

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE ZrO_2 E $ZrO_2:Ag$ POR MÉTODO HIDROTHERMAL

CÁSSIA VANESSA NOVA

ORIENTADOR: PROF. Dr. FENELON MARTINHO LIMA PONTES

CO-ORIENTADOR: PROF. Dr. JAMES VENTURINI

Bauru-SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE ZrO_2 E $ZrO_2:Ag$ POR MÉTODO HIDROTHERMAL

CÁSSIA VANESSA NOVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais de Bauru, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência dos Materiais, área de concentração: Química.

Orientador: Dr. Felton Martinho Lima Pontes

Co-orientador: Dr. James Venturini

Bauru-SP
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE ZrO₂ E ZrO₂:Ag POR MÉTODO HIDROTHERMAL

CÁSSIA VANESSA NOVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais de Bauru, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia dos Materiais.

Membros da Banca:

Profa. Dr.^a Alejandra Hortencia Miranda
González

Prof. Dr. Aroldo Geraldo Magdalena

Prof. Dr. Fenelon Martinho Lima Pontes

Prof. Dr. Vinícius Carvalho Porto

Prof. Dr. Willian Zambuzzi

Bauru-SP
2016

Nova, Cássia Vanessa.
Síntese, Caracterização E Avaliação Antimicrobiana de
Nanopartículas de ZrO₂ e ZrO₂:Ag por Método
Hidrotermal./ Cássia Vanessa Nova, 2016.
118 f.

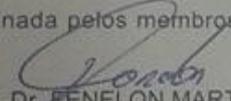
Orientador: Fenelon Martinho Lima Pontes
Co-orientador: James Venturini

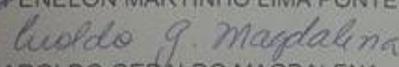
Tese (Doutorado)-Universidade Estadual Paulista.
Faculdade de Ciências, Bauru, 2016.

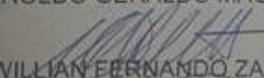
1. Dióxido de Zircônio. 2. Prata. 3. Síntese
hidrotermal. 4. Escherichia coli. 5. Staphylococcus
aureus. 6. Nanopartículas. 7. Bioteste. I.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências.
II. Título.

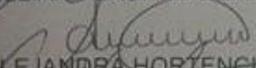
ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE CÁSSIA VANESSA NOVA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS.

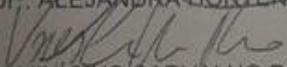
Aos 23 dias do mês de setembro do ano de 2016, às 14:00 horas, no(a) Anfiteatro da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências - UNESP/Bauru, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. FENELON MARTINHO LIMA PONTES - Orientador(a) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru, Prof. Dr. AROLDO GERALDO MAGDALENA do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências de Bauru, Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI do(a) Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof^a. Dr^a. ALEJANDRA HORTENCIA MIRANDA GONZÁLES do(a) Campus Pirituba / Universidade Anhanguera de São Paulo - UNIAN, Prof. Dr. VINÍCIUS CARVALHO PORTO do(a) Departamento de Prótese / Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da TESE DE DOUTORADO de CÁSSIA VANESSA NOVA, intitulada **Síntese, caracterização e avaliação antimicrobiana de nanopartículas de ZrO₂ e ZrO₂:Ag por método hidrotermal**. Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. FENELON MARTINHO LIMA PONTES


Prof. Dr. AROLDO GERALDO MAGDALENA


Prof. Dr. WILLIAN FERNANDO ZAMBUZZI


Prof^a. Dr^a. ALEJANDRA HORTENCIA MIRANDA GONZÁLES


Prof. Dr. VINÍCIUS CARVALHO PORTO

Dedico este trabalho ao meu amado sobrinho Miguel, à minha mãe, Lourdes e à minha irmã, Máira, pois nos momentos de dificuldade, de cansaço e desânimo, a compreensão e o amor de vocês me fizeram continuar e chegar até aqui.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela vida, saúde e força nesta longa caminhada! Por me iluminar e me ajudar nas horas mais difíceis da minha vida.

À minha mãe, pelo exemplo de vida, caráter, humildade, pelos seus conselhos e amor incondicional. À minha irmã Maíra que sempre esteve comigo e principalmente por ter me dado à alegria de ser tia do lindo e querido Miguel.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Fenelon Martinho Lima Pontes, pela paciência e sabedoria no decorrer deste doutorado!

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. James Venturini, por todo apoio, conhecimento compartilhado, amizade e por acreditar que tudo vai dar certo!

À banca examinadora que participou no exame geral de qualificação deste trabalho, Prof^a. Alejandra e Prof. James. Obrigada por compartilharem seus conhecimentos e serem sempre tão éticos e gentis!

Às amigas queridas que sempre ouviram minhas lamentações durante o decorrer desta jornada de trabalho, Lary, Jana, Paulinha que sempre estiveram prontas e dispostas a ajudar em todos os momentos. Ao meu amigo, Diogo, pela paciência, sabedoria, por sua preciosa ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho!

À amiga Fran, por ouvir todas as lamentações diárias, ajudar, aconselhar! Pelas infinitas mensagens de risadas, desespero, raiva, força, enfim, por tudo! Muito obrigada amiga!

Às amigas, Simone e Teruel pelos conselhos e risadas, em especial à amiga querida Ana Lúcia, por sempre sanar minhas dúvidas de gramática e concordância e ouvir minhas lamentações.

Ao Departamento de Química da UFSCAR, pelas medidas realizadas, em especial ao Rori, por sempre realizar as medidas com muita paciência.

Ao Laboratório LIPE por realizar os testes biológicos, em especial à Karol, à Angelinha que realizaram os testes e me ajudaram no entendimento do procedimento experimental e das técnicas biológicas. Obrigada pela paciência e conhecimento!

A Universidade Estadual Paulista-UNESP, por proporcionar toda a infraestrutura e profissionais qualificados.

A Capes pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Química-UNESP, funcionários e professores pela convivência e conhecimento adquirido, em especial ao Toninho por montar todo aparato experimental para os ensaios biológicos no LIPE.

A pós-graduação Posmat por proporcionar a realização deste doutoramento.

Aos Professores Doutores, Alejandra, Aroldo, Vinícius e Willian, que aceitaram fazer parte da fase final deste trabalho, como banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Elson Longo, pelo uso do Laboratório e equipamentos do LIEC-UFSCAR.

Em especial ao CEPID-CDMF-Fapesp/Processo n.º 2013/07296-2 por financiar essa pesquisa.

A todos que ajudaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho!

A todos vocês, muito obrigada!

O tempo é um químico invisível, que dissolve, compõe, extrai e transforma todas as substâncias morais.

MACHADO DE ASSIS

Se se tem caráter, tem-se também uma experiência típica própria, que sempre retorna.

FRIEDRICH NIETZSCHE

NOVA, C. V. **Síntese, Caracterização E Avaliação Antimicrobiana de Nanopartículas de ZrO₂ e ZrO₂:Ag por Método Hidrotermal**. 2016. 118 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - UNESP, Faculdade de Ciências, Bauru, 2016.

RESUMO

O aumento de doenças infecciosas vem perturbando as economias mundiais e a saúde pública. As bactérias que contribuem para essa preocupação são as *Escherichia coli*, Gram-negativa e a *Staphylococcus aureus*, Gram-positiva. Essas bactérias podem provocar infecções graves, principalmente quando presentes em água, alimentos e ambientes hospitalares. Nanopartículas estão sendo desenvolvidas para o tratamento e prevenção dessas estirpes biológicas. Nanoestruturas de ZrO₂ apresentam propriedades, ópticas, fungicidas e bactericidas. Quando os metais são suportados nas estruturas, como, Ag, suas propriedades bactericidas são potencializadas. Os materiais foram produzidos por síntese hidrotermal e caracterizados por DRX, UV-Vis, FTIR, MEV, TEM e TG. Para avaliar as nanopartículas sintetizadas, foram realizados testes de atividade antimicrobiana com as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (cepas sensíveis e resistentes à meticilina). A eficiência da avaliação antimicrobiana foi mensurada por cinética de crescimento e estatística, por ensaio colorimétrico de viabilidade e MEV. Os resultados das caracterizações mostraram a metodologia de produção de nanopartículas por rota hidrotermal que foram eficientes na produção de nanomateriais cristalinos com morfologia esférica para a zircônia tetragonal, com tamanhos entre 7 e 10 nm e prata cúbica, com tamanho médio entre 40 e 50 nm. As técnicas de TG e FTIR indicaram e permitiram quantificar e identificar a presença de matéria orgânica residual do processo de síntese. Os biotestes revelaram que as nanopartículas de dióxido de zircônio com e sem prata foram eficientes na inibição das bactérias.

Palavras-chave: Dióxido de Zircônio, prata, síntese hidrotermal, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, nanopartículas, bioteste.

