semicondutores em nanoescala	21
2.2.3	Sínteses Hidrotérmica Micro-ondas	21
2.3	Características das Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	24
2.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	26
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivos gerais	27
3.2	Objetivos Específicos	27
3.3	Metas	27
4	MATERIAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
4.1	Procedimento experimental	28
4.2	Crescimento e obtenção dos materiais nanopartículados.....	29
4.3	Análise da Atividade Antimicrobiana	32
5	MÉTODOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	34
5.1	Difração de raios X (DRX)	34
5.2	Espectroscopia de espalhamento Raman	35
5.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)	35
5.4	Espectroscopia ótica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis)	36
5.4.1	Cálculo da energia da banda proibida “BAND GAP”	36
5.5	Microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG-MEV).....	37
5.6	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-MET)	38

5.7	Área superficial específica: Método BET	39
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1	Análise da difração de raios X	40
6.2	Espectroscopia de espalhamento Raman	43
6.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT - IR)	46
6.4	Microscopia eletrônica de emissão de campo (FEG-SEM)	49
6.5	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	51
6.6	Espectroscopia óptica na região do UV- Visível.....	52
6.7	Atividade Antimicrobiana	54
6.7.1	Análise do Halo de Inibição	54
7	CONCLUSÃO	63
8	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanomateriais

Nanopartículas de Cerio (CeO_2) têm sido considerado como um nanomaterial importante para aplicações em catalisadores, células combustíveis, absorvedores ultravioleta, materiais de armazenamento de hidrogênio, sensores de gases, dispositivos ópticos e polimento de materiais (PELLETIER et al., 2010). Quando comparado às macroestruturas, maiores proporções de átomos ou moléculas constituintes encontram-se na superfície dos nanomateriais, levando a uma área superficial elevada, a qual pode influenciar em sua reatividade, dureza, bem como nas propriedades optoeletrônicas, magnéticas e catalíticas (CAO, 2004).

Vários métodos foram desenvolvidos para preparar nanopartículas de CeO_2 , incluindo tratamento convencional hidrotérmico, co-precipitação, precursor polimérico, método de fluxo, decomposição organometálica, aquecimento assistido por micro-ondas, e microondas-hidrotermal (SANTOS, 2008).

Entre os vários métodos, a cristalização hidrotérmica é um processo interessante para preparar nanopartículas com baixa temperatura de síntese. O método hidrotérmico assistido por microondas requer tempos mais baixos, e temperatura (inferior a $200\text{ }^\circ\text{C}$) para se obter as nanopartículas. Por este motivo, a introdução de aquecimento por microondas com o método convencional, hidrotérmico é vantajoso para a síntese de nanopartículas, porque o aquecimento por microondas permite uma redução do tempo de processamento e custos de energia. Da mesma forma, as partículas com tamanho e forma desejados podem ser produzidas os parâmetros tais como o pH da solução, temperatura da reação, tempo de reação, concentração de soluto e do tipo de solvente são cuidadosamente controladas (LEE; CHOI, 2004).

Uma modificação do método hidrotérmico desenvolvido por Komarneni (1992, 1993, 1994) envolve a introdução de microondas durante a síntese hidrotérmica para aumentar a cinética da cristalização por uma a duas ordens de grandeza em comparação com o convencional hidrotermal. O forno de microondas, método hidrotermal apresenta vantagens tais como a conveniência, rapidez e custo-efetividade. Sistemas de ceria com partículas nanométricas foram sintetizadas com sucesso pelo método MAH utilizando uma temperatura relativamente baixa e tempo de reação curto (KOMARNENI, 1995).

1.2 Nanoestruturas

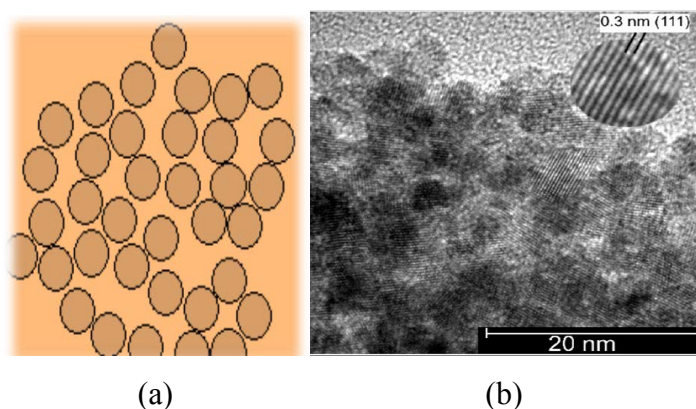
Material nanoestruturado é aquele que apresenta uma microestrutura com um tamanho característico (em pelo menos uma direção) menor que 100 nm (GLEITER, 2003) e são definidos como materiais policristalinos, mono ou multifásicos com tamanhos de grãos na escala nanométrica, constituídos principalmente de nanocristais (KEAR; COLAIZZI; LIAO, 2001). Em se tratando da nanoescala, observam-se novos aspectos não presentes na macroescala, gerando importantes mudanças de comportamento, não apenas pela ordem de magnitude da redução de tamanho, mas também por fenômenos intrínsecos, observados ou que se tornam predominantes e que não necessariamente eram previsíveis no mundo macro.

Estes materiais, que têm manipulação controlada de sua estrutura em nível atômico, podem ser classificados de acordo com sua microestrutura, composição química ou quanto à sua forma dimensional (GLEITER, 2000).

Devido a estas dimensões muito pequenas, os materiais nanoestruturados policristalinos são estruturalmente caracterizados por uma grande fração volumétrica de contornos de grãos ou interfaces, as quais podem alterar significativamente uma variedade de propriedades físicas e químicas quando comparados aos materiais cristalinos microestruturados. Estas variações nas propriedades resultam do tamanho reduzido, forma dos cristalitos, baixa densidade e/ou número de coordenação nas interfaces entre os grãos (KEAR; COLAIZZI; LIAO, 2001).

Os pós nanoparticulados possuem a característica de se aglomerar ou se agregar. Os aglomerados são definidos como um conjunto de nanopartículas mantidas próximas por forças fracas dos tipos van der Waals figura 1.

Figura 1-a) Representação esquemática de aglomerado de nanopartículas esféricas e b) imagem obtida por MET de aglomerado de nanopartículas de CeO_2 .

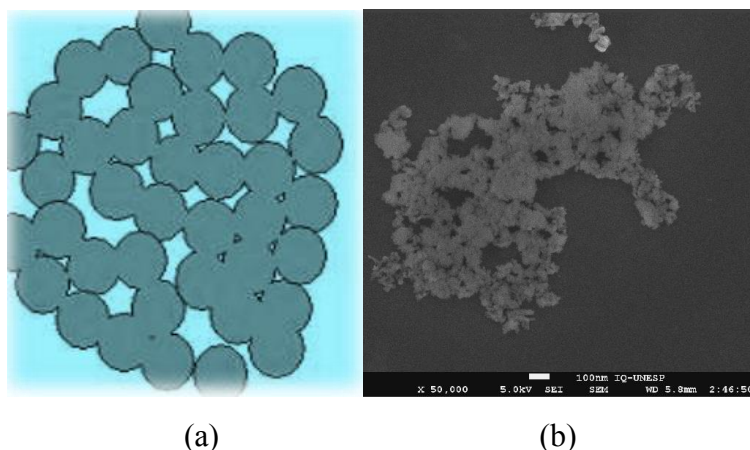


Fonte: Deus (2013). Imagem obtida por de MET / IQ-UNESP – Araraquara.

Os agregados são formados de nanopartículas fortemente agrupados entre si como demonstra a Figura 2 (NONO, 2006).

Os materiais nanoestruturados podem ainda, receber outra classificação baseada na sua dimensão zero, a qual corresponde ao agrupamento de átomos ou conjunto de agrupamentos, denominados *clusters*.

Figura 2- a) Representação esquemática de agregado de nanopartículas esféricas e b) imagem obtida por FEG-SEM de agregado de nanopartículas CeO₂.



Fonte: Deus (2013). Imagem obtida por FEG-SEM – IQ-UNESP/ Araraquara.

1.3 Surfactantes Catiônicos e Aniônicos

1.3.1 Surfactante Hexametiltrietilamina (HMTA)

HMTA é uma amina terciária solúvel em água, surfactante aniônico, e também uma espécie tetradentada que pode ter um papel específico na cristalização de nanoestruturas altamente orientadas. Há duas teorias sobre a influência desse agente de crescimento na anisotropia dos materiais que crescem nesta solução, a primeira sugere que ocorre formação de pontes de hidrogênio estáveis com os metais de transição, tendo as moléculas de água como pontos de ligação entre o metal e o nucleador, o que facilita a cristalização em nanoestruturas unidimensionais (AFANASIEV, 2008).

Devido à baixa basicidade e formação de complexos metálicos o principal papel dessa amina é agir como um tampão de pH. As espécies OH⁻ liberadas na solução, durante a decomposição do nucleador em formaldeído e amônia com o aumento da temperatura, controlam o pH do meio.

1.3.2 Surfactante Polietilenoglicol (PEG)

A utilização de PEG, surfactantes catiônico, em meio orgânico torna-se, portanto, uma das novas estratégias para estabilizar o sistema em reações de síntese, provavelmente devido ao fato de minimizar as interações hidrofóbicas e atrações eletrostáticas entre a proteína e o suporte (HARRIS,1998), protege a enzima dos efeitos de desnaturação, sem interferir na velocidade de reação de esterificação. O recobrimento com PEG representa um compromisso entre as forças atrativas de ligação ao suporte e as forças repulsivas, devido ao efeito estérico produzido pela interação das cadeias do polímero em solução (ROCHA, 1998; VILLENEUVE et al., 2000). Sabe-se que na sua forma livre, em geral, o PEG tende a agregar proteínas em solução o que, possivelmente, deve promover a oclusão das enzimas e a ligação da camada protetora do polímero ao suporte (HARRIS, 1998). De acordo com a literatura, o polietilenoglicol é solúvel em água, tolueno e outros solventes, entretanto insolúvel em hexano, éter e etilenoglicol (HARRIS, 1998).

Vidyasagar ao ajustar a quantidade de PEG, observou que estas podem modificar o tamanho e a morfologia do produto, reduzindo a quantidade de surfactante o que resulta na melhoria da cristalinidade. Muitos artigos têm relatado que o PEG é estrutura de cadeia ordenada e uniforme a qual é facilmente absorvida na superfície do óxido. Quando a superfície do colóide adsorve PEG, a reação vai modificando a cinética do processo de crescimento, que é atribuída ao substrato, o que causa o rápido crescimento de nucleação e provoca a agregação das nanopartículas. Portanto, a adição de PEG pode elevar a cristalinidade das amostras e alterar a morfologia das nanopartículas (VIDYASAGAR, 2012).

1.4 Atividade Antimicrobiana

As bactérias constituem um grupo de micro-organismos causadores de várias doenças, algumas são bem antigas, persistentes, produtoras de toxinas, relacionados a práticas inadequadas de manipulação e processamento de alimentos, as quais podem ser citadas a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*).

A *E. coli* é uma bactéria componente da flora normal do intestino humano e de animais saudáveis, são bacilos gram-negativos responsáveis pelas doenças infecciosas em humanos que causam uma ampla variedade de infecções intestinais (diarreia, vômito e cólica abdominal) ou extra-intestinais (CARVALHO, 2005). Em crianças menores de cinco anos e idosos, essas bactérias podem causar complicações como a Síndrome Hemolítico-Urêmica

(SHU), com insuficiência renal, deterioração neurológica e a Púrpura Trombocitopênica Trombótica (PTT). Outras sequelas dessas doenças podem ser destacadas, tais como: pressão alta, crise convulsiva, cegueira, paralisia, e que pode resultar na remoção de parte do intestino do paciente, intussuscepção e morte. Por isso esse tipo de bactéria é um dos sorotipos mais estudado por causar um quadro agudo de colite hemorrágica.

A *S. aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos gram-positivos que faz parte da microbiota humana, mas que pode provocar doenças que vão desde uma infecção simples, como espinhas e furúnculos, até as mais graves, como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico e septicemia, entre outras. Essa bactéria foi uma das primeiras a serem controladas com a descoberta dos antibióticos, mas, devido a sua enorme capacidade de adaptação e resistência, tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (TRABULSI, 2005).

Ambas as bactérias (*E. coli*, e *S. aureus*) tem seus meios de transmissão semelhante: deposição de resíduos fecais em água. Estas águas são na maioria das vezes distribuídas sem tratamento adequado, podendo assim causar contaminação de indivíduos de forma direta por ingestão de água ou indireta por ingestão de alimentos contaminados, levando assim estas bactérias até o ser humano saudável, via transmissão oral (MINGUEZ, 1990).

2 REVISÃO DA LITERATURA

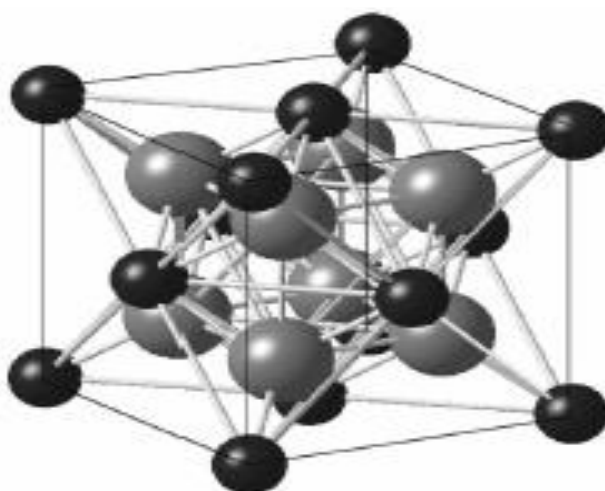
2.1 Cério

O íon cérico é um poderoso agente oxidante, mas quando associado com o oxigênio, um agente ligante fortemente coordenado, ele é completamente estabilizado tornando-se óxido de cério, CeO_2 , esta é a forma do cério mais utilizada. Cério é o membro mais abundante da série dos elementos conhecidos como lantanídeos ou terras raras. Suas propriedades químicas proporcionam muitos usos tecnológicos. Ele é caracterizado quimicamente como tendo dois estados de valência: Ce^{4+} denominado cérico e Ce^{3+} denominado ceroso (CERIUM, 1995).

2.2 Óxido de Cério

O óxido de cério possui a estrutura cúbica tipo fluorita, CaF_2 , com grupo espacial $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$, com quatro átomos de cério e oito átomos de oxigênio por célula unitária, com mostra a Figura 3 (SKORODUMOVA, 2001). O óxido de cério mais estável é o dióxido de cério, CeO_2 , também chamado céria ou óxido de cério (CERIUM, 1995). Ambos os óxidos de Ce são compostos refratários, os quais são opticamente transparentes na região do espectro visível e altamente absorventes na região do ultravioleta.

Figura 3- Estrutura cristalina da rede fluorita cúbica ($\text{Fm}\bar{3}\text{m}$) de CeO_2 . Átomos Ce e O são mostrados como esferas pretas e cinzas respectivamente.



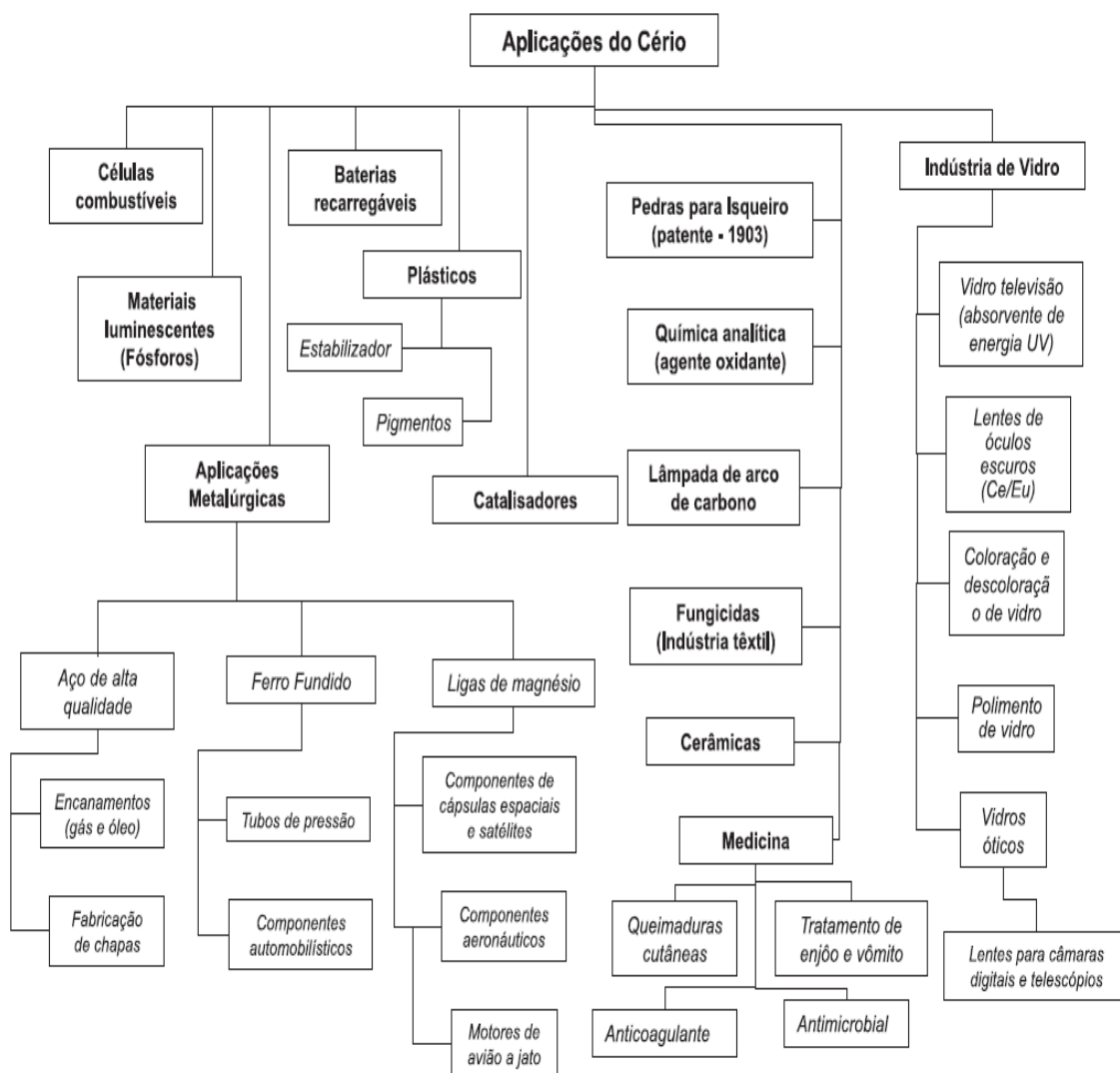
Fonte: Skorodumova (2001)

2.2.1 Aplicações do Ce

São inúmeras as áreas de aplicações tecnológicas do cério (CERIUM, 1995) (MARTINS; ISOLANI, 2005), tais como: metalurgia, vidros e cerâmicas, catálise de oxidação de poluentes, materiais luminescentes. Em cada uma dessas áreas existe um grande número de materiais, onde o Ce está presente em maior ou menor quantidade. (SKORODUMOVA, 2001; HIBINO, 2000; SANTOS, 2013).

Os compostos de cério têm um enorme potencial para aplicação em diversas vertentes tecnológicas, devido à alta mobilidade de oxigênio na rede cristalina e alta afinidade por compostos contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre (MARTINS, 2007). Algumas dessas aplicações são mostradas no fluxograma da Figura 4.

Figura 4 - Fluxograma das aplicações dos compostos de cério.



Fonte: Martins (2007)

2.2.2 Nanocristais semicondutores em nanoescala

Semicondutores são materiais com poucos elétrons de condução. Eles tornam-se condutores pela agitação térmica dos elétrons ou, pela dopagem do material com outros átomos que contribuem com elétrons para a banda de condução (HALLIDAY; RESNICK; WALKER, 1996).

Os semicondutores são conhecidos por terem os estados vazios adjacentes à banda de valência parcialmente indisponíveis. Os elétrons, portanto, precisam atravessar um espaçamento que separa a banda de valência da banda de condução para que haja condução. Para isso é necessário fornecer ao elétron a diferença de energia entre estes dois estados, que é aproximadamente igual à energia de espaçamento entre as bandas.

Salienta-se que nestes materiais semicondutores, sua condutividade elétrica pode ser alterada por estímulos externos, tais como campo magnético e campo eletromagnético. Entre estes materiais, os nanocristais semicondutores têm atraído um grande interesse ao longo dos últimos anos devido suas propriedades serem diferentes dos materiais micrométricos. Entre essas propriedades, a modificação da energia do “band gap” é a mais interessante para os semicondutores. Controlando esta energia (por intermédio da forma, defeitos estruturais, entre outros) pode-se observar diferentes propriedades do mesmo material. Estes tipos de semicondutores possuem um grande número de aplicações, tais como displays de tela plana, sensores óticos, dispositivos eletroluminescentes, janelas de infravermelho, catalisadores e lasers (FERRER, 2012; LIMA, 2010; LIMA, 2008; SANTOS, 2013).

2.2.3 Sínteses Hidrotérmica Micro-ondas

O processamento hidrotérmico envolve o tratamento de soluções homogêneas ou (hidro) suspensões de óxidos a temperaturas entre 60 e 500° C. É necessária alta pressão para manter uma fase em solução (fase líquida com sais dissolvidos) em temperaturas elevadas (FASOL, 1998; YU, 2004; LIEBER, 1998; ZHU, 2002; TENNE, 1992).

Esta fase em solução, que deve ser mantida durante a síntese, funciona como meio para o transporte de massa, promovendo uma rápida cinética de transformação de fase. Desta forma, esta técnica é bastante indicada para a preparação de partículas cristalinas (FASOL, 1998; YU, 2004; LIEBER, 1998; ZHU, 2002; TENNE, 1992).

Neste processo, a energia livre necessária para estabilizar várias fases em equilíbrio, sob condições atmosféricas, é reduzida. Isto permite que estas fases possam ser formadas pelo

efeito da temperatura e pressão. Uma variável da técnica de síntese hidrotérmica é a síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas (FASOL, 1998; YU, 2004; LIEBER, 1998; ZHU, 2002; TENNE, 1992). Ela oferece algumas vantagens distintas sobre a síntese hidrotérmica convencional (MA; BANDO; SATO, 2002):

- Rápido aquecimento até a temperatura de cristalização, devido ao aquecimento volumétrico, resultando em nucleação homogênea;
- Rápida saturação pela dissolução de géis precipitados;
- Menor tempo de cristalização comparado ao aquecimento em autoclave convencional;
- Processo eficiente e econômico.

Uma característica importante da síntese por micro-ondas é a pequena variação de temperatura no meio reacional (gradiente térmico), já que o aquecimento da solução e processamento dos materiais é direto e homogêneo, proporcionando uma nucleação homogênea e crescimento uniforme das partículas (SCZANCOSK, 2009; KINGSTON, 1988).

O termo síntese hidrotérmica micro-ondas foi proposto por Komarneni e colaboradores em 1992 e recentemente tem sido utilizado para síntese rápida de numerosas cerâmicas e pós-metálicos (FASOL, 1998; YU, 2004; LIEBER, 1998; ZHU, 2002; TENNE, 1992).

A cristalização hidrotérmica micro-ondas consiste de um interessante processo para obtenção de nanoestruturas com baixa temperatura de síntese. O rápido aumento da temperatura e pressão durante o processo pode acelerar partículas sólidas, provocando colisões entre estas e consequentemente sua fusão, por meio do aumento da temperatura do meio. Portanto, efeitos de micro-ondas não contribuem para a polarização de partículas (STUERGA, 1996; AL-HARAHSEH, 2004; MINGOS, 1991).

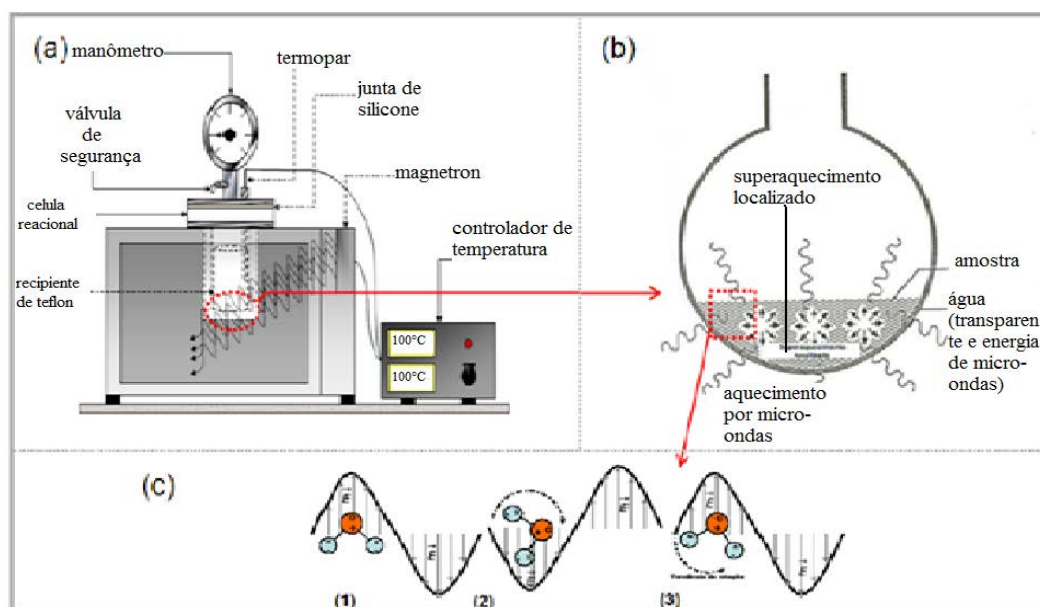
Outro mecanismo que auxilia no aquecimento corresponde à condução iônica por micro-ondas, a qual faz com que íons em solução adquiram energia cinética, refletida no aumento da amplitude vibracional das partículas, gerando colisões, responsáveis por converter a energia cinética em energia térmica. Como a concentração de íons aumenta em solução, mais colisões ocorrem, fazendo com que a solução aqueça mais rapidamente (AL-HARAHSEH, 2004).

A síntese hidrotérmica produz pós com alta pureza, alta cristalinidade, tamanho médio de partícula de 3 nanômetros até micrometros, estreita distribuição de partículas e bom controle estequiométrico, a baixas temperaturas. É uma técnica de síntese rápida e pode ter alto rendimento do produto, onde o tamanho e morfologia das partículas podem ser controlados alterando-se as variáveis do processo (HU, 1999).

Comparada a outros métodos, a síntese hidrotérmica é reconhecida como ideal para a precipitação de pós-cerâmicos com pequeno tamanho de partícula, morfologia uniforme e alta cristalinidade em um único passo experimental, utilizando baixas temperaturas e pressões (FASOL, 1998; YU, 2004; LIEBER, 1998; ZHU, 2002; TENNE, 1992).

No sistema hidrotermal micro-ondas a radiação eletromagnética interage com os dipolos induzidos ou permanentes das moléculas do solvente (água) e das partículas dispersas. Os dipolos das moléculas orientam-se na mesma direção do campo elétrico dessas ondas. A Figura 5 exibe o sistema por micro-ondas, assim como o meio reacional:

Figura 5 - (a) sistema hidrotérmico micro-ondas; (b) meio reacional aquecido por micro-ondas; (c) acoplamento da água com as micro-ondas.



Fonte: Tranquilin (2008); Kingston (1988)

Devido ao tipo de aquecimento e as interações que esse sistema proporciona, o processamento por micro-ondas tem sido o foco de interesse e estudo da comunidade científica, em função das vantagens que a técnica apresenta. Diante disso, esse método de processamento está sendo muito utilizado na síntese de vários tipos de materiais cerâmicos (SANTOS, 2013).

2.3 Características das Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

As bactérias são os mais simples organismos encontrados na maioria dos ambientes naturais. São células esféricas ou em forma de bastonetes curtos com tamanhos variados, alcançando às vezes micrômetros linearmente. A célula bacteriana apresenta várias estruturas, algumas das quais estão presentes apenas em determinadas espécies, enquanto outras são essenciais, e, portanto, encontradas em todas as bactérias (MIMS et al., 1999; SCHAECHTER et al., 2002).

Uma das estruturas essenciais da célula bacteriana é conhecida como membrana. A membrana citoplasmática bacteriana é uma estrutura de 8 nm de espessura, sendo esta responsável por uma barreira de separação do meio interno e externo da célula. A membrana dos animais procariontes difere quimicamente da membrana das células dos animais eucariontes, principalmente pela ausência de esteróis. Como principais funções desta estrutura podemos citar o transporte de solutos, produção de energia por transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, biossíntese de componentes, duplicação do DNA e secreção de enzimas (TRABULSI et al., 1999; SCHAECHTER et al., 2002).

A manutenção da forma bacteriana é devido à presença da parede bacteriana. Além disso, a parede desempenha um papel importante na divisão celular como *primer* para sua própria biossíntese, dando origem ao septo que separa as duas novas células oriundas da divisão celular. Na maioria das células, a parede deve a sua rigidez a uma camada composta por uma substância somente encontrada em procariotos e que recebe diferentes denominações como mureína, peptidoglicano, mucopeptideo (MIMS et al., 1999; TRABULSI et al., 1999).

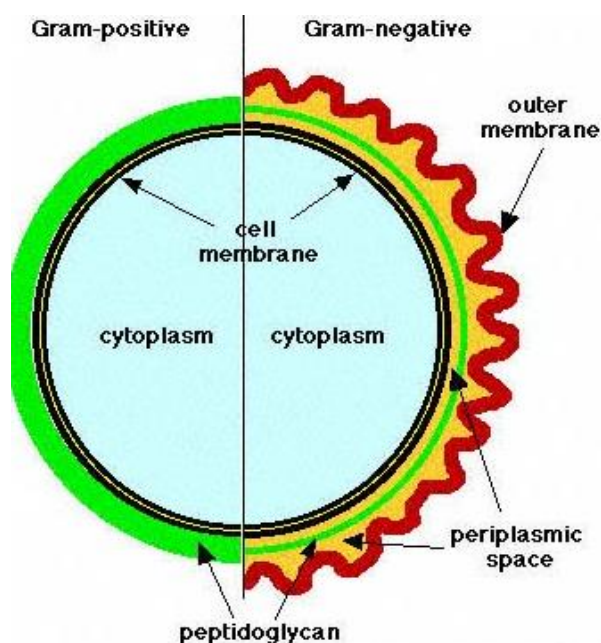
De acordo com a constituição da parede, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram positivas e Gram negativas. As diferenças entre esses dois grupos residem principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. As principais diferenças reveladas pela coloração de Gram estão relacionadas à presença de uma membrana externa nas bactérias Gram-negativas e de uma espessa camada de peptidoglicano nas bactérias Gram-positivas (SCHAECHTER et al., 2002).

As paredes das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam diferenças marcantes. As bactérias Gram-negativas possuem uma parede composta de várias camadas que diferem quimicamente e, conseqüentemente, é mais complexa que a parede das Gram-positivas, que apesar de mais espessa, apresenta predominantemente um único tipo de macromolécula (JAWETZ et al., 1998).

As bactérias Gram-positivas protegem sua membrana citoplasmática com uma parede celular espessa. As muitas camadas de peptideoglicano impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido a presença de açúcares e aminoácidos (SCHAECHTER et al., 2002). A parede celular das bactérias Gram-negativas é formada por uma ou poucas camadas de peptideoglicano e por uma membrana externa. A membrana externa das bactérias Gram-negativas é formada por uma dupla camada lipídica: uma camada interna composta por fosfolípídeos e uma externa contendo lipopolissacarídeos e proteínas. O seu interior possui características hidrofóbicas devido aos ácidos graxos e a parte polissacarídica externa constitui um ambiente hidrofílico. A membrana externa, Figura 6, constitui uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias como antibióticos (SILVA et al., 2010; TRABULSI, et al., 1999).

Devido à membrana externa apresentar características lipoprotéicas, as bactérias necessitam dispor de mecanismos que permitam a entrada de compostos hidrofílicos como açúcares, aminoácidos e certos íons. Por isso, sua membrana externa possui canais especiais chamados de porinas, que permitem a difusão passiva de compostos hidrofílicos (SCHAECHTER et al., 2002).

Figura 6 - Diagrama simplificado do envelope celular de bactéria Gram positiva e Gram negativa.



Fonte: Pelczar (2005)

O sistema de duplas membranas das bactérias Gram-negativas origina um espaçamento. O espaço que separa a membrana citoplasmática da membrana externa é chamado de espaço periplasmático. Este espaço possui uma camada de peptidoglicano e um gel composto por vários componentes. Nele pode-se encontrar algumas enzimas capazes de inativar fármacos tornando a célula resistente a estes, como por exemplo, as beta-lactamases (RYAN, 1994; TRABULSI et al., 1999)

As bactérias de modo geral são causadoras de diversas patologias. A gravidade da infecção depende de diversos fatores, dentre eles a imunidade do hospedeiro, bactéria causadora, local da infecção, resistência da bactéria a antibioticoterapia. As bactérias implicadas nestas infecções podem ser verdadeiramente patógenas ou patógenas oportunistas (TRABULSI et al., 1999).