NOVA, C.V. **Synthesis, Characterization and Antimicrobial Evaluation of Nanoparticle ZrO₂ and ZrO₂:Ag by Hydrothermal Method**. 2016. 118 p. Thesis (Doctoral in Materials Science and Technology) - UNESP, School of Science, Bauru, 2016.

ABSTRACT

The increase in infectious diseases is disrupting the world's economies and public health. The bacteria that contribute to this concern are *Escherichia coli*, one Gram-negative bacilli and *Staphylococcus aureus*, Gram-positive. These bacteria can cause serious infections, especially when present in water, food and hospital environments. Nanoparticles are being developed for the treatment and prevention of these biological strains. ZrO₂ nanostructures have properties such as optical, fungicides and bactericides. When metals are supported in the compound, such as, Ag, its bactericidal properties are enhanced. The materials were produced by hydrothermal synthesis and characterized by XRD, UV-Vis, FTIR, SEM, TEM and TG. To evaluate the synthesized nanoparticles Antimicrobial activity tests were performed using *Escherichia coli* and strains of methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. Evaluation of antimicrobial activity was determined by kinetic of growth, viability assay and SEM. The results of the characterization showed the nanoparticles production methodology by hydrothermal route that were efficient in the production of crystalline nanomaterials with spherical morphology for tetragonal zirconia with sizes between 7 and 10 nm and cubic silver, with an average size between 40 and 50 nm. TG techniques and FTIR indicated and allowed to quantify and identify the presence of residual organic matter in the synthesis process.

Keywords: Zirconium dioxide, silver, hydrothermal synthesis, *Escherichia coli*, bioassay, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ilustração dos processos “Top-down” e “Bottom-up” de nanopartículas. (Fonte: Adaptado de Madhumitha et al., 2013).	25
Figura 2- Número de nanomateriais no mercado mundial. (Fonte: Riccardi et al., 2015).	26
Figura 3- Polimorfismo do ZrO ₂ . (a) Estrutura cúbica; (b) estrutura tetragonal e (c) estrutura monoclinica. (Fonte: Adaptado de Gallino et al., 2011).	28
Figura 4- TEM de nanopartículas de Ag: (a) cubos, (b) triângulos, (c) nanofios, (d) nanofios alinhados. (Fonte: Behra et al., 2013).	33
Figura 5- Descrição esquemática do deslocamento da nuvem eletrônica em nanopartículas sob o efeito de uma onda eletromagnética. (Fonte: Adaptado de Moores et al., 2006).	35
Figura 6- Ilustração esquemática do processo de nucleação e crescimento de nanopartículas. (Fonte: Adaptado de Róz et al., 2015).	39
Figura 7- Esquema do aparato para reações hidrotermais. (Fonte: adaptado de Mourão et al., 2009).	40
Figura 8- Estrutura química do Butóxido de Zircônio.	41
Figura 9- Paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Observa-se que, em bactérias Gram-positivas, o peptidoglicano é muito mais espesso que em bactérias Gram-negativas. (Fonte: Madigan et al., 2016).	43
Figura 10- Estrutura externa (a) e interna (b) da bactéria <i>Escherichia coli</i> .	44
Figura 11- A) Característica da colônia de <i>S. aureus</i> cultivada de em Ágar. B) Caso clínico de septicemia (infecção generalizada) superficial adquirida em pós-operatório por <i>S. aureus</i> . C) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (Fonte: Bernard, et al., 2004).	45
Figura 12- (a) Mecanismo proposto para a interação das nanopartículas com a parede celular bacteriana. (b) Rompimento das ligações peptídicas e fragmentação do peptidoglicano (PGN). (Fonte: Adaptado de Mirzajani et al., 2006).	49
Figura 13- Fluxograma das condições de síntese para obtenção das amostras pela síntese OPM/Hidrotermal.	53
Figura 14- Imagem das etapas de síntese por rota híbrida OPM com tratamento hidrotérmico.	55
Figura 15- Imagem do Reator Hidrotermal.	56

Figura 16- Imagem dos nanomateriais produzidos: Z, ZAg1, ZAg10.	57
Figura 17- Repique de <i>E.coli</i> feito em placa contendo ágar BHI pela técnica de esgotamento, vinte e quatro horas anteriores ao experimento.	59
Figura 18- Ajuste do inóculo determinado pela leitura de absorvância ($\lambda = 620 \text{ nm}$) em espectrofotômetro de microplaca, com densidades ópticas entre 0,100 – 0,200. Densidade óptica da suspensão bacteriana equivale a, aproximadamente, $2,0 - 3,0 \times 10^5$ Unidades Formadora.	60
Figura 19- (a) Cultura celular juntamente com microtubos, durante a incubação de 6 horas à 37°C, sob agitação. (b) Microtubos incubados por 20 minutos, com a tampa aberta, à 37°C, durante a determinação da viabilidade bacteriana pelo método colorimétrico MTT (Brometo de (3-(4,5 dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido)).	61
Figura 20- Amostras dos controles negativo (à esquerda) e positivo (à direita), após adição de MTT (Brometo de (3-(4,5 dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido)), o qual é reduzido quando interage com células vivas, formando cristais de formazan, com coloração azul, representado pelo controle positivo. A quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis.	61
Figura 21- Preparo do inóculo.	62
Figura 22- Viabilidade bacteriana.	63
Figura 23- Difrátogramas de raios-X das amostras Z, ZAg1 e ZAg10.	69
Figura 24- Difrátogramas de raios X da mistura $\text{ZrO}_2\text{-Y- Al}_2\text{O}_3$, sinterizado a 1500°C e 1600oC, com 0 e 360 minutos de isoterma.	70
Figura 25- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da amostra Z (ZrO_2) com aumento de 33 mil vezes.	72
Figura 26- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da amostra ZAg1($\text{ZrO}_2\text{:Ag 1\%}$) com aumento de 100 mil vezes.	72
Figura 27-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da amostra ZAg10 ($\text{ZrO}_2\text{:Ag 10\%}$) com aumento de 100 mil vezes.	73
Figura 28- Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX) da amostra ZAg10 ($\text{ZrO}_2\text{:Ag10\%}$).	74
Figura 29- (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da amostra Z; (b) ampliação dos planos cristalinos da ZrO_2	75
Figura 30- Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da amostra ZAg1.	75

Figura 31- (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da amostra ZAg10; (b) Ampliação da imagem.	76
Figura 32- Detalhe da imagem obtida por TEM do ancoramento de ZrO_2 sobre a nanopartícula de Ag da amostra ZAg10.	76
Figura 33- Espectro na região do infravermelho das amostras Z, ZAg1 e ZAg10 obtidas através da rota hidrotermal.	78
Figura 34- Curvas termogravimétricas das amostras obtidas através síntese hidrotermal.	79
Figura 35- Espectros de (a) reflectância difusa e (b) $f(R)$ para as amostras sintetizadas através do método hidrotermal.	80
Figura 36- Espectro da banda de ressonância plasmônica da prata nas morfologias bastão, esfera, cubo e triângulo. (Fonte: Adaptado de RYCENGA et al., 2011).	82
Figura 37- Cinética do crescimento de <i>E.coli</i> por densidade óptica (DO) na presença de (a) Z; (b) ZAg1; (c) ZAg10 (concentrações de 0,25mg/ml a 2mg/ml). Bactérias foram cultivadas, sob agitação, a 37°C por 6h. (d) Determinação da porcentagem de inibição bacteriana após 6h de tratamento com as nanopartículas na concentração de 2mg/ml (teste t-pareado, n=4, ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$).	84
Figura 38- Microscopia eletrônica de varredura de <i>E.coli</i> (a) tempo zero, com aumento de 15 mil vezes; (b) 2 horas, com aumento de 60 mil vezes; (c) 4 horas, com aumento de 100 mil vezes e (d) 6 horas após o tratamento com ZrO_2 , com aumento de 42 mil vezes.	84
Figura 39- Microscopia eletrônica de varredura de <i>E.coli</i> (a) tempo zero, com aumento de 15 mil vezes; (b) 2 horas, com aumento de 33 mil vezes; (c) 4 horas, com aumento de 20 mil vezes e (d) 6 horas, com aumento de 10 mil vezes, após o tratamento com $ZrO_2:Ag$ 10%.	86
Figura 40- Cinética do crescimento de <i>S.aureus</i> MSSA na presença de (a) Z; (b) ZAg1; (c) ZAg10 (concentrações de 0,25 mg/ml a 2 mg/ml. Bactérias foram cultivadas, sob agitação, à 37°C por 6h. (d) Determinação da porcentagem de inibição bacteriana após 6h de tratamento com as nanopartículas na concentração de 2mg/ml (teste t-pareado, n=4, * $p < 0,1$; *** $p < 0,001$).	88
Figura 41- Cinética do crescimento de <i>S.aureus</i> MRSA na presença de (a) Z; (b) ZAg1; (c) ZAg10 (concentrações de 0,25mg/ml a 2mg/ml. Bactérias foram cultivadas, sob agitação, a 37°C por 6h. (d) Determinação da porcentagem de inibição bacteriana após 6h de tratamento com as nanopartículas na concentração de 2mg/ml (teste t-pareado, n=4, $p > 0,03$).	89

- Figura 42- Microscopia eletrônica de varredura de *S.aureus* MRSA (a) tempo zero, com aumento de 27 mil vezes; (b) 2 horas, com aumento de 14 mil vezes; (c) 4 horas, com aumento de 40 mil vezes e (d) 6 horas, com aumento de 25 mil vezes, após o tratamento com ZrO₂. 90
- Figura 43- Microscopia eletrônica de varredura de *S. aureus* MRSA (a) tempo zero, com aumento de 27 mil vezes; (b) 2 horas, com aumento de 15 mil vezes; (c) 4 horas, com aumento de 32 mil vezes e (d) 6 horas, com aumento de 43 mil vezes, após o tratamento com ZrO₂:Ag 10%. 91
- Figura 44- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das bactérias antes do tratamento com as nanopartículas. (a) Imagem da *E. coli* com aumento de 15 mil vezes. (b) Imagem da *S. aureus* MRSA com aumento de 27 mil vezes..... 94
- Figura 45- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (a) *E. coli* com nanopartículas de ZrO₂:Ag 10% antes de incubar, imagem com aumento de 12 mil vezes. (b) *E. coli* com ZrO₂ após 2h de incubação, imagem com aumento de 25 mil vezes. (c) *E. coli* com ZrO₂ e Ag após 6h de incubação, imagem com aumento de 20 mil vezes. (d) Detalhe de uma *E. coli* com ZrO₂ após 6h de incubação, imagem com aumento de 60 mil vezes..... 95
- Figura 46- Bactéria *E. coli* com nanopartículas de ZrO₂:Ag10% e esquema ilustrativo de inativação bacteriana..... 96
- Figura 47- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (a) *S.aureus* MRSA imagem com aumento de 25 mil vezes, antes de incubar. (b) *S.aureus* com nanopartículas de ZrO₂ com 2h de tratamento, imagem com aumento de 15 mil vezes. (c) *S.aureus* com nanopartículas de ZrO₂ após 4h de incubação, imagem com aumento de 100 mil vezes. (d) *S.aureus* com nanopartículas de ZrO₂ após 6h de incubação, imagem com aumento de 45 mil vezes. 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dependência da região da banda de ressonância plasmônica em nanopartículas de prata com a respectiva morfologia ⁸¹	37
Tabela 2- Reagentes utilizados para síntese de ZrO ₂	52
Tabela 3- Composição e nomenclatura das amostras sintetizadas.	52
Tabela 4-Parâmetros utilizados e valores encontrados através da Equação de Scherrer.....	71
Tabela 5- Dados referentes às etapas da decomposição térmica das nanopartículas.	80
Tabela 6- Valores do <i>band gap</i> do ZrO ₂ e da banda de <i>plasmon</i> da prata obtidos através dos espectros de reflectância difusa para os materiais Z, ZAg1 e ZAg10.	82
Tabela 7- Porcentagem de inibição bacterina das nanopartículas ZrO ₂ , ZrO ₂ :Ag 1% e ZrO ₂ :Ag 10% nas concentrações ensaiadas de 2 mg/ml.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMH Agar Mueller Hinton (meio de cultura a base de proteína)
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DRX Difração de Raios X
- E. coli Escherichia Coli*
- EDX Espectroscopia de raios X por dispersão de energia
- ETE Estação de Tratamento de Esgotos
- FTIR Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
- FWHM Largura meia altura
- MEV Microscopia Eletrônica de Varredura
- MTT Brometo de 3-(4,5 dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido
- MSSA *Staphylococcus aureus* sensível à metilina
- MRSA *Staphylococcus aureus* resistente à metilina
- OMS Organização Mundial de Saúde
- PBS Solução Salina Tamponada
- PDI Inativação Fotodinâmica
- POA Método do Peróxido Oxidante
- S. aureus Staphylococcus aureus*
- TEM Microscopia Eletrônica de Transmissão
- TG Termogravimetria
- UV Ultravioleta
- UV-Vis Espectrofotometria na Região do UV-Vis
- ZrO₂ Dióxido de Zircônio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Considerações Gerais	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	24
2.1 Nanopartículas	24
2.2 Dióxido de Zircônio – ZrO ₂	28
2.2 Prata: características e aplicações	30
2.4 Ressonância Plasmônica de Superfície	34
2.5 Síntese Hidrotermal	38
2.6 Resistência Microbiana	41
2.7 <i>Escherichia coli</i>	43
2.8 <i>Staphylococcus aureus</i>	45
2.9 Mecanismo de inibição da atividade bacteriana	47
3. OBJETIVOS	51
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	52
4.1 Síntese de ZrO ₂	52
4.2 Método do Peróxido Oxidante (OPM) com posterior tratamento hidrotérmico. ...	53
4.4 Biotestes	57
5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	64
5.1 Difração de Raios X (DRX)	64
5.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	65
5.3 Análise Térmica: Termogravimetria - TG	65
5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	66
5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	66
5.6 Espectroscopia na Região do UV-Vis.....	67
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
6.1 Caracterização estrutural por Difração de Raios X	68

6.2 Caracterização Microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	72
6.3 Caracterização Microestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	74
6.4 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	77
6.5 Caracterização por Termogravimetria (TG)	79
6.6 Caracterização por Espectroscopia na região do UV-VIS	80
6.7 Avaliação Antimicrobiana por Cinética de Crescimento e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	83
7. CONCLUSÃO	101
Próximas etapas	103
8. REFERÊNCIAS	104

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A contaminação por microrganismos pode causar diversas complicações para a população mundial, principalmente se estiver em equipamentos médicos, cirúrgicos, odontológicos, medicamentos, produtos de higiene e de cuidados com a saúde, sistemas de purificação de água, tecidos, embalagens e estocagem de alimentos¹⁻⁶.

Nos últimos anos, o aumento de doenças infecciosas vem preocupando as economias globais e também a saúde pública. O crescimento populacional e a urbanização, juntamente com o precário abastecimento de água e higiene ambiental são as principais razões para o aumento do surto de agentes patogênicos infecciosos¹. A transmissão destes agentes para a população mundial tem causado surtos de doenças, tais como a gripe (A / H₁N₁), diarreia (*Escherichia coli*), infecções (*Staphylococcus aureus*), cólera (*Vibrio Cholera*), entre outras, em todo o mundo^{3, 4}. Consequentemente o meio ambiente hospitalar pode proporcionar focos de contato e de transmissão de agentes patogênicos².

O meio ambiente hospitalar, incluindo o ar, a água e as superfícies inanimadas que cercam o paciente, guarda íntima relação com as infecções hospitalares. Embora as principais causas de infecção hospitalar estejam relacionadas com o doente susceptível à infecção e com os métodos-diagnósticos e terapêuticos utilizados não se pode deixar de considerar a parcela de responsabilidade relacionada aos padrões de assepsia e de higiene do ambiente hospitalar².

Outro foco propício às infecções são as águas residuais, chamadas de esgoto, pois são uma das principais fontes de matéria orgânica que pode contaminar as águas naturais¹. O esgoto doméstico, comercial ou industrial contém aproximadamente 99% de água e a fração restante apresenta sólidos orgânicos em

suspensão e dissolvidos além de diversos microrganismos⁴. Os microrganismos patogênicos estão presentes nas fezes de indivíduos e animais infectados e podem transmitir diversas doenças, portanto são considerados indicadores de poluição os coliformes totais e fecais presentes nas fezes de animais⁵.

Entre os microrganismos patogênicos destacam-se a *Salmonella typhi* e *paratyphi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* os enterovírus, o vírus da hepatite A e os protozoários³. A presença de qualquer desses organismos em corpos de água indica a probabilidade de que outros organismos patogênicos também estejam presentes, caracterizando uma contaminação por esgotos.

Atualmente, existem inúmeros processos para o tratamento de esgotos, individuais ou combinados. A decisão pelo processo a ser empregado deve levar em consideração principalmente as condições do curso de água receptor (estudo de autodepuração e os limites definidos pela legislação ambiental) e as características do esgoto bruto a ser lançado; o tratamento nas Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) sempre envolve processos físicos, químicos e biológicos⁶.

A contaminação das águas naturais pode ser física, onde a contaminação não reage com a água, mas afeta o ecossistema, química onde ocorre a alteração da composição da água, já que as substâncias reagem com a água, pode ser ainda biológica, onde microrganismos patogênicos podem afetar o ecossistema⁶.

A necessidade de identificar agentes inibidores de crescimento adequados para a incapacitação ou morte dos microrganismos patogênicos tem atraído interesse de pesquisadores na tentativa de desenvolver nanomateriais que apresentem melhor ação antimicrobiana para atuar no tratamento de microrganismos⁷.