2.3.1 *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Staphylococcus aureus é um dos mais significantes agentes etiológicos de processos infecciosos adquiridos, tanto em pacientes ambulatoriais como em pacientes hospitalizados. A gravidade da infecção vai desde uma intoxicação alimentar ou infecção cutânea de pouca importância, até infecções graves e potencialmente fatais. Quando as infecções estão localizadas na pele, podem causar furúnculos, conjuntivite, impetigo, feridas infeccionadas, foliculite, pústulas ou abscessos subcutâneos. Podem causar também infecções mais profundas como pneumonias, abscessos profundos, osteomielites, endocardites, flebites, mastites e meningites. São também associados a infecções relacionadas a cateteres, bem como dispositivos cardiovasculares e válvulas cardíacas (JAWETZ et al., 1998; MIMS et al., 1999; TRABULSI et al., 1999) (ARAUJO et al., 2000).

Esta é a espécie mais virulenta dos *Staphylococcus spp.*, apresentando uma ampla variedade de fatores que contribuem para essa virulência, como as toxinas e enzimas que mediam a invasão tecidual e a sobrevivência no sítio da infecção (KRUSYNSKA et al., 1997; BLATT; PIAZZA, 2004). As infecções causadas por *S. aureus* apresentam morbidade e mortalidade elevadas (BLATT; PIAZZA, 2004), sendo responsável por 20% das infecções bacterianas humanas (DEITOS et al., 1999). O surgimento, nos últimos anos de cepas de *S. aureus* multirresistentes, inclusive podendo ser isolados em materiais e equipamentos usados em ambiente hospitalar constituem num dos problemas mais relevantes no controle de infecções e na terapêutica antimicrobiana (ARAUJO et al., 2000). Dentre outros fatores, esta multirresistência é resultado da presença de plasmídeos, que permitem a transferência desta resistência de uma célula para outra com grande frequência (FREITAS, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Observando o grande número de doenças bacteriológicas causadas geralmente pela ingestão de determinadas águas ou alimentos contaminados por bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* é necessário o desenvolvimento de novos materiais, os quais possam ser utilizados como agentes bactericidas. Portanto, neste projeto avaliou-se a atividade antimicrobiana de nanopartículas de CeO_2 frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A composição das nanopartículas foi otimizada, utilizando a técnica de síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas, que vem sendo empregada nos laboratórios, na Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (UNESP), para a obtenção de nanopartículas com adequada estabilidade dimensional.

3.2 Objetivos Específicos

Os principais objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) Síntese e caracterização de nanopartículas de CeO_2 pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas no crescimento das nanopartículas;
- b) Análise do halo de inibição dos micro-organismos a partir da suspensão das nanopartículas impregnadas em discos de Whatman;
- c) Influência dos surfactantes hexametiltrietilamina e polietilenoglicol nas características estruturais, morfológicas e biológicas.

3.3 Metas

Para atingir os objetivos específicos as seguintes metas foram focadas:

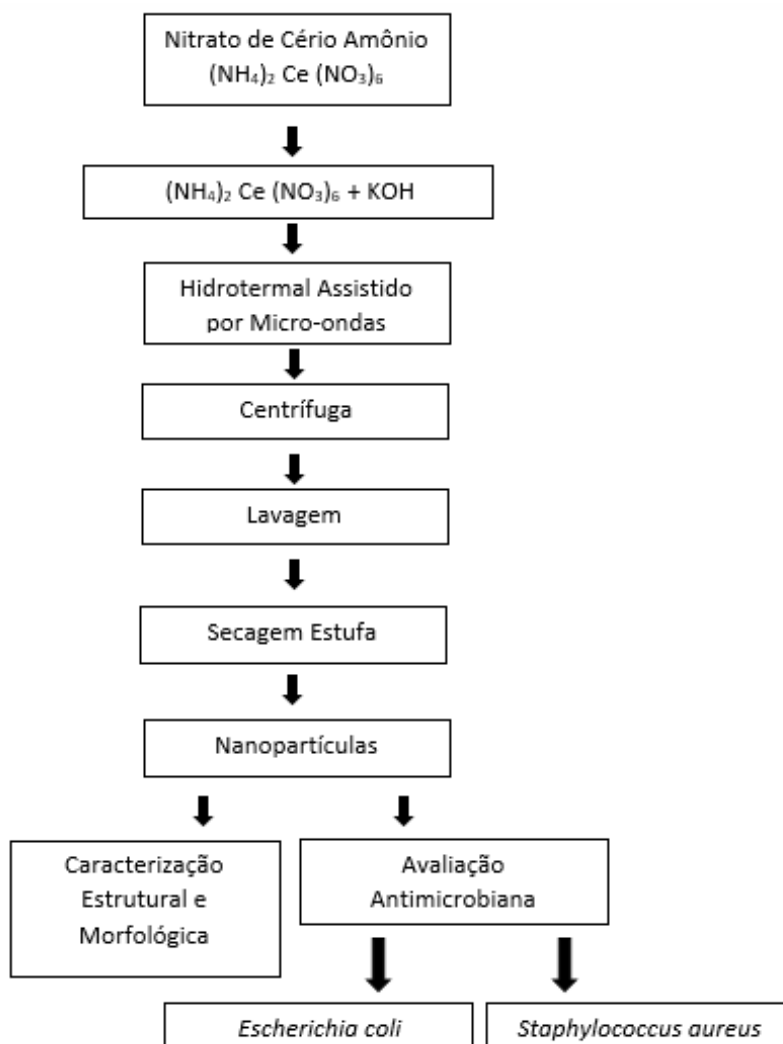
- Estabeleceu as seguintes condições de síntese (pH, agente mineralizador, temperatura e tempo de síntese para obtenção de nanopartículas monofásicas e com tamanho de partícula controlada;
- Análise estrutural, morfológica, e antimicrobiana das nanopartículas de CeO_2 puro.

4 MATERIAIS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 Procedimento experimental

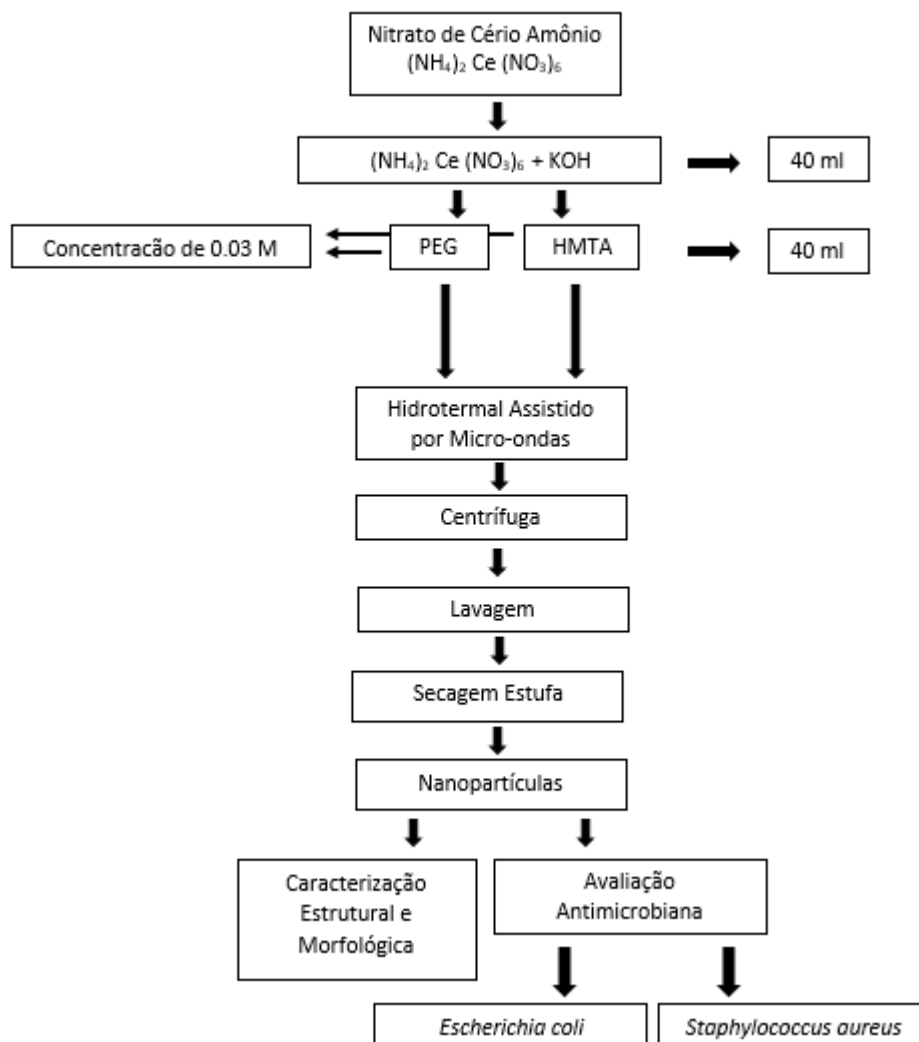
O procedimento experimental adotado para síntese das nanopartículas de CeO_2 , processamento cerâmico e caracterização das amostras obtidas é apresentado, de forma esquemática, no fluxograma da Figura 7 e Figura 8.

Figura 7- Fluxograma do processo de síntese, processamento e caracterização das nanopartículas de CeO_2 puro com KOH.



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 8- Fluxograma do processo de síntese, processamento e caracterização das nanopartículas de CeO₂ puro e com KOH e surfactantes.



Fonte: Produção do próprio autor

4.2 Crescimento e obtenção dos materiais nanoparticulados

As nanopartículas foram obtidas utilizando o método HAM. Este método possibilita um rápido processo de síntese, temperatura constante, resultando em uma nucleação homogênea e menor tempo de cristalização em temperatura relativamente baixa. Para a síntese, foi utilizado um forno de micro-ondas convencional modificado com adequações próprias para a execução do projeto. Soluções de surfactantes com concentração de 0,03 mol.L⁻¹ foram adicionadas a mistura de nitrato de cério e mineralizador, em seguida, a solução foi dividida em três alíquotas, as quais foram colocadas em autoclave de Teflon®, visto na Figura 9 (a). Nanopartículas monofásicas foram obtidas a 100 °C por 8 minutos.

A solução resultante foi transferida para uma autoclave mostrada na Figura 9 (b) sendo lacrado no reator hidrotérmico apresentado na Figura 10. Esta síntese foi realizada à uma taxa de aquecimento fixada em $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para a síntese de KOH (Figura 9 c) e em micro-ondas doméstico (Panasonic modelo NN-ST357WRP - 2,45 GHz, 800 W) conforme Figura 10.

Após a síntese no HAM, a autoclave foi lentamente resfriada à temperatura ambiente. A suspensão resultante foi levada, três vezes, a centrifuga sob agitação de 2500 rpm por 10 min para sedimentação do precipitado, em seguida foi lavada com água destilada. Finalmente esses precipitados foram colocados em uma placa de petri e levados para secagem a 100°C por 48 horas em estufa conforme sequência mostrada na Figura 11.

Figura 9 - Fotos do HAM e seus principais componentes (a) copo de teflon, (b) reator hidrotérmico, (c) Transferência para o copo de teflon e para a célula de hidrotermalização e sistema hidrotermal de microondas.



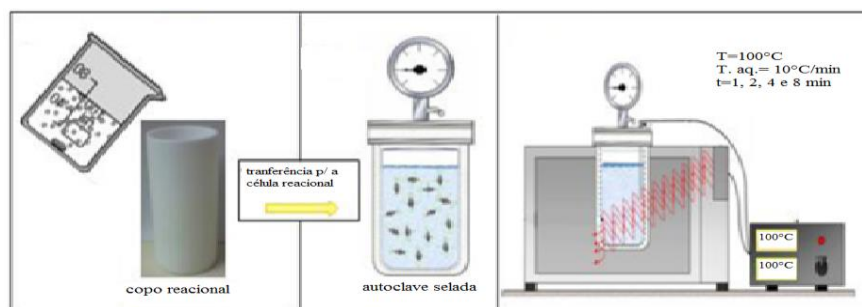
Copo de Teflon

(a)



Reator Hidrotérmico

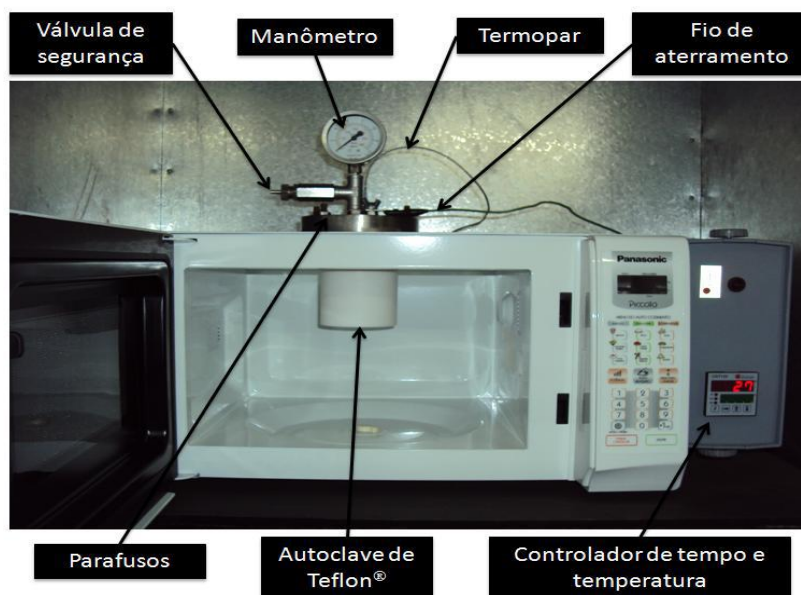
(b)



(c)

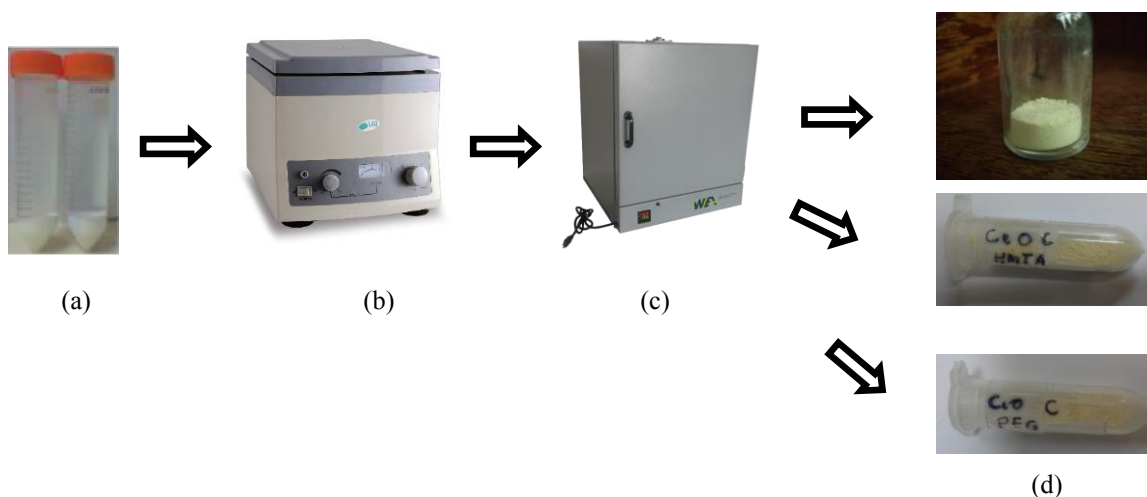
Fonte: (Fotografia tirada no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos – Laboratório Interdisciplinar em Cerâmica).

Figura 10- Forno de micro-ondas doméstico: Sistema adaptado para sínteses de materiais cerâmicos.



Fonte: Souza (2011)

Figura 11 - (a) Solução resultante antes da centrifugação; (b) Centrifugação e Lavagem das nanopartículas; (c) secagem das nanopartículas em estufa por 48h; (d) obtenção das nanopartículas de CeO_2 puro e com surfactantes



Fonte: Próprio Autor

4.3 Análise da Atividade Antimicrobiana

O procedimento utilizado nos ensaios para verificar o potencial bactericida do cristal de CeO_2 frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi feito pela análise do halo de inibição, no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Teresa D'Ávila (UNIFATEA) em Lorena, e no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR/Unesp).

Nos experimentos realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Teresa D'Ávila (UNIFATEA), foram utilizadas a linhagem de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 35928), proveniente da coleção de culturas do Laboratório Médico Vital Brasil e mantidas sob-refrigeração em tubos inclinados com ágar Gymp, em colaboração com o técnico José Eduardo de Freitas.