Estudos e aplicações com nanomateriais vêm crescendo nas últimas décadas, devido à sua potencialidade de aplicação bem como suas propriedades únicas. Essa classe de materiais vem ganhando destaque dentro da área de ciência dos materiais. As aplicações estão diretamente ligadas com o método de síntese utilizado, onde é possível controlar a fase cristalográfica, morfologia e tamanho da partícula^{8,9}.

Materiais formados por óxidos e combinados com metais como Ag, Au, Al, Pd, entre outros podem potencializar as propriedades físicas, químicas e biológicas desses materiais, tais como ópticas, catalíticas, magnéticas, fungicidas e bactericidas^{10,11}. Exemplos de nanomateriais à base de óxido de metal incluem, semicondutores e isolantes, tais como TiO₂, ZnO, ZrO₂, SnO₂, WO₃, Al₂O₃ e Fe₃O₄, ganharam destaque devido à sua estabilidade, baixo custo de produção, atividade biológica e catalítica.⁹⁻¹³

Várias rotas de sínteses têm sido utilizadas na produção de nanomateriais à base de óxidos com excelentes propriedades, como síntese sol-gel, método hidrotérmico, método de micro-ondas-hidrotérmico, sonoquímica,^{8-10,13}. Entre uma variedade de abordagens, a utilização do método hidrotérmico para a síntese de nanomateriais à base de óxido demonstrou ser um método simples, rápido, alternativo e de baixo custo.

Com base no exposto, este trabalho tem como proposta a síntese e caracterização de nanopartículas de ZrO₂ e ZrO₂ com Ag por rota de síntese hidrotérmica, além da avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus* visto que as mesmas são as bactérias que mais contaminam os seres humanos por meio das águas e também por meio de ambientes hospitalares.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanopartículas

Uma das características mais importantes das nanopartículas é o tamanho, a palavra nano proveniente do grego *nanos*¹⁴, com o significado de anão, ao qual denota a ordem de 10^{-9} m. A nanotecnologia teve seu início com a palestra ministrada por Richard Feynman com o título “Há muito espaço lá embaixo” (*There’s a Plenty of Room at the Bottom*), em 1959, onde sugeriu que um dia seria possível manipular átomos e moléculas individualmente¹⁵. Em 1986, o físico Eric Drexler lançou o livro com o título “*Engines of Creation, The Coming of Nanotechnology*”, confirmando assim a ideia prevista por Feynman¹⁶. Outro marco da nanotecnologia ocorreu quando Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, cientistas do laboratório da IBM em Zurique–Suíça, desenvolveram o microscópio de varredura por tunelamento eletrônico (*scanning tunneling microscope*-STM), no qual foi possível obter imagens de átomos em uma superfície, na década de 1980¹⁷.

Existem diversas técnicas para produção de nanomateriais, normalmente divididas em duas categorias: “*Top-down*” e “*Bottom-up*”¹⁸. A técnica “*Top-down*” envolve manipulação de unidades maiores, como um bloco, por exemplo, onde o mesmo é manipulado até chegar a um formato desejado, enquanto “*Bottom-up*” envolve a utilização de subunidades pequenas, átomos, moléculas ou partículas para produzir uma estrutura maior. A Figura 1, ilustra os processos “*Top-down*” e “*Bottom-up*”.

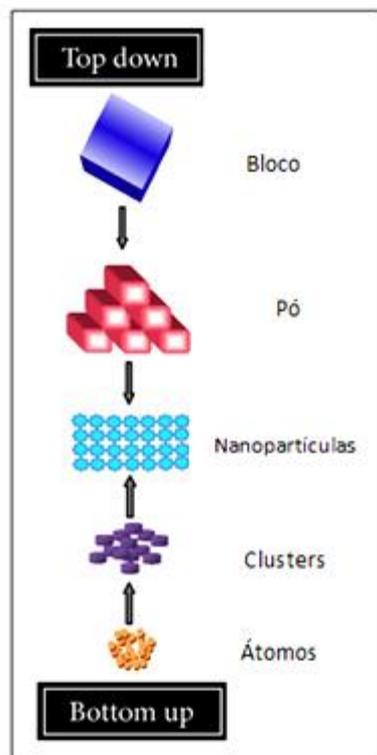


Figura 1- Ilustração dos processos “Top-down” e “Bottom-up” de nanopartículas. (Fonte: Adaptado de Madhumitha et al., 2013).

Nos últimos anos o aumento das pesquisas com nanopartículas vem causando uma nova revolução na indústria, já que as vantagens de aplicações incluem desde a medicina até produtos de consumo, como cosméticos, equipamentos esportivos, fármacos, tecnologia da informação, biodispositivos, bioenergia e conversão de energia solar^{19,20}.

A Figura 2 mostra o progresso do número de nanomateriais produzidos mundialmente do ano de 2005 até 2013²¹.

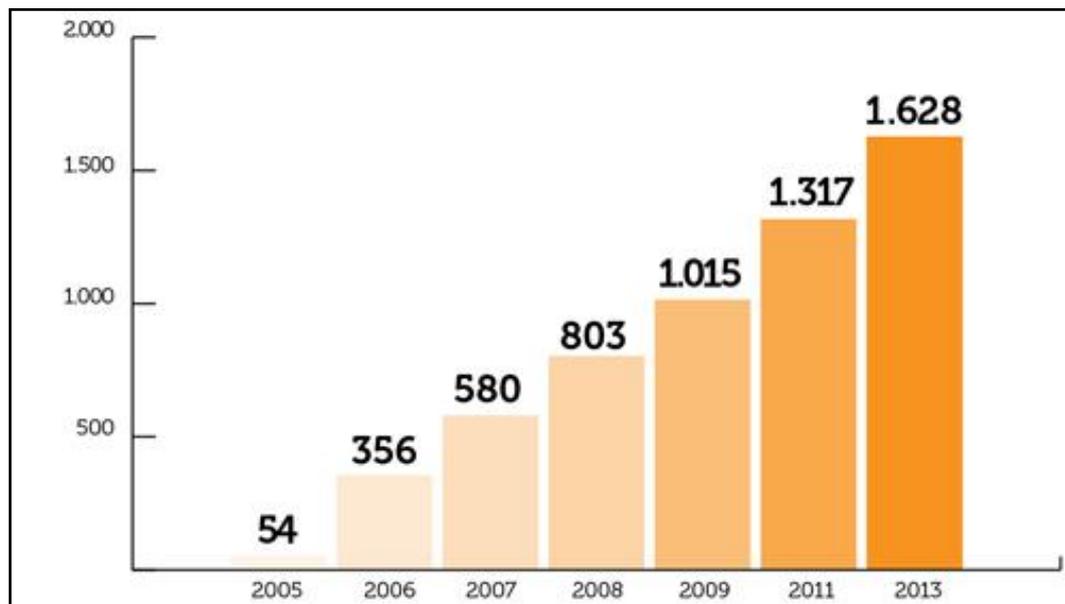


Figura 2- Número de nanomateriais no mercado mundial. (Fonte: Riccardi et al., 2015).

Nanomateriais podem oferecer soluções aos desafios ambientais nas áreas de catálise e tratamento de água. Este interesse em desenvolvimento de nanomateriais deve ser acompanhado de métodos de sínteses não poluentes ao meio ambiente, ou seja, métodos que visem à redução de resíduos perigosos e/ou tóxicos durante o processo de produção, integrando progressivamente com desenvolvimentos modernos na ciência e indústria.

A produção de nanomateriais está relacionada ao método de síntese, devido à dificuldade em controlar a morfologia e o tamanho das partículas, entretanto podem ser modificados para uma melhor eficiência e para facilitar as suas aplicações em diferentes campos tais como biociência e medicina ^{8,22,23}. As propriedades das nanopartículas estão diretamente ligadas ao tamanho e a morfologia das partículas⁹⁻¹⁵.

O estudo de nanomateriais não é trivial, uma vez que um material com a mesma composição pode apresentar características físicas, químicas e biológicas diferentes apenas modificando características como tamanho, organização estrutural cristalina e morfológica ^{8,24,25}. Em escala nanométrica, geralmente de 1 a 100 nm, o conjunto de átomos ou partículas apresentam características peculiares que são

obtidas em função do modo como a matéria é organizada a partir de estruturas de dimensões nanométricas.

Nanopartículas de ZrO_2 tem mostrado grande destaque na área de materiais avançados, atraindo muito interesse de pesquisadores em seus vários campos de atuação^{9,26}. ZrO_2 apresenta excelentes propriedades, tais como a estabilidade química, resistência mecânica, elétrica e propriedades óticas²⁵. As aplicações mais promissoras são como cerâmicas estruturais partes de motores de pistão, pás de turbinas, ferramentas de corte, peças de implantes ortopédicos e uso na odontologia, além do uso como eletrólitos sólidos (sensores de oxigênio, células de combustível), supercapacitores dielétricos, fotoluminescente e catalisadores²⁶⁻³¹. Quando determinados metais são suportados sobre ZrO_2 , tal como Fe, Ag, Au e Al, nanopartículas podem apresentar propriedades únicas, tais como bactericida e fungicida^{11,32}.

Dentre os metais citados acima, a Ag vem ganhando destaque, pois possui propriedades óticas, eletrônicas e antibacterianas exclusivas²². Nanopartículas de Ag têm sido amplamente utilizados em biosensoriamento, fotônica, eletrônica e aplicações antimicrobianas, entre outros^{33,34}. A forte atividade antimicrobiana vem sendo muito estudada, devido ao desenvolvimento de produtos nanoparticulados como, recipientes de armazenamento de alimentos, antissépticos sprays, cateteres³⁵.

A atividade bactericida de nanopartículas de Ag depende do seu tamanho, de sua morfologia, de superfície e de revestimentos³⁶. Portanto, o desenvolvimento de nanopartículas de Ag precisa de características morfológicas e físico-químicas bem controladas. Recentemente, as nanopartículas de Ag vêm ganhando papel promissor como agentes anticancerígenos³⁵.

2.2 Dióxido de Zircônio – ZrO₂

O ZrO₂ é um óxido metálico e um material amplamente utilizado na tecnologia cerâmica²⁶. Devido à sua natureza de semicondutor possui os valores de bandgap (E_g) entre 3,25 e 5,1 eV, dependendo da morfologia e do método de preparação do material³⁷. O Zr é o 18.^o elemento mais abundante na crosta terrestre, sendo encontrado normalmente como zirconato, ZrSiO₄, e em menor quantidade como ZrO₂, apresenta propriedades físico-químicas únicas, levando-o assim a aplicações variadas na indústria e no meio acadêmico³⁸.

Suas propriedades principais são a estabilidade térmica e elevada área superficial^{37,39}. Possui alto ponto de fusão de 2716°C e baixa condutividade térmica, além de ser resistente à corrosão²⁷. Sua utilização é vasta, pois pode ser utilizado em pigmentos, materiais cerâmicos e piezos eletrônicos, sensores de gás, catalisadores, bactericida^{24, 29,32,34}. As nanopartículas de ZrO₂ apresentam certas vantagens, tais como granulometria uniforme e alta resistência mecânica⁴⁰. O dióxido de zircônio pode ser obtido na escala nanométrica e com diversas morfologias, dependendo da rota de síntese utilizada.

São conhecidas as três estruturas morfológicas do ZrO₂, a monoclinica estável até 1170°C, a tetragonal estável de 1170°C a 2370°C e a cúbica estável acima de 2370°C⁴¹. A Figura 2 ilustra o polimorfismo do ZrO₂.

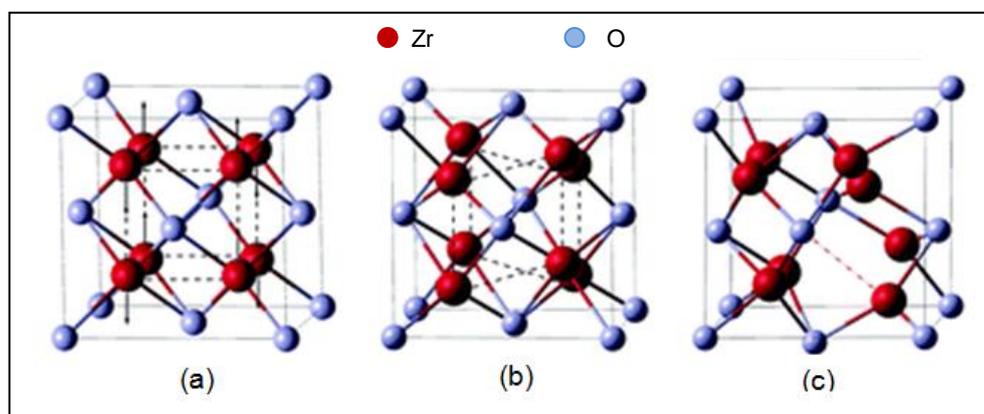


Figura 3- Polimorfismo do ZrO₂. (a) Estrutura cúbica; (b) estrutura tetragonal e (c) estrutura monoclinica. (Fonte: Adaptado de Gallino et al., 2011).

O polimorfismo do ZrO_2 é influenciado pelo tamanho das partículas e pelo método de preparação^{9,40}. As estruturas tetragonal e cúbica podem ser estabilizadas a temperatura ambiente com adição de cátions como Ca^{2+} e Mg^{2+} .⁴¹ A adição desses íons desequilibra a carga elétrica da rede pela substituição do cátion Zr^{4+} , à qual é compensada pela criação de vacâncias de oxigênio. Tais alterações na estrutura do ZrO_2 aumentam a estabilidade das fases cristalinas, propriedade bastante estudada devido às suas aplicações em cerâmicas e eletrólitos sólidos.⁴²

Karunakaran e Senthilvelan⁴³ apresentaram a atividade catalítica do ZrO_2 na oxidação da anilina para azobenzeno, a formação do produto é maior com irradiação de luz UV a 254 nm. Óxidos como TiO_2 , V_2O_5 , ZnO , Fe_2O_3 , CdO e Al_2O_3 também foram testados e ZrO_2 apresentou maior eficiência comparado aos outros fotocatalisadores estudados, no entanto, ZrO_2 perde a sua eficiência sobre os outros óxidos sobre irradiação de luz UV no comprimento de onda de 365 nm e com a luz solar.

Óxidos metálicos vêm sendo desenvolvidos para utilização como sensores de gás, entre esses óxidos destaca-se o ZrO_2 como sensor de oxigênio para controlar a relação ar-combustível de motores de combustão interna. O modelo proposto por Brailsford⁴⁴ e colaboradores envolve fenômenos físicos e químicos, onde o eletrodo de ZrO_2 sensível a oxigênio é exposto a uma mistura de gás, as moléculas que atingem este eletrodo são adsorvidas e reage através da reação eletroquímica de um átomo de oxigênio adsorvido e uma vacância de oxigênio na zircônia, segunda a reação⁴⁴:



V_O^{**} representa a vacância de oxigênio carregado duplamente e O_o é um átomo de oxigênio do óxido.

Dentre diversas aplicações, compósitos a base de ZrO_2 estão sendo utilizados na odontologia, devido às suas excelentes propriedades, como boa resistência mecânica e tenacidade à fratura.²⁸ A introdução de Al_2O_3 nessa composição é interessante, pois proporciona à composição uma alta dureza, boa biocompatibilidade e resistência ao desgaste.³¹

O avanço no desenvolvimento de ZrO_2 como nanomaterial se deve às rotas de síntese, combinação com diversos metais, biomoléculas, bactericida, entre outros, como já mencionado neste trabalho. Porém, ainda existe muito a se pesquisar e padronizar, principalmente no âmbito biológico, tornando evidente a importância de continuar os trabalhos com ZrO_2 .

2.3 Prata: características e aplicações

A Prata (Ag) é um metal de número atômico 47, possui estrutura cristalina cúbica e alto ponto de fusão e ebulição de aproximadamente 900°C e 2200°C respectivamente¹⁹. Características importantes desse metal são a sua baixa reatividade e resistência à corrosão, devido ao seu potencial de redução padrão positivo e, por isso, não é vulnerável à oxidação em condições normais. Quando o metal é combinado com os outros elementos da tabela periódica, apresenta número de oxidação (+1)⁴⁵.

O uso e a importância da prata são abrangentes e vem sendo investigados desde os primórdios dos tempos, devido às suas aplicações distintas, como confecções de espelho, moeda, painéis, uso em eletrônica, fotografia e bactericida¹⁹.

Com o surgimento e crescimento de organismos microbianos resistentes a múltiplos antibióticos e a prioridade permanente dos cuidados com a saúde, muitos pesquisadores têm tentado desenvolver novos reagentes antimicrobianos, eficazes e de baixo custo. Com isso a medicina vem comprovando que a prata tem a capacidade de destruir diversos organismos patogênicos como bactérias e fungos, ou seja, tais problemas e necessidades levaram ao ressurgimento no uso de antissépticos à base de Ag que pode ser ligada à atividade de amplo espectro e muito menor propensão para induzir resistência microbiana do que os antibióticos⁴⁵.

Os efeitos antibacterianos de sais de Ag são utilizados desde a antiguidade, e a Ag é atualmente utilizada para o controle bacteriano em uma variedade de

aplicações, incluindo cirurgia dentária, cateteres, desinfetantes de água e filtros de ar, tecidos, produtos cosméticos, tratamento de queimaduras e feridas^{46,47}. Compostos a base de Ag, bem como seus íons são altamente tóxicos para os microrganismos, mostrando fortes efeitos bactericidas em 12 espécies de bactérias, entre elas a *E. coli*⁴⁸.