Em uma primeira etapa, suspensões de nanopartículas de CeO_2 foram diluídas em meio aquoso em diferentes concentrações (8 mM, 15 mM e 30 mM), de forma quantitativa, garantindo a formação de uma solução estoque com concentração determinada, cujo pH medido era de 7,5. Posteriormente, estas soluções foram levadas em banho de ultrassom para sua completa homogeneização, em seguida foi retirado um volume determinado da suspensão e neste volume colocou-se os discos de Whatman, com 6 mm de diâmetro, por aproximadamente 1 minuto, até que toda superfície fosse recoberta. Os discos, já com as suspensões, foram colocados nas placas já com as bactérias inoculadas. Este procedimento foi repetido de forma minuciosa em todos os ensaios. As placas foram incubadas a 37 ° C durante 24 h, em seguida foi estudada a média do diâmetro da zona de inibição que circunda os discos. (Figura 12)

Figura 12 - (a) Homogeneização no banho de ultrassom; (b) Inoculação do microrganismo; (c) discos de Whatman em determinado volume de solução; (d) Estufa por 24h.



(a)



(b)



(c)



(d)

Fonte: Produção do próprio autor (Fotografia tirada no Departamento de Microbiologia da Faculdade Teresa D'Ávila- FATEA)

Nos experimentos realizados no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, a avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas foi realizada com base no método de antibiograma qualitativo contra cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Primeiramente foram obtidas soluções coloidais de nanopartículas de CeO₂ puro nas concentrações de 18 ppm e 1000 ppm, em seguida foi avaliado a eficiência de um agente antimicrobiano que consiste em medir o tamanho relativo do halo de inibição ao redor do agente testado. Um inóculo padrão de cada micro-organismo foi inicialmente espalhado pelo método de semeadura por espalhamento sobre a superfície de uma placa de Petri com o meio de cultura Mueller-Hinton, onde foram colocados papéis-filtro estéreis impregnados com o material. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h e a 37 °C em uma estufa bacteriológica, e os halos formados ao redor dos papéis-filtro foram então medidos.

5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.1 Difração de raios X (DRX)

Os raios X são radiações eletromagnéticas que podem ser polarizadas, difratadas e refletidas. A condição para ocorrência do fenômeno de difração está relacionada às estruturas cristalinas, as quais apresentam dimensões, das células unitárias, da mesma ordem do comprimento de onda característico dos raios X. Devido ao espaçamento interplanar d , os raios provenientes da estrutura, em direção aos sensores, sofrem uma defasagem, responsável por gerar o fenômeno de interferência, que é construtiva segundo a equação 1:

$$n.\lambda = 2.d.\sin\theta \quad (1)$$

Esta é a lei fundamental da cristalografia de raios X, conhecida como Lei de Bragg, onde n corresponde aos padrões (primário, secundário, etc) de interferência, d a distância interplanar, λ o comprimento de onda do feixe incidente e θ o ângulo de incidência.

A difratometria de raios X foi utilizada para a identificação das fases formadas no tratamento térmico das nanoestruturas obtidas por HAM. Utilizou-se um difratômetro de raios X (Rigaku-DMax/2500C, Japão) com radiação Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), monocromatizada por cristal de grafite (Unesp - Instituto de Química - Araraquara), com velocidade de varredura de $0,2^\circ/\text{min}$, de 10 a 70° .

O tamanho médio de cristalito (d) foi calculado com base na equação 2, de Debye-Scherrer:

$$d = \frac{k.\lambda}{\beta.\cos\theta} \quad (2)$$

Onde k é uma constante, λ o comprimento de onda da radiação, β a largura à meia altura para o plano de maior intensidade e θ o ângulo de Bragg.

5.2 Espectroscopia de espalhamento Raman

Consiste de uma técnica baseada no espalhamento inelástico da luz monocromática, geralmente oriunda de uma fonte laser, fornecendo informações sobre o grau de desordem da rede cristalina. O espalhamento inelástico implica que a frequência do fóton na luz monocromática se altere devido à interação com a amostra. Fótons são absorvidos e então reemitidos e a frequência dos fótons reemitidos é deslocada da frequência monocromática original, gerando o efeito Raman, fornecendo informações a respeito de transições vibracionais e rotacionais. Cerca de 99,999% dos fótons incidentes do efeito Raman sofrem espalhamento elástico, do tipo Rayleigh. Este tipo de sinal não apresenta aplicações prática em caracterizações moleculares, sendo que somente em torno de 0,001% da luz incidente produz espalhamento inelástico, útil para este tipo de espectroscopia.

Este método é sensível a mudanças na ordem à curta distância da estrutura cristalina, e é frequentemente utilizado para estudar a introdução de defeitos e/ou fases secundárias nos materiais.

As medidas de espectroscopia Raman das amostras foram realizadas em temperatura ambiente por meio de um espectrômetro da marca Bruker modelo RFS100 (UFSCAR), utilizando como fonte de excitação um laser de Nd-YAG com comprimento de onda de 1064 nm e potência de 100 mW. Para a região compreendida de 50cm^{-1} a 1200cm^{-1} , foram feitas 32 varreduras com resolução espectral de 4cm^{-1} . A espectroscopia de espalhamento Raman é uma técnica complementar à DRX, pelo fato de ser mais sensível às mudanças estruturais de ordem local em um dado material.

5.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é utilizada na identificação de unidades estruturais encontradas nas substâncias com base nas frequências vibracionais de suas moléculas. As bandas registradas são decorrentes da absorção da radiação eletromagnética, resultante dos movimentos de vibração dos átomos constituintes de uma molécula. No caso de sólidos, existe um grande número de bandas, sendo que cada uma corresponde a um tipo de vibração específica de um composto (SALA, 1996).

Neste trabalho, a espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) foi realizada empregando um espectrômetro modelo Equinox 55 (Bruker, IQ-UNESP-Araraquara) em modo de refletância difusa.

Os espectros foram medidos com 32 varreduras na região entre 385 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} , usando uma resolução de 4 cm^{-1} . Todas estas medidas foram feitas em temperatura ambiente.

Quanto ao preparo das amostras, inicialmente misturou-se uma alíquota de 200 mg de cada pó de CeO_2 com 1,5 mg de brometo de potássio (substância opticamente transparente à λ situados na região de infravermelho).

Posteriormente, foi necessário o uso de um pistilo e de um almofariz para desaglomerar e homogeneizar o tamanho das partículas desta pequena quantidade de material.

5.4 Espectroscopia ótica nas regiões do ultravioleta e visível (UV-Vis)

Os espectros ópticos nas regiões do ultravioleta e visível são de fundamental importância para a compreensão da estrutura de bandas eletrônicas de um sólido. Nesse trabalho, as medidas de UV-Vis das amostras de CeO_2 foram feitas em temperatura ambiente com o auxílio de um espectrômetro modelo Cary 5G (Varian, IQ-UNESP-Araraquara), programado em modo de refletância difusa.

Utilizaram-se λ situados na faixa de 200nm a 800nm para obter os espectros. A calibração do equipamento foi ajustada com o uso de esferas integradoras. Segundo o fabricante, o padrão branco (SRS-99-010) tem aproximadamente 99% de refletância, enquanto o preto (SRS-02-010) apresenta apenas 0,2%. Cada amostra passou por três medições no espectrômetro.

5.4.1 Cálculo da energia da banda proibida “BAND GAP”

A Teoria de quantização de energia fundamentada por Planck afirma que a energia de um único fóton E (J ou eV) é determinada a partir das equações (3) e (4) (RODITI, 2005):

$$E = h\nu \quad (3)$$

$$E = h(c/\lambda) \quad (4)$$

sendo h a constante de Planck ($h = 6,63 \times 10^{-34}\text{ J.s}$), ν a frequência (s^{-1}), c é a velocidade da luz ($c = 2,997 \times 10^8\text{ m/s}$) e λ é o comprimento de onda (m). Quando se trata de fenômenos que absorvem a interação de fótons com a matéria, às vezes, é necessário conhecer a absorbância

α da substância que está sendo investigada. Para o caso de filmes finos, a lei de Lambert-Beer permite estimar o valor desta variável pela equação (5) (PARSEKIAN, 2008):

$$\alpha = \left[-\ln\left(\frac{T}{100}\right) \right] / x_F \quad (5)$$

α é a absorbância, T é a transmitância e x_F a espessura do filme. Como esta lei não se aplica para as situações em que os materiais estão na forma de pó, devido à indefinição do caminho óptico, então a equação 5 é modificada para a equação (6) (PARSEKIAN, 2008):

$$\alpha = -\ln\left(\frac{R}{100}\right) \quad (6)$$

que leva em consideração a refletância do pó (R) (%). Tendo conhecimento de todas estas variáveis físicas, a E_{gap} (Energia do gap) de um óxido semiconductor pode ser calculada qualitativamente pelo método proposto por Wood e Tauc (WOOD; TAUC, 1972). Conforme estes pesquisadores, a E_{gap} está relacionada com a absorbância e a energia dos fótons pela equação 7:

$$\alpha h\nu = A(h\nu - E_{gap})^n \quad (7)$$

A é uma constante e n é uma variável que depende do tipo de transição eletrônica ($n = 1/2, 2, 3/2$ ou 3 para região permitida direta, região permitida indireta, região proibida direta ou região proibida indireta, respectivamente).

5.5 Microscopia eletrônica de varredura por feixe de emissão de campo (FEG-MEV)

Na microscopia por emissão de campo, um fio cristalino de tungstênio com uma extremidade pontiaguda é utilizado como fonte de elétrons. Nestes sistemas, um forte campo elétrico se forma na ponta fazendo com que os elétrons sejam arrastados em direção ao anodo. Existem três tipos de FEG, sendo elas as fontes de emissão a frio, as quais operam a temperatura ambiente, as fontes de emissão a quente, operando em temperaturas mais

elevadas, reduzindo a absorção de gases na ponta além de estabilizar a emissão do feixe eletrônico, além das fontes de emissão Schotky. Nos materiais sólidos, além da composição química, a estrutura cristalina e os aspectos morfológicos (forma, tamanho e distribuição do tamanho das partículas) são fatores diretamente ligados ao comportamento das propriedades físicas e químicas dos mesmos.

Para análise das partículas obtidas pelo método hidrotermal micro-ondas, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura com canhão de elétrons por emissão de campo (FEG-SEM) modelo Supra 35-VP (Carl Zeiss, IQ-UNESP-Araraquara) operado com feixe de elétrons incidentes de 6 kV.

5.6 Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-MET)

Esta técnica possui grande poder de resolução, atingindo a faixa atômica, além de oferecer vantagens importantes como: (a) possibilidade de observar o que existe no volume dos materiais, pois, os elétrons que formam a imagem atravessam toda a amostra; (b) facilidade de identificação dos detalhes da microestrutura através da técnica de difração de raios X. A parte mais importante do equipamento é chamada de coluna, onde o feixe de elétrons é gerado e dirigido para atravessar a amostra. Depois, a imagem é ampliada e observada na tela, permitindo também o registro em câmera fotográfica. Várias lentes associadas permitem o controle da passagem de elétrons pela coluna, cujo vácuo deve atingir 10^{-5} mbar nas posições mais críticas (canhão e amostra). Nos microscópios mais modernos o vácuo é controlado por um sistema pneumático de válvulas. O equipamento ainda possui: (a) um sistema de geração de alta tensão, que atinge a ordem de 100 a 200 kV nos microscópios tradicionais e acima de 1 MV nos chamados microscópios de alta voltagem; (b) sistemas de alimentação e de controle da corrente nas diversas lentes eletromagnéticas; (c) bobinas de alinhamento. Existe também o mecanismo de contraste (espessura de massa; difração e fase), que gera diferenças nas imagens observadas na tela. O poder de resolução é da ordem de 0,2 nm e permite a observação de detalhes da estrutura cristalina dos materiais. (FINGER, 1994)

Para estimar o tamanho de partículas, foram obtidas micrografias por microscópio eletrônico de transmissão (HR MET - Philips, modelo CM 200), equipado com espectroscopia por dispersão de energia de raios X e com aceleração dos elétrons em até 200 kV, possibilitando a caracterização morfológica e cristalográfica das amostras. O uso da técnica de difração de área selecionada (SAED) complementou a caracterização do pó de CeO_2 .

5.7 Área superficial específica: Método BET

A técnica para a determinação da área superficial específica consiste na medida das alterações de fluxo sofridas por uma mistura de gases de nitrogênio (N₂) e hélio (He), quando uma amostra é submetida à variação de pressão, na temperatura do nitrogênio líquido. Equações matemáticas baseadas nos trabalhos de Brunauer, Emmett e Teller (B.E.T) permitem relacionar a área específica de uma amostra a partir da adsorção física de moléculas de N₂, sendo que cada molécula deste gás ocupa uma área de 16,2 m². Técnicas automatizadas envolvem a admissão gradual do gás e proporciona uma medida da adsorção em condições de quase-equilíbrio, fornecendo dados das isotermas de fisiosorção (PADILHA, 1985). Para a determinação da área específica do pó foi utilizado o equipamento ASAP-2010 Micromeritics Pore Size 931, para evitar a influência da água adsorvida na superfície da amostra, estas permaneceram em uma estufa a uma temperatura de 150°C durante 24 horas.

O diâmetro médio das partículas foi estimado a partir da área superficial específica, pela relação da equação 8:

$$L = \frac{6}{\rho_t S_{BET}} \quad (8)$$

Onde temos:

$L \rightarrow$ Diâmetro esférico equivalente da partícula (nm).

$\rho_t \rightarrow$ Densidade teórica, obtida da ficha cristalográfica (g/cm³).

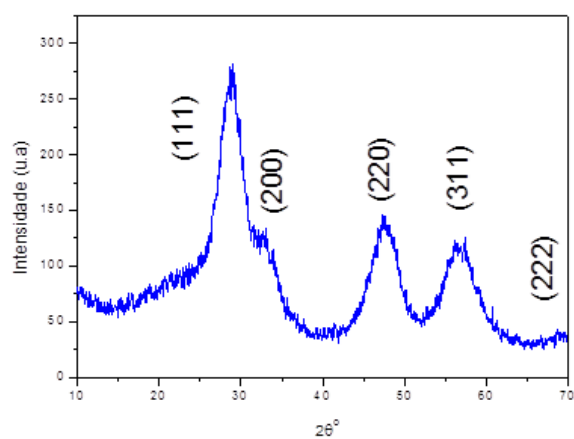
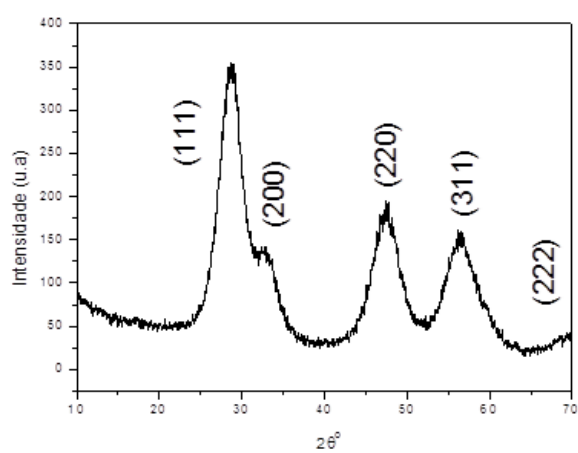
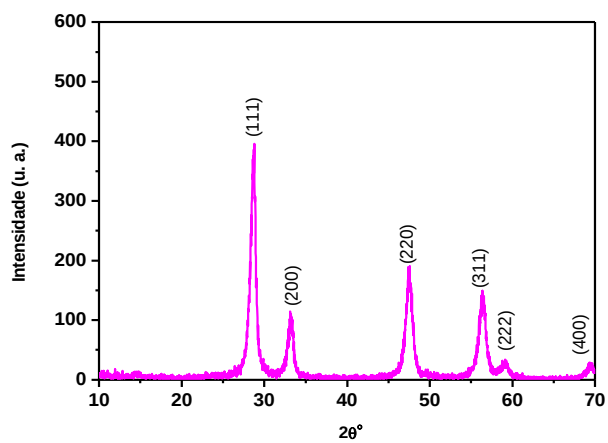
$S_{BET} \rightarrow$ Área superficial específica determinada através do método BET (m²/g).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise da difração de raios X

Os padrões de DRX das nanopartículas de óxido céria mostraram a mesma estrutura cristalina para todas as condições de síntese utilizada, como mostrado nas Figuras 13 a-c. Na Figura 13 (a) o difratograma da amostra tratada termicamente a 100°C por 8 min com agente mineralizador KOH no HAM evidencia a presença de picos de difração estreitos, intensos e bem definidos. Com a adição de surfactante (Figuras 13 b-c), diferenças estruturais entre as amostras foram observadas. Interessante ressaltar que a fase cúbica pode ser obtida para todas as condições de síntese empregadas embora a largura à meia altura do pico de maior intensidade torna-se alargado. Isto indica que a complexa estrutura molecular do surfactante aumenta a liberação de calor fornecida pela incidência de micro-ondas no sistema aumentando a pressão interna do sistema e levando a nanopartículas menos cristalinas (FERRER, 2012).

Figura 13- Difratoograma de raios x de nanopartículas de CeO_2 obtidas a 100°C por 8 min em (a) KOH, (b) KOH + HMTA, (c) KOH + PEG.



Fonte: Rigaku-DMax/2500C – Instituto de Química / Unesp – Araraquara.