Nos hospitais, a infecção é a complicação mais comum e causa de morte em pacientes. Portanto, os efeitos antibacterianos de nanopartículas de Ag estão sendo estudados em várias aplicações médicas, como cateteres de plástico revestido com Ag para evitar a formação de biofilme de *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Candida albicans*, e *Pseudomonas aeruginosa* e também tem mostrado significativa atividade antimicrobiana *in vitro*²⁰.

Em seu trabalho Sondi e Sondi⁴⁹ relataram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de Ag inibindo o crescimento de *E. coli* em placas de ágar. As células bacterianas foram danificadas e destruídas juntamente com o acúmulo de Ag na membrana da bactéria.

Morones e colaboradores⁵⁰ utilizaram diferentes tipos de bactérias Gram-negativas para testar a atividade antibacteriana de nanopartículas de Ag com tamanhos entre 1-100 nm e relataram que as atividades bactericidas de nanopartículas com tamanho entre 1-10 nm aderem à superfície da membrana celular e agridem drasticamente funções como permeabilidade e respiração, além de penetrar no interior da bactéria e destruí-la.

Em seu estudo Kim e colaboradores²² testaram a mesma metodologia para as bactérias Gram negativa (*E.coli*) e Gram positiva (*S.aureus*) para investigar a atividade bactericida de nanopartículas de Ag. Os estudos revelaram que a *E. coli* é inibida com uma concentração de nanopartículas de Ag 3,3 nM (10^{-9} mol/dm³ ou 10^{-6} mol/m³), já a concentração inibitória mínima de *S. aureus* é de 33 nM, ou seja, dez vezes maior.

Além das bactérias, os fungos também são responsáveis por causar infecções em pacientes já doentes. Nanopartículas de Ag vêm sendo estudadas como antifúngicos. Kim e colaboradores⁵¹ estudaram as atividades antifúngicas de nanopartículas de Ag para as espécies de fungos *Trichophyton mentagrophytes* (*T.*

mentagrophytes) e *C. albicans*. Os resultados mostraram 80% de inibição dos fungos a partir da concentração de 1 a $7\mu\text{g ml}^{-1}$. Possivelmente a atividade fungicida foi eficiente devido à perturbação da estrutura da membrana celular, inibindo assim o processo normal de crescimento do fungo devido à destruição da membrana celular.

Nanopartículas de Ag também vêm sendo estudadas para desinfecção de água potável. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), pelo menos um bilhão de pessoas não têm acesso seguro à água⁵². A contaminação da água potável e o surto crescente de doenças transmitidas pela água são a principal causa de morte em muitos países em desenvolvimento, portanto há uma enorme necessidade de tratamentos eficientes para controlar a contaminação microbiana da água e diminuir o número de doenças transmitidas pela mesma.

Nanopartículas de prata podem ser utilizadas em desinfecção da água com vírus e/ou bactérias. Zhang et al.⁵³ relataram um filtro que possui uma membrana de polietersulfona (PES) com nanopartículas de Ag para purificação de água. Os resultados mostraram que o filtro possui propriedade bactericida contra *E. coli* e *S. aureus*, com eficiência de 99,9 e 99,8%, respectivamente.

A aplicação de nanopartículas de Ag está diretamente ligada à morfologia e o tamanho das partículas. A Figura 5 ilustra uma imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) de nanopartículas de Ag com diferentes formas e com tamanho de 10 nm ¹⁹.

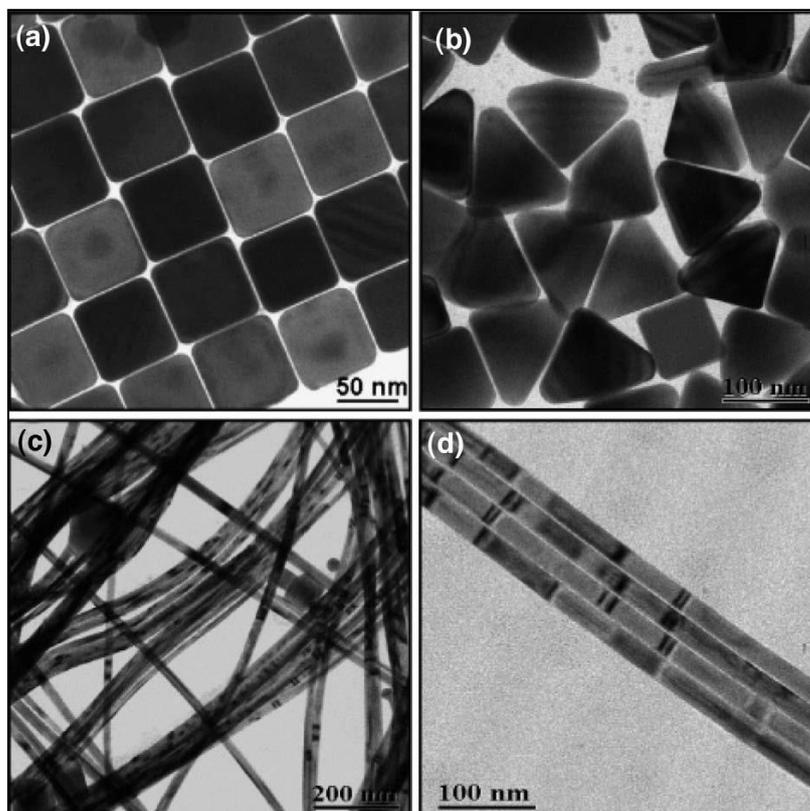


Figura 4- TEM de nanopartículas de Ag: (a) cubos, (b) triângulos, (c) nanofios, (d) nanofios alinhados. (Fonte: Behra et al., 2013).

As nanopartículas de Ag com morfologias de cubos, triângulos, nanofios e nanofios alinhados apresentam ação biocida. A eficiência das partículas está diretamente ligada ao método de aplicação escolhido e à concentração utilizada.

As mesmas propriedades e características que tornam as nanopartículas de Ag tão atrativas, como pequeno tamanho, morfologia e alta área superficial, podem também ser responsáveis por desequilíbrios ambientais e efeitos nocivos aos organismos vivos, resultando em impacto negativo tanto para o ambiente quanto à saúde pública. Apesar de a toxicidade do metal Ag ser conhecida, bem como de outros metais pesados, não existe evidência de que o homem é afetado pelas nanopartículas contidas em produtos comercializáveis⁵⁴.

As condições do meio ambiente, como pH, força iônica e a carga elétrica, influenciam na estabilidade das nanopartículas e, conseqüentemente no tamanho e nos mecanismos de toxicidade, uma vez que nanopartículas de diferentes tamanhos exercem toxicidades diferentes^{20,54}.

Entretanto, não há padronização internacional quanto à toxicidade das nanopartículas em relação ao tamanho, os estudos de nanotoxicologia ainda são muito controversos na literatura e variam de acordo com o tipo celular estudado, o tipo de revestimento da nanopartícula e, principalmente, com o tamanho⁵⁴.

2.4 Ressonância Plasmônica de Superfície

Ressonância plasmônica de superfície são oscilações coletivas dos elétrons livres em superfícies metálicas. Essas oscilações ocorrem quando a radiação eletromagnética com comprimento de onda específico interage com uma nanopartícula para criar oscilações coerentes dos elétrons livres na superfície e podem dar origem às cores intensas das nanopartículas em solução/dispersão^{58,59}.

Todos os metais apresentam a propriedade de exibirem a ressonância plasmônica em determinadas condições, porém, a série ouro-prata-cobre apresenta o efeito de forma mais acentuada, apresentando na região do ultravioleta, do visível e do infravermelho próximo, bandas intensas referentes aos plasmons de superfície⁶⁰. Nesses metais, as bandas dos plasmons de superfície são intensas e largas e estão presentes nos espectros de absorção das nanopartículas com tamanho acima de 2 nm. No caso de nanopartículas menores, efeitos quânticos tornam-se mais acentuados e a presença da banda de plasmons de superfície não é detectada.

A intensidade, formato e posição das bandas associadas à ressonância plasmônica de superfície depende de diversos fatores, como a constante dielétrica do meio no qual a nanopartícula está inserida, as interações eletrônicas entre as nanopartículas e os ligantes estabilizantes, o tamanho, a morfologia e a monodispersidade da nanopartícula⁶⁰.

Portanto, a ressonância plasmônica de superfície pode ser explicada pela oscilação coletiva dos elétrons livres nas superfícies metálicas, causando um deslocamento da nuvem eletrônica sob o efeito de um campo elétrico, o qual leva à

criação de cargas superficiais, sendo negativa onde a nuvem está concentrada em determinado momento, e positiva onde há falta de concentração da nuvem eletrônica. O efeito desse fenômeno é observado na Figura 5⁶⁰.