Todos os picos foram indexados à estrutura cúbica de CeO₂ puro (grupo espacial: Fm3m) com parâmetro de rede $a = 5,411\text{\AA}$, o que está em boa concordância com o arquivo JCPDS para CeO₂ (JCPDS 34-394). O pico de difração mais intenso está localizado a $2\theta = 28,660^\circ$, com plano cristalográfico (111). O padrão de difração das nanopartículas permitem observar uma estrutura cristalina do tipo cúbica de face centrada (cfc). Nenhuma outra fase foi detectada no difratograma indicando que este método é eficiente na obtenção de nanopartículas monofásicas. A adição de surfactantes levou ao alargamento dos picos indicando que os tamanhos dos cristalitos são pequenos (2 a 3 nm) seguindo a literatura (DJURICIC, 1999).

Nota-se que as amostras tratadas com agente surfactante, os picos são mais largos o que implica em menor empacotamento atômico. Utilizando a equação (9) de Debye-Scherrer (Klug, 1962)

$$D_p = \frac{0,94\lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta} \quad (9)$$

em que D_p é o tamanho médio em nanômetros, 0,94Å é a constante de Scherrer, λ é o comprimento de onda do raio X, θ é o ângulo de Bragg e β a largura a meia altura do pico principal, estimou-se o tamanho médio do cristalito, Tabela 1. Dados área de superfície determinada por B.E.T também estão contidas nesta Tabela.

Tabela 1 - Área superficial e tamanho do Cristalito

Amostras	Área Superficial (m ² /g)	Tamanho do Cristalito (Nm)
CeO ₂	121,29	11,5
CeO ₂ + PEG	102,45	8,80
CeO ₂ + HMTA	89,40	3,90

Fonte: Produção do próprio autor

A adição de surfactante alterou o grau de cristalinidade das nanopartículas evidenciadas pelo aumento da largura a meia altura dos picos de maior intensidade refletindo no tamanho do cristalito. Outra característica do pó é a aglomeração de pequenas partículas formando grandes aglomerados, conforme pode ser observado pelos dados de área de superfície. Este fato reforça a necessidade de obtenção de pós com estreita faixa de tamanho de partícula, já

que a alta reatividade superficial das partículas favorece a formação de agregados durante o processo de sinterização. Devido à baixa potência do micro-ondas empregado neste estudo (200W) e da baixa temperatura de formação das nanopartículas, a presença de aglomerados foi evidente para as amostras tratadas com agentes surfactantes. Isso implica em menor reatividade superficial especialmente devido ao elevado peso molecular destes agentes impedir uma nucleação homogênea durante a formação das fases desejadas.

6.2 Espectroscopia de espalhamento Raman

Raman é uma técnica valiosa para obter informações sobre as estruturas das nanopartículas. Para confirmar a formação de cério puro e com surfactante, o espectro FT-Raman foi obtido e está ilustrado na Figura 14.

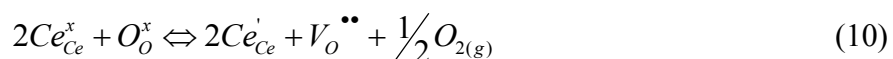
Uma estrutura cúbica tipo fluorita de CeO_2 apresenta um modo Raman a 452cm^{-1} com simetria F_{2g} e pode ser atribuído à agitação simétrica dos átomos de oxigênio em torno de cada partícula de Ce. Uma vez que apenas os átomos de oxigênio se movem, o modo de vibração é quase independente da massa do cério (McBRIDE, 1994).

A transformação rápida e organização estrutural das nanopartículas de CeO_2 obtidas pelo método HAM podem estar relacionados com a formação de *nanoclusters* que ocorrem a partir do interior para a superfície. A energia de micro-ondas é transformada em calor por meio da interação entre as moléculas e átomos com o campo eletromagnético, resultando em uma interação de aquecimento interno e volumétrico das nanopartículas que promovem a formação de gradientes de temperatura e fluxos de calor. Como ilustrado na Figura 14 (a), mais três modos de baixa intensidade de espalhamento de segunda ordem são detectados em 266 , 598 e 726 cm^{-1} , respectivamente. Estes modos podem ser atribuídos à presença de vacâncias de oxigênio extrínsecos gerados no retículo da matriz melhorando a taxa de difusão de oxigênio na estrutura (DEUS, 2012).

Na Figura 14 (a), os espectros das amostras apresentam quatro bandas Raman: uma mais intensa em torno de 452 cm^{-1} , relacionada ao modo vibracional F_{2g} , típica da estrutura cúbica do óxido de cério e outras três, bem menos intensas, em 266 , 598 e 726 cm^{-1} , relacionadas às vacâncias extrínsecas de oxigênio. Na Figura 14 (b), os espectros das amostras apresentam uma banda mais intensa em torno de $470,31\text{ cm}^{-1}$, relacionada ao modo vibracional F_{2g} , típica da estrutura cúbica do óxido de cério e outras três, bem menos intensas, em $187,6$, $1266,35$ e $1638,12\text{ cm}^{-1}$, relacionadas às vacâncias extrínsecas de oxigênio. Já na Figura 14 (c), os espectros das amostras apresentam uma banda mais intensa em torno de

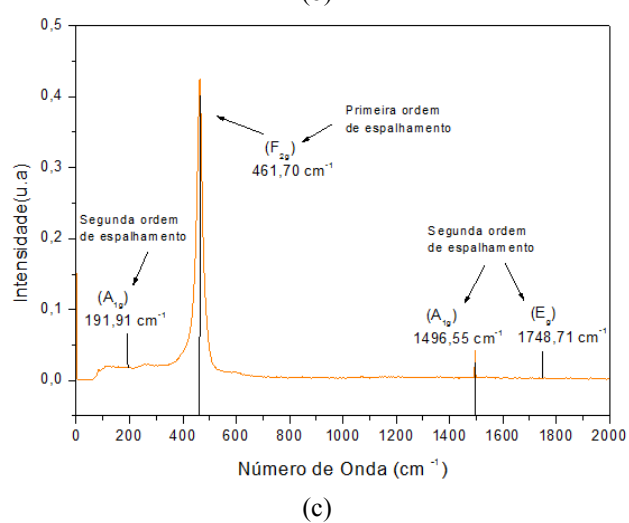
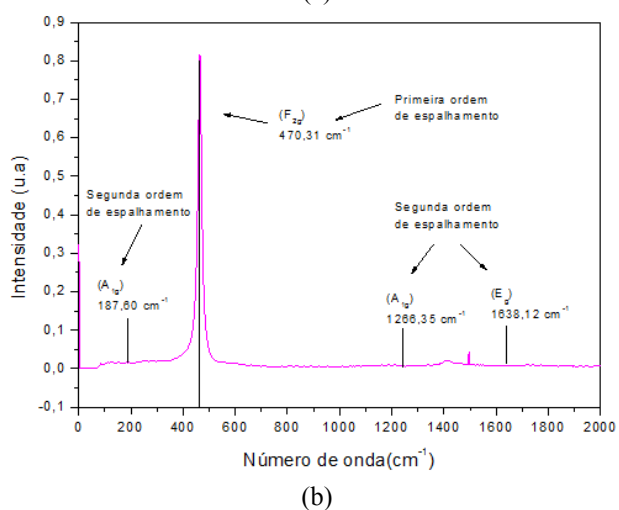
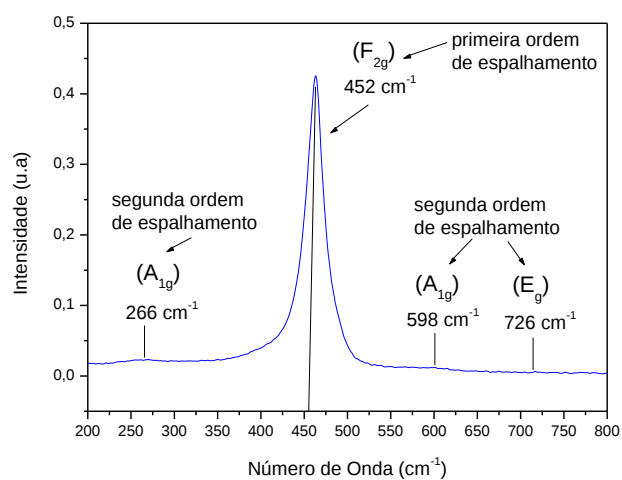
461,70 cm⁻¹, relacionada ao modo vibracional F_{2g}, típica da estrutura cúbica do óxido de cério e outras três, bem menos intensas, em 191,91, 1496,55 e 16748,71 cm⁻¹, relacionadas às vacâncias extrínsecas de oxigênio (LIN, 2000).

Dada a polivalência do cério e a formação de óxidos não estequiométricos, baixas pressões de oxigênio podem aumentar a condutividade iônica pelo deslocamento do equilíbrio entre os dois estados de valência do cério, segundo a equação (10):



Nessas condições, o equilíbrio da reação representada nesta equação é deslocado no sentido da formação da vacância, e isso envolve variações na concentração de vacâncias de oxigênio e dos portadores de carga eletrônicos do tipo Ce_{Ce}' . Independente do agente surfactante usado não houve mudanças significativas observadas no espalhamento Raman tanto de primeira quanto de segunda ordem, indicando que o material está organizado a curta distância interatômica. Em contrapartida, comparando-se com o material livre de surfactante os modos fonônicos da simetria cúbica são mais estreitos indicando maior organização em curtas distancias interatômicas. Entretanto, conforme observado por difração de raios X, a organização difere em longas distâncias interatômicas.

Figura 14 - Espectroscopia de espalhamento Raman de nanopartículas CeO_2 (a) com KOH, (b) com KOH + HMTA, (c) com KOH + PEG



Fonte: Rigaku-DMax/2500C – Instituto de Química / Unesp – Araraquara.

6.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT - IR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho foi utilizada como uma técnica complementar à espectroscopia de espalhamento Raman, procurando com isto, identificar possíveis modificações no comportamento das unidades estruturais referentes ao CeO_2 puro ou detectar provável presença de fases adicionais ou espécies contaminantes adsorvidas na superfície das amostras.

A Figura 15 ilustra os espectros de infravermelhos dos pós de CeO_2 formados pelo método HAM, usando o mineralizador KOH. Para melhor visualização, cada banda foi simulada nos programas DCMSV (BRANDENBURG, 1997) e Jmol (GEZELTER, 2000)

As características espectrais das amostras de FT-IR do CeO_2 apresentaram bandas em 3435, 2358, 1589 cm^{-1} e abaixo de 700 cm^{-1} . As bandas intensas em 3435 e 1589 cm^{-1} correspondem o modo ν (O-H) de (H-ligado) e podem ser atribuídas a moléculas de água e δ (OH), respectivamente.

A água residual e os grupos hidroxílicos são normalmente detectados nas amostras de óxido de cério, independentemente do método de síntese utilizado (WANG, 2002) sendo necessário mais calor no tratamento para a eliminação dos mesmos. O espectro infravermelho do óxido de cério também apresenta banda forte e larga abaixo de 700 cm^{-1} que é devido ao δ (Ce-O-C).

Picos de absorção localizados em 400 – 600 cm^{-1} podem ser atribuídos ao alongamento e flexão de vibração do CeO_2 , sendo características dos grupos tetraédricos (CeO_4). A hidroxilação e desprotonação de íons metálicos pode ser acelerada por aumento da temperatura ou pressão de solução (WILSON, 2006).

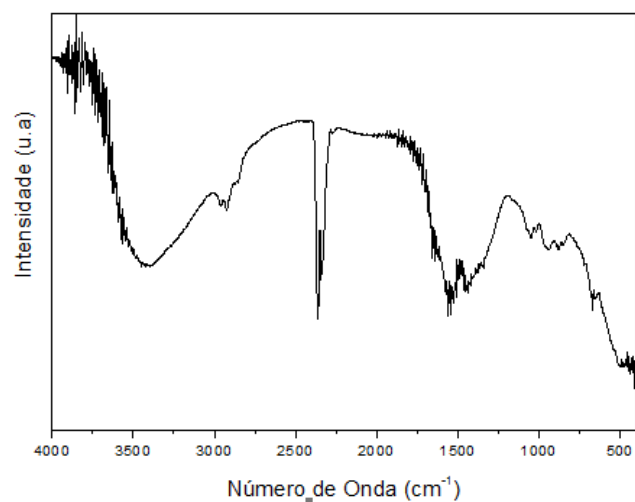
A banda na região de 2358 cm^{-1} pode ser atribuída à frequência de alongamento do grupo C=O, sugerindo que este grupo se ligue quimicamente à superfície dos nanocristais durante a preparação da amostra em contato com o ambiente da atmosfera. Este é provavelmente o resultado de reações que formam ligações químicas entre a superfície e a molécula de nanocristais orgânico-ligante em condições de purificação das nanopartículas com solventes orgânicos que ajudam a dispersar e melhor arranjar os nanocristais. A nanopartícula cristalizada apresenta íons OH^- , que pode ser causada na preparação da amostra para avaliação dos modos vibracionais e pelo contato com a umidade presente no ar. Em processamento hidrotermal micro-ondas, a frequência eletromagnética de alta radiação interage com o dipolo permanente do líquido (H_2O), que inicia o aquecimento rápido a partir da rotação resultante molecular. Além disso, dipolos permanentes ou induzidos na fase

dispersa causam o aquecimento rápido das partículas o que resulta em uma temperatura de reação em excesso do líquido circundante localizando um superaquecimento. (DEUS, 2012).

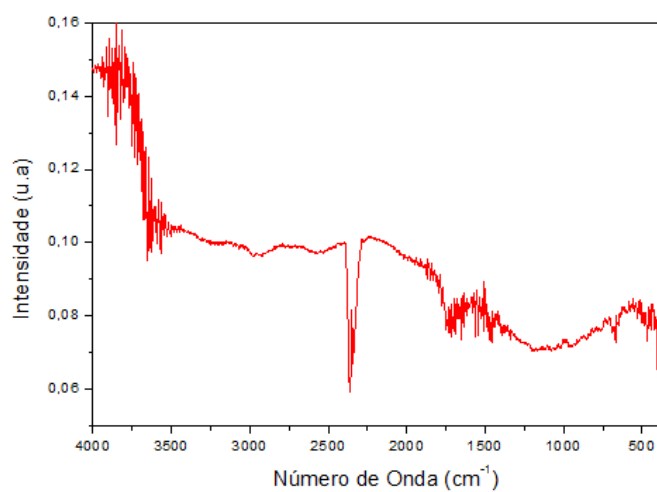
Durante a hidrólise, as reações de íons metálicos com água, libertam prótons e produzem hidróxidos ou óxidos de íons Ce^{4+} , que tem uma basicidade de baixa e alta carga, sendo submetidos a uma forte hidratação. Em primeiro lugar, complexos de íons Ce^{+4} são hidrolisados e interagem com moléculas de água ou OH^- formando $[\text{Ce}(\text{OH})_x(\text{H}_2\text{O})_y]^{(4+x)+}$, em que $x + y$ é o número de coordenação de Ce^{4+} (HIRANO e INAGAKI, 2000).

O espectro de infravermelho na presença de surfactantes (HMTA e PEG) indicam desaparecimento do grupo funcional ligado aos íons nitratos o que indicam que a elevada liberação de calor acelera a decomposição do nitrato de cério hidratado, inibindo a formação deste grupo na superfície dos pós, refletindo assim em uma maior pureza do composto.

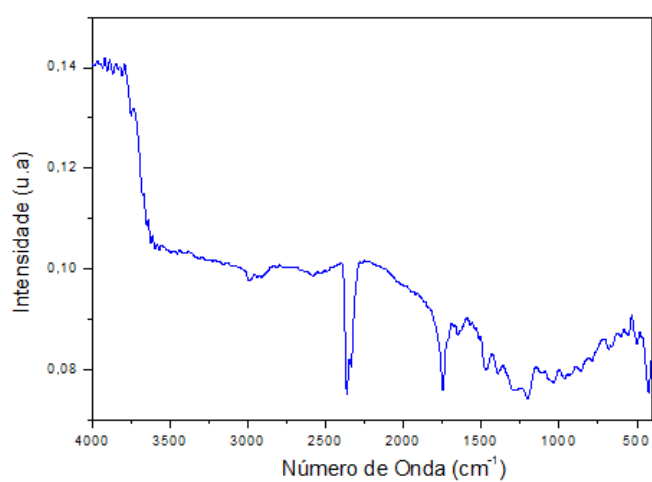
Figura 15 - Espectroscopia de FT-IR dos pós de CeO_2 com (a) KOH, (b) PEG e (c) HMTA.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Espectrômetro Equinox 55, Instituto de Química / Unesp – Araraquara.

6.4 Microscopia eletrônica de emissão de campo (FEG-SEM)

A micrografia de nanopartículas de CeO_2 com o agente mineralizador KOH no tempo de 8 min são mostrada na Figura 16. De acordo com a imagem, a maioria das partículas do CeO_2 em KOH são homogêneas com um tamanho de partícula individual de aproximadamente 11,5 nm. Os cristalitos de CeO_2 nanométricos e isotrópicos obtidos neste estudo são bastante diferentes dos dados da literatura, onde aglomerados de nanopartículas de CeO_2 estão em uma forma cúbica com o tamanho de 4,8 nm sob condições hidrotérmicas (LEE, 1998).

Esta diferença pode ser atribuída às condições de síntese e ao processo de cristalização/recristalização empregadas durante o tratamento hidrotérmico.

Portanto, o processo de dissolução e cristalização contínuo no fluido supersaturado é importante para estabilizar o sistema. A dissociação de hidróxido de cério e a formação de complexos iônicos podem impedir o crescimento de cristalitos de CeO_2 e limitar o tamanho nanométrico das partículas. Com a adição de surfactante ocorre uma ligeira diminuição no tamanho das nanopartículas pelo fato do processo de aglomeração ser mais evidente o que pode ser atribuído às forças Van der Waals. Para reduzir a energia de superfície, as partículas primárias têm uma tendência para formar aglomerados quase esféricos (YOO, 1999).

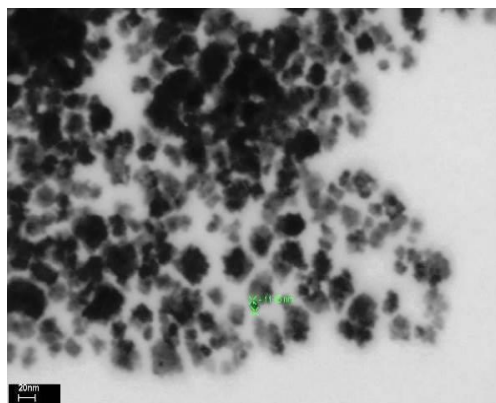
Este tipo de estrutura é comum em óxidos de cerâmica, do tipo ferrita de bismuto e titanato de bismuto (SIMÕES, 2009), que é um resultado de um crescimento anormal/descontínuo das partículas e também chamado de um crescimento exagerado de partículas. Neste tipo de crescimento anormal algumas partículas crescem mais rapidamente do que as outras com o aumento da temperatura de cristalização. O crescimento anormal da partícula pode resultar: (1) presença de segunda fase/precipitados ou impurezas, (2) materiais altamente anisotrópicos em energia interfacial (3) materiais com alto equilíbrio químico.

Tabela 2 – Tamanho de nanopartículas de CeO_2 com KOH, KOH + HMTA e KOH + PEG.

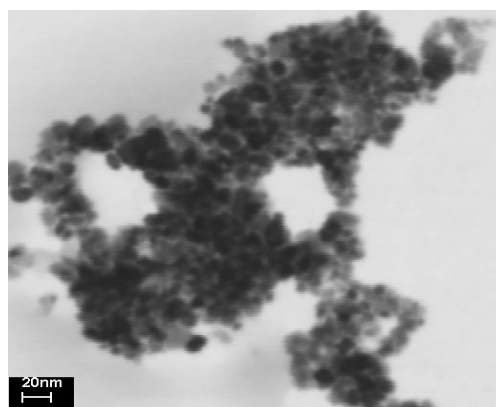
Amostras	Tamanho de partícula (nm)
$\text{CeO}_2 + \text{KOH}$	11,5
$\text{CeO}_2 + \text{KOH} + \text{HMTA}$	6,7
$\text{CeO}_2 + \text{KOH} + \text{PEG}$	7,9

Fonte: Produção do próprio autor

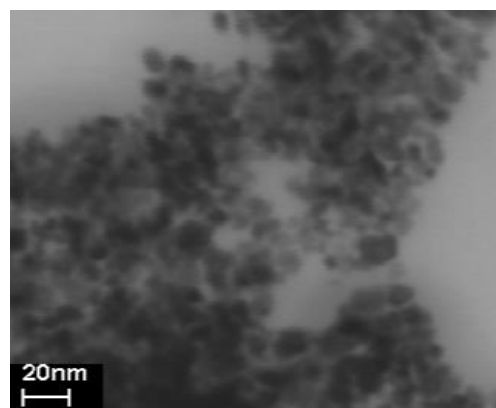
Figura 16 – FEG-SEM de nanopartículas de CeO_2 (a) com KOH, (b) com KOH + HMTA e (c) com KOH + PEG.



(a)



(b)



(c)

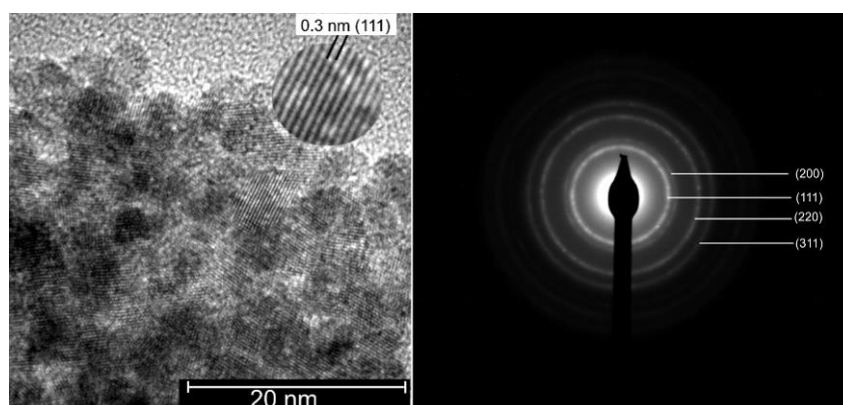
Fonte: Microscopia Eletrônica de Emissão / Instituto de Química / Unesp – Araraquara.

6.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

O tamanho de partícula dos pós de CeO_2 foram examinadas usando o MET cujos resultados estão mostrados na Figura 17. Nanopartículas de CeO_2 obtidos por HAM sob KOH a 100°C durante 8 min, revela os tamanhos médio de partículas que são no máximo de 12 nm com diâmetros de aproximadamente 4nm. As partículas estão bem dispersas e homogeneamente distribuídas. O pequeno tamanho das partículas postula-se que no início da reação há um grande número de núcleos que se formam na solução e que a reação tem lugar numa solução muito diluída não havendo reagente suficiente para o crescimento das partículas. Como resultado, as partículas crescem de 10 a 15nm.

Após o aquecimento com o KOH, os grandes aglomerados desaparecem e tornam-se menores e isométricos e o tamanho máximo de partícula diminuiu acentuadamente atingindo um valor de 6 nm.

Figura 17 - Nanopartículas de CeO_2 com KOH, $t=8$ min.



Fonte: Deus (2013). Philips CM 200 – Instituto de Química / Unesp – Araraquara.

Todas as composições em estudo apresentaram aglomerados nanométricos resultantes da união dessas partículas auto-organizadas. A morfologia dos aglomerados é alterada pelo aumento do tempo de cristalização, porém os aglomerados praticamente não variam de tamanho para uma mesma composição, apesar do aumento no tempo de tratamento térmico, o que pode estar relacionado com a uniformidade de aquecimento sobre o volume do reator com ação das micro-ondas.

A prova da presença de intensa cristalização pela técnica de síntese hidrotermal assistida por micro-ondas (a qual pode ser relativa à ocorrência de um gradiente definitivo de temperatura na célula durante o tratamento hidrotermal) resulta no aumento significativo no

tamanho de partícula do CeO₂. Tais resultados estão de acordo com a caracterização por DRX.

O método de síntese utilizado para obtenção das nanopartículas de CeO₂, mostra-se eficiente na obtenção de partículas nanométricas de tamanho e morfologia controlados.

6.6 Espectroscopia óptica na região do UV- Visível

Foram realizadas medidas de espectroscopia de UV-Vis no modo de refletância difusa para determinar o “gap” das nanopartículas de CeO₂ puro utilizando KOH como mineralizador e tempo de 8 minutos. Os dados de refletância foram convertidos para absorvância, obtendo-se então um gráfico de absorvância versus energia (eV) como mostra a Figura 18.

É importante observar que na região de alta energia da curva de absorvância, a energia do “band gap” está relacionada com a absorvância e a energia do fóton pela equação (11):

$$h\nu\alpha \propto (h\nu - E_{gap}^{opt})^2 \quad (11)$$

onde h é a constante de Planck, ν é a frequência, α é o coeficiente de absorção e $(h\nu - E_{gap}^{opt})^2$ é o “gap” de banda, também conhecido como “gap” de Tauc (WOOD; TAUC, 1972).

A absorção de óxido de cério na região UV-vis origina a partir da transição de transferência de carga entre os orbitais O 2p e Ce 4f e os ions O²⁻ e Ce⁴⁺. Esta absorção é muito mais forte do que a transição das espécies 4f¹ – 5d¹ na valência mista do Ce³⁺/Ce⁴⁺ do sistema (HO et al.,2005).

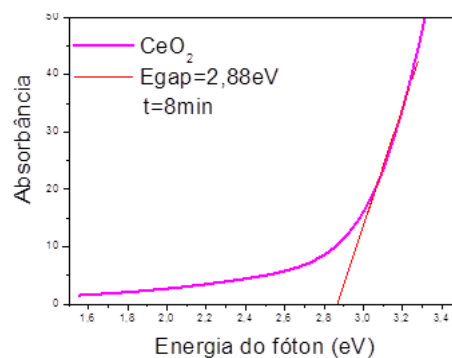
De acordo com LONGO et al.,2008, variações nos valores do “band gap” observados para amostras ordenadas e desordenadas indicam que a borda de absorção óptica exponencial e a energia do “band gap” óptico são controlados pelo grau de ordem-desordem estrutural na rede cristalina.

Moreira et al.,2009, descrevem que a banda de energia é direta quando as transições eletrônicas ocorrem a partir do máximo do estado de energia (perto ou dentro) da banda de valência (BV) para os estados mínimos de energia (em baixo ou para dentro) da banda de condução (BC), em uma mesma região na zona de Brillouin. Portanto, a presença de diferentes valores calculados do “band gap” a partir dos espectros de absorção UV- vis indicam a existência de níveis intermédios de energia entre a banda de valência e a banda de condução (CAVALCANTE et al., 2009).

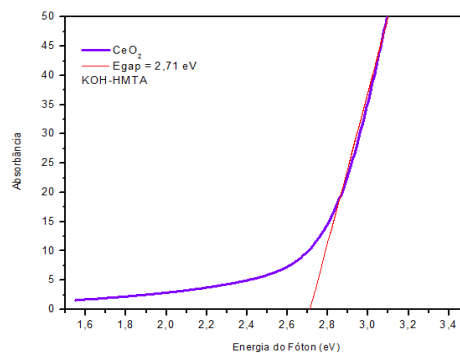
A partir dos resultados deste trabalho e os reportados na literatura, pode-se dizer que o “band gap” está relacionado com o método de preparação, dimensão do material (filme ou

nanopartículas), morfologia da partícula, concentração e tipo do agente mineralizador utilizado na síntese, tempo de processamento e presença de surfactantes. Todos esses fatores resultam em diferentes defeitos estruturais (vacâncias de oxigênio, distorções nas ligações), que são capazes de promover a formação de estados intermediários de energia dentro do “band gap” (SCZANCOSKI et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2012; SOUZA, 2011).

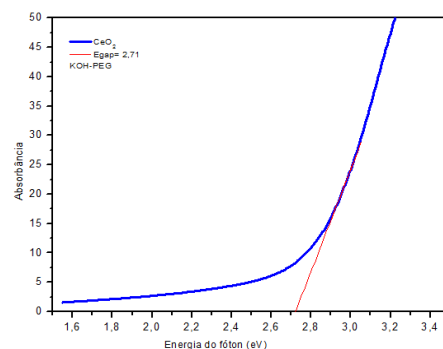
Figura 18 - Espectros de UV-Vis no modo absorvância x energia, das amostras de CeO_2 com (a) com KOH, (b) com KOH + HMTA e (c) com KOH + PEG.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Produção do próprio autor

Tabela 3 - Valores do “band gap” das nanopartículas de CeO₂ puro com agente mineralizador KOH, KOH + HMTA e KOH + PEG.

Amostras	“Band Gap” (eV)
CeO ₂ + KOH	2,88
CeO ₂ + KOH + HMTA	2,71
CeO ₂ + KOH + PEG	2,71

Fonte: Produção do próprio autor

De acordo com ROUT et al., 2009 os defeitos estruturais observados nestas nanopartículas podem ser atribuídos à vacâncias de oxigênio e / ou distorções da rede que apresentam três estados de valência diferentes: (a) vacância neutra (V_O^x), (b) mono ionizada ($V_O^\bullet$) e (c) duplamente ionizada ($V_O^{''}$). As vacâncias de oxigênio ($V_O^{''}$) são os portadores de carga mais móveis em uma estrutura e assume um papel importante no mecanismo de condução. As vacâncias de oxigênio são conhecidos como defeitos profundos (responsáveis pela emissão no violeta e região do azul) enquanto as distorções de clusters são conhecidos como defeitos superficiais (responsáveis pela emissão no verde, amarelo e região do vermelho).

6.7 Atividade Antimicrobiana

6.7.1 Análise do Halo de Inibição

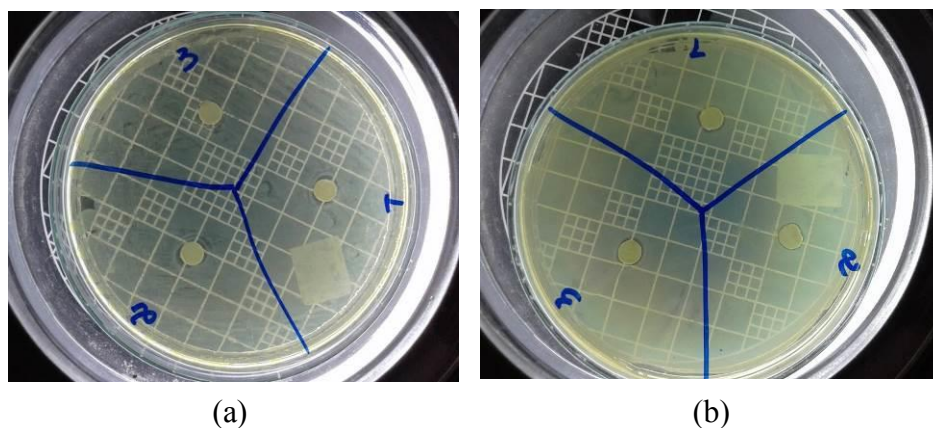
A análise do halo de inibição foi estudada para verificar o potencial bactericida do cristal de CeO₂ frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Em um primeiro experimento, suspensões de nanopartículas de CeO₂ puro foram diluídas em meio aquoso em diferentes concentrações (8mM, 15mM e 30mM) e foram levadas a banho de ultrassom para homogeneização por 10 minutos (SHAH et. al., 2012). Em seguida foi retirado um volume determinado da suspensão e neste volume colocou-se os discos de Whatman, com 6 mm de diâmetro, por aproximadamente 1 minuto, até que toda superfície fosse recoberta. Os discos, já com as suspensões, foram colocados nas placas com as bactérias inoculadas. As placas foram incubadas a 37 ° C durante 24 h, em seguida foi estudada a média do diâmetro da zona de inibição que circunda os discos. Os ensaios antimicrobianos indicaram pouca inibição do material (Figura 19) provavelmente devido ao pouco tempo de exposição do disco de Whatman frente às nanopartículas e ao crescimento

das mesmas em meio aquoso o que pode impedir o crescimento do micro-organismo. Além disso, o pequeno tamanho médio das partículas pode interferir na interação com o micro-organismo devido à limitação na razão área/volume.

Figura 19 - (a) Halo de inibição frente a *E. coli* (b) Halo de inibição frente a *S. aureus*

1. Concentração de 8mM, 2. Concentração de 15mM e 3. Concentração de 30mM



Fonte: Produção do próprio autor

Num segundo experimento aumentou-se o tempo de permanência das nanopartículas no banho de ultrassom para 60 min, de forma a desaglomerá-las (Figura 20). Em seguida foi retirado um volume determinado da suspensão o qual foi transferido para os discos de Whatman, com 6 mm de diâmetro, por aproximadamente 10 minutos, até que toda superfície fosse recoberta. As placas foram incubadas a 37 ° C durante 24 h, em seguida foi estudada a média do diâmetro da zona de inibição que circunda os discos. Os ensaios antimicrobianos indicaram nenhuma inibição (Figura 21)

Figura 20 – Nanopartículas após banho de ultrassom.



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 21 - Ensaios Antimicrobianos com nenhuma inibição.