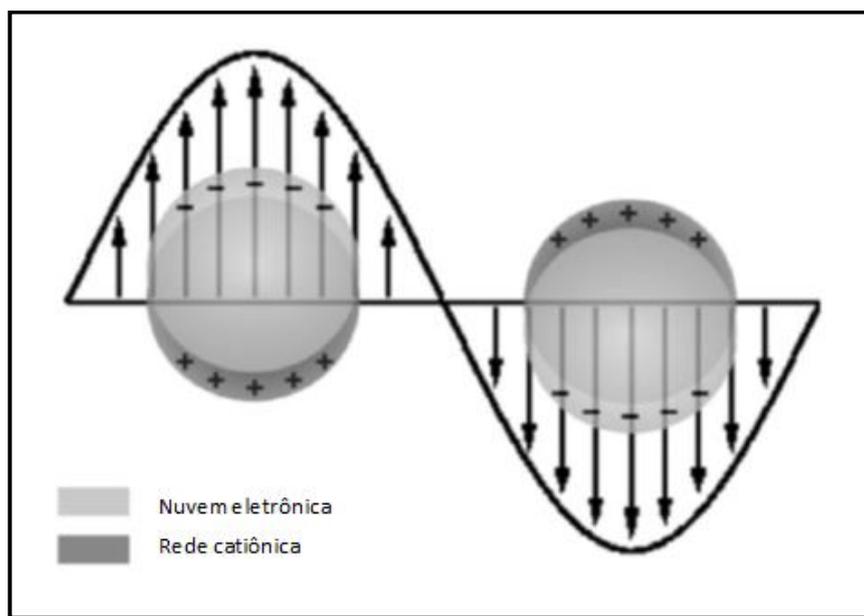


Figura 5- Descrição esquemática do deslocamento da nuvem eletrônica em nanopartículas sob o efeito de uma onda eletromagnética. (Fonte: Adaptado de Moores et al., 2006).

Uma das consequências desse fenômeno é que a absorção e o espalhamento seletivo dos fótons permite que as propriedades óticas das nanopartículas sejam monitoradas por métodos espectroscópicos convencionais.

Como a posição da banda referente aos plasmons de superfície é altamente dependente de propriedades facilmente controláveis como tamanho e morfologia, a alteração dessas propriedades permite que essa banda possa ter sua posição modificada ao longo de uma ampla faixa espectroscópica^{60,61} e com isso, possibilitando uma grande diversidade de aplicações, como por exemplo:

1. Excitação na banda plasmon de nanobastões de ouro e em nanopartículas de sulfeto de cobre (ambos com absorção na região do infravermelho próximo) para terapia fototérmica de células cancerígenas^{62,63};

2. Aumento na atividade fotocatalítica de nanotubos de TiO_2 através da deposição de nanopartículas de cobre e a potencialidade deste material em aplicações como células solares e material fotodegradante de poluentes orgânicos. O estudo demonstra que o aumento na atividade fotocatalítica se deve a excitação dos plasmons de superfície da nanopartícula de cobre⁶⁴;
3. Utilização de nanopartículas de cobre como sondas fluorescentes para detecção de DNA⁶⁵;
4. Aplicação como eletro-catalizadores na redução eletroquímica de peróxido de hidrogênio de nanopartículas de ouro e prata estabilizados em porfirinas⁶⁶;
5. Utilização das propriedades plasmônicas de nanoplaquetas triangulares de prata como sensor para a determinação colorimétrica de peróxido de hidrogênio⁶⁷;
6. Desenvolvimento de dispositivos eletrocromáticos apropriados para a aplicação como dispositivos de visualização baseados na alteração da posição da banda plasmônica de nanopartículas de prata de acordo com diferentes voltagens⁶⁸;
7. Utilização de nanobastões de ouro como sondas para a detecção de RNA⁶⁹;
8. Utilização de nanobastões de prata em conjunto com o óxido de grafeno reduzido para a construção de uma plataforma analítica para a detecção e quantificação de íons iodeto em solução⁷⁰;
9. Dependência da região de absorção da banda plasmônica de nanopartículas de prata com diferentes morfologias na degradação fotocatalítica do 4-aminotiofenol e do 4,4'-dimercaptoazobenzeno⁷¹.

Sendo assim, diversas aplicações biológicas e tecnológicas de alto impacto na sociedade são possíveis, devido à propriedade da ressonância plasmônica e da capacidade de modificar a região de absorção da banda plasmon das nanopartículas com a alteração de propriedades facilmente manipuláveis, como o tamanho e morfologia.

Neste contexto e devido às diversas possíveis aplicações tecnológicas, o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície em nanopartículas de prata tem sido extensamente estudado por diversos grupos, havendo atualmente, um grande

entendimento teórico e experimental da dependência das bandas plasmons de nanopartículas de prata com a morfologia e o tamanho^{58,61,72-81}. Uma característica apresentada por nanopartículas de prata que a torna a mais importante para aplicações plasmônicas é o fator de qualidade dos plasmons de superfície, o qual é o maior entre todas as nanopartículas metálicas na faixa espectral de 300 a 1200 nm e está diretamente relacionada com a força dos plasmons de superfície, uma propriedade de extrema importância para viabilizar a aplicação do sistema⁸¹.

A Tabela 1 lista a região de absorção das principais morfologias de nanopartículas de prata observadas.

Tabela 1- Dependência da região da banda de ressonância plasmônica em nanopartículas de prata com a respectiva morfologia⁸¹.

Morfologia	Região da banda de ressonância plasmônica / nm
Esfera	320-450
Cubo / cubo truncado	400-480
Tetraedro / tetraedro truncado	350-450
Octaedro / octaedro truncado	400-500
Barra	350-900
Esferóide	350-900
Bipirâmide quadrada	500-700
Decaedro	350-450
Fio / bastão	380-460
Placas e discos poligonais	350-1000
Estruturas ramificadas	400-1100
Estruturas ocas	380-800

2.5 Síntese Hidrotermal

Existem diversas metodologias para síntese de nanopartículas, entre os métodos destaca-se o hidrotérmico. A síntese hidrotérmica tem como vantagens a cristalização direta sem etapas de calcinação, granulometria uniforme e morfologia controlada, o baixo custo, além da utilização de reagentes de fácil eliminação e descarte, tendo em vista a importância de novas tecnologias que visam à preservação do meio ambiente ^{55,56}.

O método hidrotérmico pode ser definido como um processo de formação e crescimento de cristais por meio de reações químicas que ocorrem em um reator de aço inox fechado contendo uma solução aquosa que é aquecida acima da sua temperatura de ebulição, atingindo assim pressões superiores a 1 atm⁵⁵. Para a síntese são adicionados reagentes em soluções aquosas, géis ou suspensões que são denominados de precursores. Pode-se adicionar à solução mineralizadores com o intuito de alterar o pH do sistema e auxiliar a solubilização dos precursores bem como a cinética da reação. Para o controle da dispersão e da morfologia das partículas podem ser adicionados outros reagentes tais como surfactantes⁵⁶.

A água a temperaturas elevadas desempenha um papel essencial nas transformações de um material precursor, uma vez que propriedades como a constante dielétrica, densidade e viscosidade, são alteradas em tais condições⁵⁷. A água atua como um agente da reação, acelerando o processo cinético das reações de hidrólise. Com o aumento da temperatura, a solubilidade das espécies iônicas é aumentada e, com a baixa viscosidade da água, passam a ter maior mobilidade, permitindo a rápida formação dos núcleos, com alta uniformidade⁸². O controle preciso sobre as condições de síntese hidrotérmica, como temperatura, pH e concentração da solução precursora e alta pureza do produto final, vem ganhando prestígio na preparação de semicondutores nanoestruturados com as características desejáveis⁸³.

Quando se inicia o processo de nucleação do sistema, a concentração das partículas em solução diminui. A concentração diminui até valores abaixo de uma

concentração específica, quando a nucleação cessa e o processo de crescimento continua até atingir uma concentração de equilíbrio⁸³. Quando o núcleo é formado, o processo de crescimento se inicia imediatamente, com partículas maiores crescendo à custa das menores, esse processo é denominado *Ostwald ripening*, que reduz a energia superficial⁸⁴. Acima de uma concentração mínima, os processos de nucleação e crescimento ocorrem simultaneamente, mas em diferentes velocidades. A Figura 6 ilustra o esquema do processo de nucleação para a formação e crescimento de nanopartículas.