Fonte: Produção do próprio autor

Numa terceira etapa realizou-se o ensaio biológico para as nanopartículas de CeO_2 cristalizada na presença de surfactantes. Estes, foram adicionados no CeO_2 puro na razão 1:1, sendo 40 ml de CeO_2 puro e 40 ml de HMTA ou 40 ml PEG. As concentrações foram colocadas em tubos de ensaio e levados ao banho de ultrassom, por 60 minutos, e não houve homogeneização do material, Figura 22. A solução aquosa na presença de KOH leva ao desaparecimento dos grandes aglomerados, gerando uma solução homogênea. Em contrapartida, as soluções aquosas com nanopartículas de CeO_2 com agentes surfactantes como HMTA e PEG levam a maiores aglomerados devido às forças de Van der Waals.

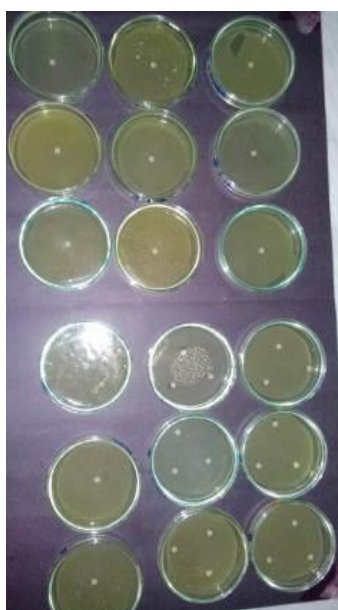
Figura 22 - Nanopartículas após banho de ultrassom.



Fonte: Produção do próprio autor

As placas foram incubadas a 37 ° C durante 24 h, em seguida foi estudada a média do diâmetro da zona de inibição que circunda os discos. Os ensaios antimicrobianos indicaram nenhuma inibição do material, Figura 23.

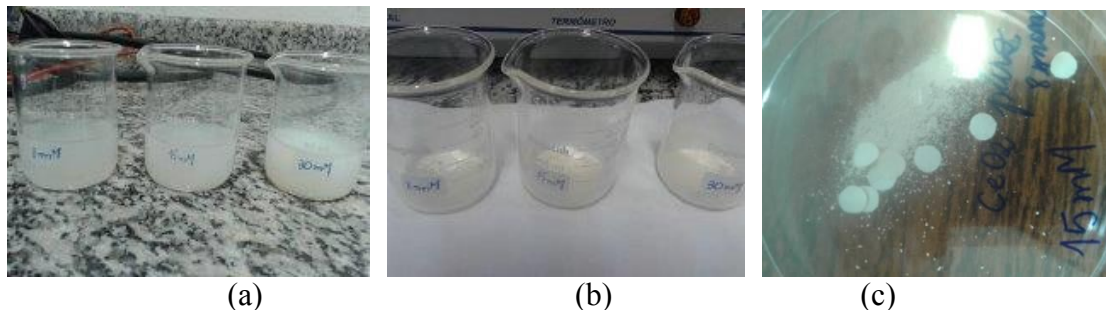
Figura 23 - Ensaios Antimicrobianos com nenhuma inibição do material.



Fonte: Produção do próprio autor

Numa 4 etapa, para a realização do CeO₂ puro com os discos de Whatman, as nanopartículas foram processadas em micro-ondas por 8 min, e em seguida lavadas 3 vezes na centrífuga, ao ser colocada na estufa, à 100°C, os discos de 6mm de diâmetro, foram colocados juntos para a secagem, a fim de que o material impregnasse em suas fibras, Figura 24.

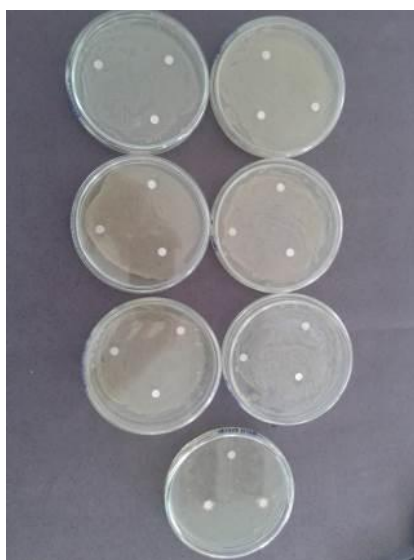
Figura 24 – (a) Nanopartículas de CeO_2 puro, juntamente com os discos de Whatman, nas concentrações de 8mM, 15mM e 30mM, antes de irem para a estufa, (b) após secagem em estufa, (c) Nanopartículas prontas para experimento biológico.



Fonte: Produção do próprio autor

Discos de Whatman e nanopartículas foram colocados juntos para secar, na estufa, e posteriormente foram colocados nas placas com as bactérias inoculadas. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 h, em seguida foi estudada a média do diâmetro da zona de inibição que circunda os discos. Os ensaios antimicrobianos indicaram nenhuma inibição do material, Figura 25.

Figura 25 - Halo de inibição frente a *E. coli* e *S. aureus*



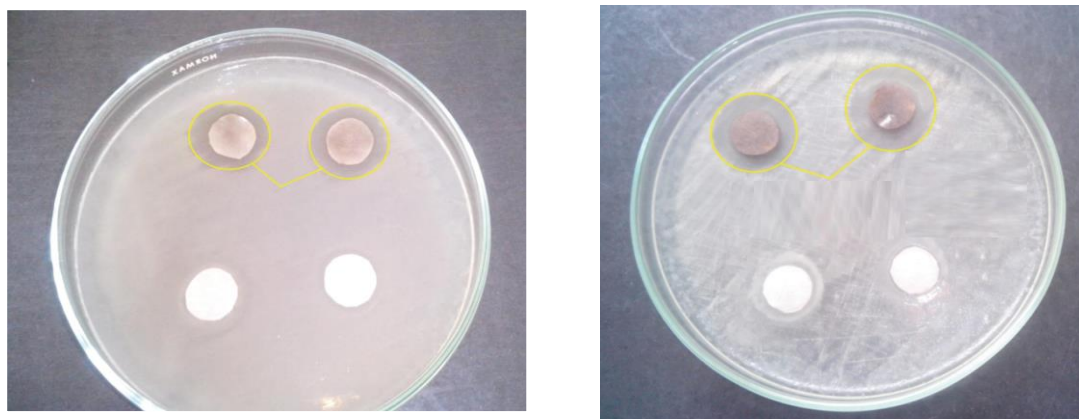
Fonte: Produção do próprio autor

Quando misturado a diferentes surfactantes, os pós de CeO_2 tendem a ficar mais aglomerados devido aos grupos funcionais presentes nesses adsorverem em sua superfície aumentando as forças de Van der Waals (Lee, 1998).

Numa etapa posterior, realizou-se no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual Paulista, a eficiência de um agente antimicrobiano que consiste em medir o tamanho

relativo ao halo de inibição ao redor do agente testado. O solvente utilizado foi o dimetilsulfoxido, um inóculo padrão de cada micro-organismo foi inicialmente espalhado pelo método de “Spread Plate” (técnica de semeadura por espalhamento) sobre a superfície de uma placa de Petri com o meio de cultura Mueller-Hinton, onde foram colocados papéis-filtro estéreis impregnados com o material. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h e a 37 °C em uma estufa bacteriológica, e os halos de inibição formados ao redor dos papéis-filtro foram então medidas. As imagens mostram os halos formados após a realização dos ensaios com as nanopartículas da solução coloidal de 1000 ppm contra cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), respectivamente, Figura 26.

Figura 26 - Teste de difusão utilizando cepas de (a) *Escherichia coli* (b) *Staphylococcus aureus*



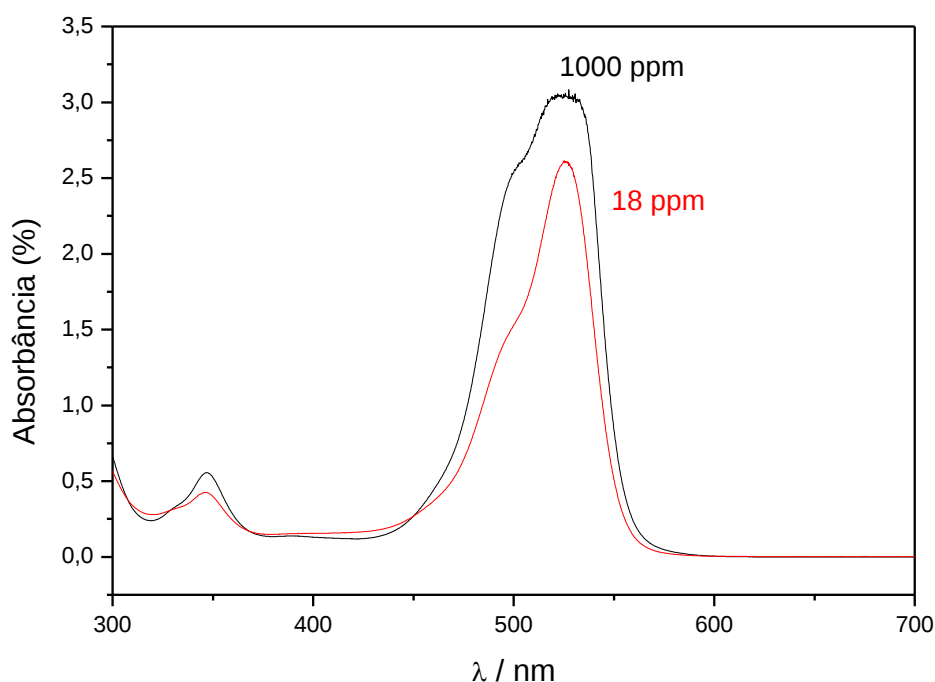
Fonte: Laboratório de Análises Clínicas da UNESP/Araraquara.

Como pode ser observado nas Figuras 26 (a) e (b), existem zonas claras bem definidas ao redor dos papéis- filtro, onde as soluções coloidais foram impregnadas. Além disso, o diâmetro médio do halo de inibição foi da ordem de 15 mm para a *Escherichia coli* e de 25 mm para a *Staphylococcus aureus*. As nanopartículas da solução coloidal de 18 ppm, por outro lado, não apresentaram atividade antimicrobiana. Em geral, as bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as bactérias Gram-positivas, devido à complexidade da membrana celular das primeiras, que acaba dificultando a entrada e consequentemente a difusão das nanopartículas para o interior desses micro-organismos. A baixa concentração de nanopartículas na solução coloidal de 18 ppm também pode ter contribuído significativamente para o resultado obtido nesse ensaio.

A Figura 27 mostra o aspecto visual das soluções coloidais de CeO₂ nas concentrações de 18 ppm e 1000 ppm, respectivamente. Para registrar o espectro de UV-Vis dessas soluções foi necessário diluir apenas aquela de maior concentração para que a banda de máxima

absorção permanecesse dentro da faixa de linearidade do espectrofotômetro. O comprimento de onda de máxima absorção (λ_{max}) para as NPs de CeO_2 nos dois sistemas está centrado em aproximadamente 400 nm, o que indica a presença de NPs de CeO_2 com formato esférico (NOGUEZ, 2007; PINTO et al., 2010). De acordo com a literatura, o aumento no tamanho das NPs de CeO_2 resulta em um deslocamento da banda plasmônica para regiões de maior comprimento de onda, o que significa que os tamanhos das NPs de CeO_2 na solução coloidal de 18 ppm são relativamente menores do que aqueles na de 1000 ppm. De acordo com a teoria de Mie, apenas uma única banda plasmônica é esperada no espectro de absorção de NPs esféricas, enquanto NPs anisotrópicas podem dar origem a duas ou mais bandas, dependendo do formato das mesmas (KLABUNDE, 2001). O aparecimento de uma banda em 350 nm indica, portanto que algumas partículas crescem anisotropicamente interferindo na inibição frente aos micro-organismos estudados.

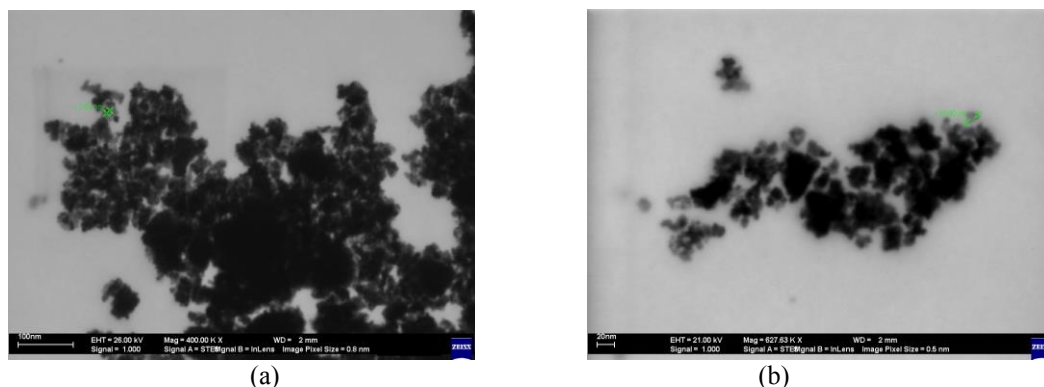
Figura 27 – Espectros de UV-Vis das soluções coloidais de NPs de CeO_2 de 18 ppm e de 1000 ppm (diluição de 100 vezes).



Fonte: Instituto de Análises Clínicas / Unesp – Araraquara

As imagens de FEG-SEM das NPs de CeO₂, por sua vez, podem ser visualizados na Figura 28. O diâmetro médio das de CeO₂ nas soluções coloidais de 18 ppm e 1000 ppm foram de aproximadamente $7,61 \pm 4,3$ nm e $15,9 \pm 7,4$ nm, respectivamente. Os $\lambda_{\max}$ observados nos espectros de UV-Vis já demonstravam esse aumento do tamanho de partícula para as NPs de CeO₂ da solução coloidal de 1000 ppm, uma vez que a banda plasmônica se encontra deslocada para a região de maior comprimento de onda.

Figura 28 – Imagens de FEG-SEM das Nanopartículas de CeO₂ (a) 18 ppm (b) 1000 ppm



Fonte: FEG-SEM, Instituto de Análises Clínicas / Unesp – Araraquara.

Segundo Pelletier (2010), as nanopartículas estudadas em seu trabalho frente a *E. coli* e *B. Subtilis*, mostraram inibição do crescimento devido ao aumento do tamanho da amostra, enquanto as partículas menores tiveram pouco efeito. Isso se deve provavelmente, as partículas terem superfícies irregulares e ásperas apresentando cantos e bordas que podem ser biologicamente e quimicamente reativos. Os átomos nesses locais têm ligações mais fracas e, conseqüentemente ligam-se a outras moléculas mais eficientemente. Outro fator que pode ter ocasionado a não inibição, pode ter sido o pH do meio, o qual pode alterar a superfície da nanopartícula e, assim, a afinidade de adsorção das partículas para as bactérias. No entanto, mudanças no meio de pH entre 6,9 - 7,8 não alterou segundo Pelletier (2010), os efeitos da nanopartículas no crescimento bacteriano, o intervalo de tamponamento do meio e a incapacidade das bactérias de crescer em gamas de pH extremos, acima de pH 7,8. Além do tamanho, há também a área de superfície, a biodisponibilidade, a agregação das partículas, distorção estrutural, e o meio de crescimento podem ter impacto na inibição de nanopartículas. De acordo com Pelletier (2010), a presença de nanocristais CeO₂ pode inibir o desenvolvimento de algumas bactérias, mas isso não indica necessariamente que o material é bactericida. O crescimento das bactérias usadas em seu trabalho foi inibido em função da concentração de óxido empregado.

Dessa forma sugere-se que a não inibição nos experimentos deve estar ligado ao elevado grau de aglomeração, excesso de vacâncias de oxigênio e a morfologia das nanopartículas, as quais interferem na energia da superfície e na interação com citocromos dos micro-organismos. Portanto, o conhecimento detalhado da energia de superfície desse óxido não estequiométrico deve ser avaliado potencializando sua eficácia no controle do crescimento dos micro-organismos.

7 CONCLUSÃO

Este método permitiu empregar baixas temperaturas de síntese, neste caso, apenas 100°C, rápida taxa de aquecimento, o que faz com que ele tenha uma redução no tempo de processamento, baixo custo de energia, sendo por estes motivos, ambientalmente amigável.

Dados de difração de raios X e Espectroscopia no Infra-Vermelho sugerem a formação de uma estrutura cúbica de face centrada e nanopós livre de contaminantes na superfície.

A adição do surfactante permitiu a obtenção de nanopartículas de CeO₂ cristalinas com diferentes tamanhos de cristalitos.

No geral, os espectros de UV-Vis das soluções coloidais de CeO₂ (18 ppm e 1000 ppm, respectivamente) foram muito similares entre si, evidenciando a presença de uma banda de maior intensidade centrada em aproximadamente 500 nm, que é indicativo de CeO₂ com formato esférico. Esse resultado foi corroborado pelas análises de FEG-SEM que mostraram NPs com tamanhos médios de $7,3 \pm 4,3$ nm (solução coloidal de 18 ppm) e de $15,2 \pm 7,4$ nm (solução coloidal de 1000 ppm), respectivamente.

Com relação aos ensaios microbiológicos, os antibiogramas revelaram que apenas a solução coloidal de 1000 ppm apresentou atividade antimicrobiana em relação às duas bactérias testadas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*).

As NPs de CeO₂ da solução coloidal de 18 ppm, por outro lado, não apresentaram atividade antimicrobiana. A baixa concentração de CeO₂ nessa solução coloidal pode ter contribuído significativamente para esse resultado. Portanto, os ensaios antimicrobianos indicaram que a inibição do material frente às nanopartículas de CeO₂ provavelmente esta associada ao tamanho de partícula e a densidade de vacâncias de oxigênio distribuídas pela superfície e pelo núcleo dos cristais.

Contudo, por este estudo ter sido realizado *in vitro*, seus resultados podem ser diferentes quando realizados *in vivo*, portanto sugere-se que novos estudos sejam realizados para investigar os possíveis efeitos tóxicos que estes óxidos nanoparticulados podem causar nos seres vivos.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Caracterização por MET da solução coloidal com diferentes tamanhos (18 ppm e 1000 ppm);
- Determinação do histograma das soluções coloidais;
- Encapsulamento das NPs de CeO_2 em polímeros sulfonados devido a sua habilidade de agir como estabilizadores ou agentes capturantes na superfície;
- Empregar o modelo de Wulff para determinação da morfologia das NPs de CeO_2 nas condições de síntese realizadas.

REFERÊNCIAS

- AFANASIEV, P. et al. Nickel and cobalt hexamethylenetetramine complexes $(\text{NO}_3)_2\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_6(\text{HMTA})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($\text{Me} = \text{Co}^{2+}, \text{Ni}^{2+}$): new molecular precursors for the preparation of metal dispersions. **Inorganic Chemistry**, Oxford, v. 47, p. 2303-2311, 2008.
- AL-HARAHSEH, M.; KINGMAN, S. W. Microwave-assisted leaching-a review. **Hydrometallurgy**, Nottingham (Inglaterra), v.73, p.189-203, 2004.
- ARAUJO, B. A. C.; OLIVEIRA, A. L.; SANTOS FILHO, L. Isolamento de amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus* em estetoscópios usados no ambiente hospitalar. **RBAC**, Rio de Janeiro, 32(4): 285-288, 2000.
- BLATT, J. M.; PIAZZA, C. E. Perfil de sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase* negativo isolados em pacientes internados. **RBAC**, Rio de Janeiro 36(2): 129-131, 2004.
- CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico sequencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.
- CAVALCANTE, L.S. et. al. Microstructure, dielectric properties and optical band gap control on the photoluminescence behavior of $\text{Ba}[\text{'Zr IND.0.25''Ti IND. 0.75}]\text{'O IND.3'}$ thin films. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**. Dordrecht, v. 49, n. 1, p. 35-46, 2009
- CAO, G.; WANG, Y. Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications. **Journal of the American Chemical Society**, London, 2004
- KILBOURN, B. T. Cerium: A guide to its role in chemical technology, **Library of Congress Catalog Card Number**. Molycop, Colorado, 92-93444 (1995)
- DEITOS, D. et. al. Perfil de sensibilidade de cepas de *S. aureus* isoladas de crianças em creche. **RBAC**, Rio de Janeiro, v.31, n.4, p.183-185, 1999.
- DEUS, R.C. et. al. Influence of mineralizer agents on the growth of crystalline CeO_2 nanospheres by the microwave-hydrothermal method, **Journal of Alloys and Compounds**, Lausanne, Switzerland 550, pg. 245-251, 2013.
- DJURICIC, B.; PICKERING, S., Nanostructured cerium oxide: Preparation and properties of weakly - agglomerated powders. **Journal of the European Ceramic Society**, The Netherlands, 19, (11), 1925-1934, 1999.
- FASOL, G., Nanowires: small is beautiful. **Applied Physics**, Washington, v. 280, p. 545-546, 1998.
- FERRER, M. M. **Estudo das propriedades fotoluminescentes do ZnS e ZnS: eu** obtidos pelo método solvotérmico assistido por micro-ondas. 2012. 52 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.

FINGER, L.W.; COX, D.E. & JEPHCOAT, A.P. A correction for powder diffraction peak asymmetry due to axial divergence. **Jornal of Applied Crystallography**, Great Britain, 27: 892, 1994.

FREITAS, D.B. **Atividade antimicrobiana de fluorquinolonas e ação sobre plasmídeos em amostras de Staphylococcus aureus humanas e bovinas**. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

GEZELTER et al. **JMol**, 2000 Disponível em: <<http://jmol.sourceforge.net/>>. Acesso em: 04 out. 2014.

GLEITER, H. Materials with ultrafine microstructures: retrospective and perspectives. **Nanostructured Materials**, Saarbrücken, Germany, v. 1, p. 1-19, 2003.

GLEITER, H. Nanostructured materials: state of the art and perspectives. **Nanostructured Materials**, Saarbrücken, Germany, v. 6, p. 3-14, 1995.

GLEITER, H., Nanostructured materials: basic concepts and microstructure, **Acta Mater**, Saarbrücken, Germany, p 2000, 48, 2000.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de física: gravitação, ondas e termodinâmica**. 4.ed. Rio de Janeiro: LTC, 1996. v.2.

HIBINO, T. et. al. A low-operating-temperature solid oxide fuel cell in hydrocarbon-air mixtures, **Science**, Vol. 288, Issue 5473, pp. 2031-2033, 2000.

HARRIS, J. M. Em Poly (Ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, **Plenum Press**, New York, 1998, p. 228.

HIRANO, M.; INAGAKI, M., Preparation of monodispersed cerium (IV) oxide particles by thermal hydrolysis: influence of the presence of urea and Gd doping on their morphology and growth. **Journal of Materials Chemistry**, Michigan, 10, (2), 473-477, 2000.

HO, C, et. al. Morphology-controllable synthesis of mesoporous CeO₂ nano-and microstructures, **Chemistry of Materials**, Hong Kong, 17: 4514-4522, 2005.

HU, J.T. et. al. Controlled growth and electrical properties of heterojunctions of carbon nanotubes and silicon nanowires, **Nature**, Massachusetts, v. 399, p. 48-51, 1999.

ICDD. **Ficha ICDD na 34-0394**: history of ICDD. Disponível em: <<http://www.icdd.com/profile/overview.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. 2. ed. São Paulo: Premier, 1998.

KLABUNDE, K.J. **Nanoscale materials in chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001, 287 p.

KEAR, B. H.; COLAIZZI, W. E.; LIAO, S.-C. On the processing of nanocrystalline and nanocomposite ceramics. **Scripta Materialia**, Piscataway, v. 44, p. 2065-2068, 2001.

KINGSTON, H.M., JASSIE, L.B. Introduction to microwave sample preparation – theory and practice, **ACS Professional Reference Book**, Washington, 1988. 263p.

KOMARNENI, S.; ROY, R.; LI, Q. H., Microwave-hydrothermal synthesis of ceramic powders. **Materials Research Bulletin**, The Pennsylvania State University, 27, (12), 1393-1405, 1992.

KOMARNENI, S. et. al. Microwave-hydrothermal processing for synthesis of electroceramic powders. **Journal of Materials Research**, The Pennsylvania State University, 8, (12), 3176-3183, 1993.

KOMARNENI, S. et. al, Microwave-hydrothermal processing for synthesis of layered and network phosphates. **Journal of Materials Chemistry**, The Pennsylvania State University, 4, (12), 1903-1906, 1994.

KOMARNENI, S. et. al. Microwave-hydrothermal processing of metal powders. **Journal of Materials Research**, The Pennsylvania State University, 10, (7), 1687-1692, 1995.

LEE, P.; R.; BANFIELD, J. F. Imperfect oriented attachment: dislocation generation in defect-free nanocrystals. **Science**, Tokyo, 281, 969-971, 1998.

LEE, J. S.; CHOI, S. C., Crystallization behavior of nano-ceria powders by hydrothermal synthesis using a mixture of H_2O_2 and NH_4OH . **Materials Letters**, Sageun-dong, 58, (3-4), 390-393, 2004.

LIEBER, C.M., One-dimensional nanostructures: chemistry, physics & applications, **Solid State Communications**, Cambridge, v. 107, No.11, p. 607-616, 1998.

LIMA JÚNIOR, L. F., Síntese processamento em hidrotermal convencional/ microondas e propriedades fotoluminescentes dos pós de $BaWO_4$. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2008.

LIMA, M. V. S. Estudo do comportamento fotoluminescente e morfológico do $BaWO_4$. 2010. 71 f. il. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências Exatas e de Tecnologia Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

LIN,X.M; LI,L.P; LI,G.S; SU,W.H Transport property and Raman spectra of nanocrystalline solid solutions $Ce_{0.8}Nd_{0.2}O_{2-\delta}$ with different particle size, **Materials Chemistry and Physics**, Changchun, V. 69, p. 236-240, 2000.

LIN, M. et. al. Hydrothermal synthesis of CeO_2 nanocrystals: ostwald ripening or oriented attachment? **Crystal Growth Desing**, Singapore, 12 (6), pp 3296–3303, 2012.

LONGO, V. M. et. al. Structural conditions that leads to photoluminescence emission in $SrTiO_3$: Na experimental and theoretical approach. **Journal of Applied Physics**, Melville,104, 023515-1-11, 2008.

MA, R.Z.; BANDO, Y.; SATO, T., Controlled synthesis of BN nanotubes, nanobamboos, and nanocables, **Advanced Materials**, Zug, Suíça, v. 14, p. 366-368, 2002.

McBRIDE, J.R. et. al. Template preparation of nanoscale $\text{Ce}_x\text{Fe}_{1-x}\text{O}_2$ solid solutions. **Journal of Applied Physics**, Berlin, 76, 2435-41, 1994.

MARTINS, T. S.; ISOLANI, P. C., Terras raras: aplicações industriais e biológicas, **Química Nova**, Cubatão, 28, 111-117, 2005.

MARTINS, T. S. Cério: propriedades catalíticas, aplicações tecnológicas e ambientais. **Quim. Nova**, São Paulo, V. 30, No. 8, 2007.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. 2.ed. Manole: São Paulo, 1999.

MINGOS, D. M. P.; BAGHURST, D. R. Applications of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry. **Chemical Society Reviews**, Oxford, v.20, p.1-47, 1991.

MINGUEZ. Actividad antimicrobiana del agua ozonizada en determinadas condiciones experimentales. **Rev San Hig Pub**, Madrid, v. 64, p. 415-423, 1990.

MOREIRA, M.L. et. al. Structural and optical properties of CaTiO_3 perovskite based materials obtained by microwave assisted hydrothermal synthesis: An Experimental and Theoretical Insight. **Acta Materialia**, Oxford, v. 57, p. 5174-5185, 2009.

NOGUEZ, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. **The Journal of Physical Chemistry**, México, v.111, p. 3806-3819, 2007.

NONO, M. C. A. Compaction behavior study of powder composed by nanoparticles agglomerates and aggregates. **Materials Science Forum**, Switzerland, v. 530, p. 461- 466, 2006.

PADILHA, A. F.; AMBROZIO, F. Técnicas de análises microestrutural. São Paulo: Hemus, 1985. 190 p.

PARSEKIAN, V. M. Estudo teórico e experimental da propriedade fotoluminescente das perovskitas SrTiO_3 e SrZrO_3 com ordem e desordem estrutural. 2008. 154f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia, conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 2005. (v.1 e v.2)

PELLETIER, D. A. et. al. Effects of engineered cerium oxide nanoparticles on bacterial growth and viability. **Appl. Environ. Microbiol**, Tennessee, 76(24):7981, 2010.

PINTO, V.V. et. al. Long time effect on the stability of silver nanoparticles in aqueous medium: Effect of the synthesis and storage conditions, **Physicochemical Engineering Aspects**, São João Madeira, Portugal, 364:19-25, 2010.

ROCHA, J. M.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P.; Effects of additives on the activity of a covalently immobilized lipase in organic media, **J. Biotechnol.**, 66, 61, 1998.

RODITI, I. **Dicionário Houaiss de Física**. Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2005. 248 p.

RYAN, K. J. Sherris **Medical microbiology: an introduction to infectious diseases**. 3 ed. Stamford: Appleton and Lange, 1994.

SALA, O. **Fundamentos da espectroscopia raman e no infravermelho**. São Paulo: Editora Unesp, 1996. p. 223.

SANTOS, C. C. L. **Síntese e aplicação biotecnológica de nanoestruturas de óxido de cério (IV), pelo método hidrotermal de micro-ondas**. 2013. 134f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

SCHAECHTER, M. et. al. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SCZANCOSKI, J. C. **Estudo das propriedades óticas e morfológicas de pós de SrMoO_4 processados em sistemas hidrotérmicos**. 2011. 174f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

SILVA, S. A. **Síntese química e calcinação por micro-ondas de pós nanoestruturados de alumina**. 86 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia Espaciais/Ciência e Tecnologia de Materiais e Sensores), Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2010.

SHAH, V. et. al. Antibacterial activity of polymer coated cerium oxide nanoparticles. **Plos ONE**, Oakdake, New York, 7(10): e47827, 2012.

SIMÕES, A.Z. et. al. Improvement of fatigue resistance on La modified BiFeO_3 thin films. **Current Applied Physics**, 9 520–523, 2009.

SKORODUMOVA, N. V. et al. Electronic, bonding, and optical properties of CeO_2 and Ce_2O_3 from first principles. **Physical Review B**, Gothenburg, Vol. 6411, no 11, 5108, 2001.

SOUZA, A. E. **Fotoluminescência e mecanismo de crescimento em titanatos nanoestruturados**. 2011, 154f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2011.

STUERGA, D. A. C.; GAILLARD, P. Microwave athermal effects in chemistry: A myth's autopsy; Part I: Historical background and fundamentals of wave-matter interaction. **Journal Microwave Power and Electromagnetic Energy**, Göteborg, Sweden v.31, p.87-100, 1996.

TEIXEIRA, G.F. et. al. Photoluminescence properties and synthesis of a PZT mesostructure obtained by the microwave-assisted hydrothermal method, **Journal of Alloys and Compounds**, Torino, 512, 124– 127, 2012.

TENNE, R.; MARGULIS, L.; GENUT, M.; HODES, G., Polyhedral and cylindrical structures of tungsten disulfide, **Nature**, Rehovot, v. 360, p. 444-446, 1992.

TRANQUILIN, R. L., **Estudo das propriedades microestruturais e ópticas do BaMoO₄ processado em hidrotermal assistido por microondas**. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista, Bauru, 1998.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. Atheneu: São Paulo, 1999.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia staphylococcus aureus**. São Paulo: Atheneu, 2005.

VIDYASAGAR, C.C., ARTHOBA, N. Y. Surfactant (PEG 400) effects on crystallinity of ZnO nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, Shankaraghatta, v.4 p. 507–510, 2012.

VILLENEUVE, P. et. al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Montpellier. v.9, p. 113–148, 9, 11, 2000.

WANG, S.; MAEDA, K., Direct formation of crystalline gadolinium-doped ceria powder via polymerized precursor solution. **Journal of the American Ceramic Society**, San Francisco, 85, (7), 1750-1752, 2002.

WANG, Y. R.; MORI, T.; LI, J. G.; IKEGAMI, T., Low-temperature synthesis of praseodymium-doped ceria nanopowders. **Journal of the American Ceramic Society**, Tsukuba, 85, (12), 3105-3107, 2002.

WANG, H.; ZHU, J. J.; ZHU, J. M.; LIAO, X. H.; XU, S.; DING, T.; CHEN, H. Y., Preparation of nanocrystalline ceria particles by sonochemical and microwave assisted heating methods. **Physical Chemistry Chemical Physics**, San Francisco, 4, (15), 3794-3799, 2002

WILSON, G.J. et. al. Modification of TiO₂ for enhanced surface properties: finite ostwald ripening by a microwave hydrothermal process. **Langmuir**, Australia, 22, 2016-2027, 2006.

WOOD, D.; TAUC, J. Weak absorption tails in amorphous semiconductors. **Physical Review B**, New Jersey, v. 5, p. 3144–3151, 1972.

YOO, J. The effects of microstructure on Ba_{1-x}Sr_xTiO₃ pyroelectric materials for pyroelectric and bolometer infrared sensors, **Ph. D. Thesis**, Auckland, University of Auckland, 1999.

YU, J.G.; YU, J.C.; HO, W.K.; WU, L.; WANG, X.C., A simple and general method for the synthesis of multicomponent Na₂V₆O₁₆.3H₂O single-crystal nanobelts, **Journal of the American Chemical Society**, China, v. 126, p. 3422-3423, 2004.

ZHU, H. W. et. al. Direct synthesis of long single-walled carbon nanotube strands, **Science**, New York, v. 296, p. 884-886, 2002.