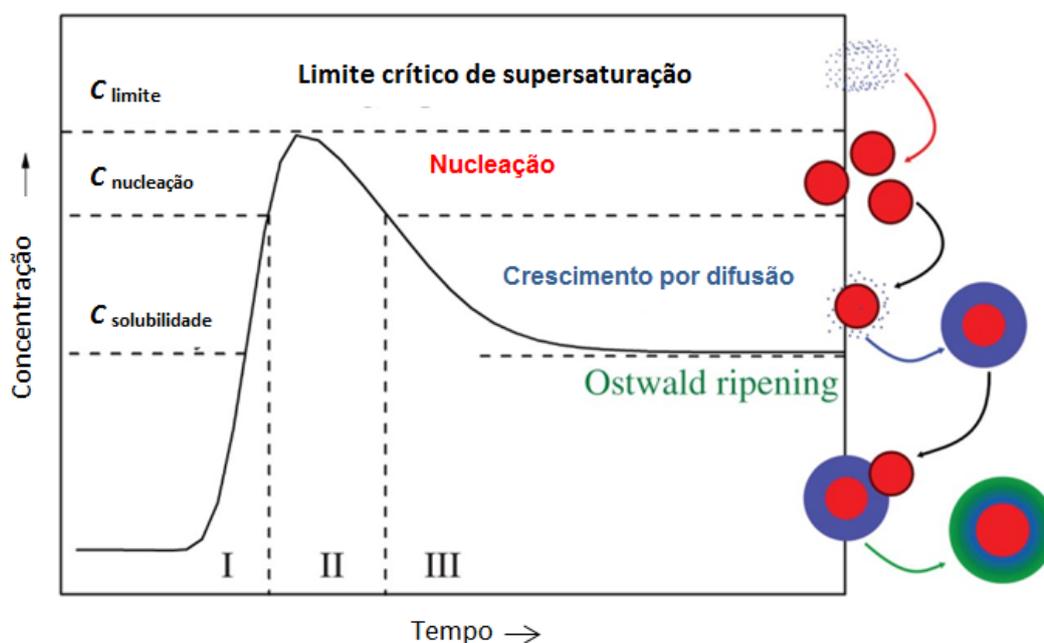


Figura 6- Ilustração esquemática do processo de nucleação e crescimento de nanopartículas. (Fonte: Adaptado de Róz et al., 2015).

Alguns trabalhos têm demonstrado também a ocorrência do fenômeno de coalescência orientada (*oriented attachment*) no crescimento de partículas em síntese hidrotérmica devido ao aumento de eventos de colisão interpartículas, mostrando que este fenômeno também deve ser considerado neste processo⁸³.

O reator hidrotérmico, também conhecido como autoclave é feito de aço inox com um copo de *Teflon*, para minimização de efeitos de ataque químico por parte da solução precursora. O sistema é aquecido externamente por uma resistência

elétrica diretamente ligada a um controlador de potência, que funciona acoplado a um termopar para controle de temperatura. Um manômetro permite a leitura e o controle da pressão do sistema, que pode assim operar em temperatura constante, a pressões elevadas por longos períodos de tempo. A Figura 7 ilustra o esquema do aparato do reator hidrotermal⁸⁵.

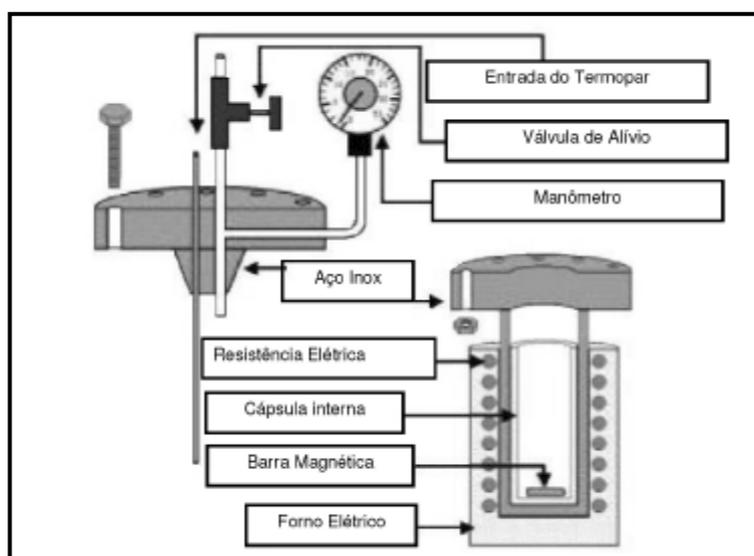


Figura 7- Esquema do aparato para reações hidrotermais. (Fonte: adaptado de Mourão et al., 2009).

David e colaboradores⁸⁶ descreveram a produção de nanopartículas de ZrO_2 nos tamanhos entre 2-7 nm, usando o método do peróxido oxidante (POA)/hidrotermal e variando o pH e a temperatura para estudo do tamanho da partícula. As análises de BET revelaram que as nanopartículas apresentaram elevada área superficial, com uma área de $511,23 \text{ m}^2/\text{g}$ e concluíram que essa área é proporcional ao tamanho das nanopartículas.

Devido à eficiência, baixo custo e utilização de reagentes menos agressivos ao meio ambiente, que hoje é chamada de “química verde”, o método de síntese hidrotérmico foi proposto neste trabalho, utilizando como precursor o Butóxido de Zircônio^{87,88}. A estrutura química do Butóxido de Zircônio está representada na Figura abaixo.

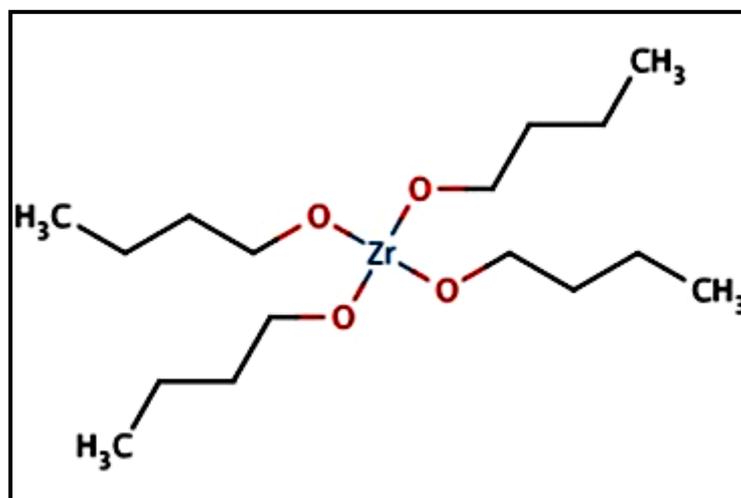


Figura 8- Estrutura química do Butóxido de Zircônio. (Fonte: adaptado de Mourão et al., 2009).

Este composto é um alcóxido metálico formado por uma cadeia orgânica, onde os oxigênios com carga parcial negativa estão ligados covalentemente ao átomo de zircônio, com carga parcial positiva, formando a estrutura acima⁸⁸.

2.6 Resistência Microbiana

Resistência microbiana se refere aos microrganismos resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos^{5,89,90,91,92,93}. A resistência é comprovada pelo crescimento de um microrganismo *in vitro* na presença de concentrações séricas de antimicrobianos, cujo crescimento não era de esperar nas condições ensaiadas, ou quando se mostram resistentes a duas ou mais classes de drogas que normalmente interfeririam em suas funções de crescimento e às quais seriam habitualmente sensíveis⁹⁴⁻⁹⁹.

A descoberta de antibióticos trouxe uma revolução na área médica desde o século XX^{5,100-106}. A penicilina descoberta em 1928 por Alexander Fleming foi a substância precursora para controlar infecções bacterianas até então fatais¹⁰⁷. Desde então, os antibióticos têm sido indispensáveis no tratamento de infecções

microbianas, fato este que contribuiu para o aumento da expectativa de vida humana¹⁰⁷. Porém, com o crescente número de microrganismos resistentes aos antibióticos, cientistas buscam encontrar tratamentos alternativos e eficientes para as infecções microbianas^{5,108}.

A utilização generalizada e muitas vezes indiscriminada desses antibióticos vem gerando problemas como⁹³:

- a) Elevado índice de mortalidade da população mundial relacionado às infecções causadas por microrganismos multirresistentes;
- b) Alteração na composição dos antimicrobianos que se tornam mais tóxicos para inativar os microrganismos resistentes a acabam afetando as células dos hospedeiros;
- c) Longos períodos de internação de pacientes com infecções e o aumento nos custos hospitalares e da saúde pública.

Com o passar do tempo, o uso intensivo dos antimicrobianos provocou o aparecimento de outros microrganismos resistentes, tais como: bactérias Gram-positivas e Gram-negativas^{5,93}. A bactéria *E.coli* é considerada o exemplo mais significativo de bactéria Gram-negativa e *S. aureus* de bactéria Gram-positiva^{93,108}.

Os termos Gram-positivo e Gram-negativo é em homenagem ao médico Dinamarquês Christian Gram, que desenvolveu em 1884 uns dos procedimentos mais importantes da microbiologia, o método de Coloração de Gram. O método separa a maioria das bactérias em Gram-positivas, que se coram em azul e as bactérias Gram-negativas, que se coram em vermelho⁹³.

As estruturas das bactérias Gram-positiva e Gram-negativa podem ser vistas na Figura 9⁹³.

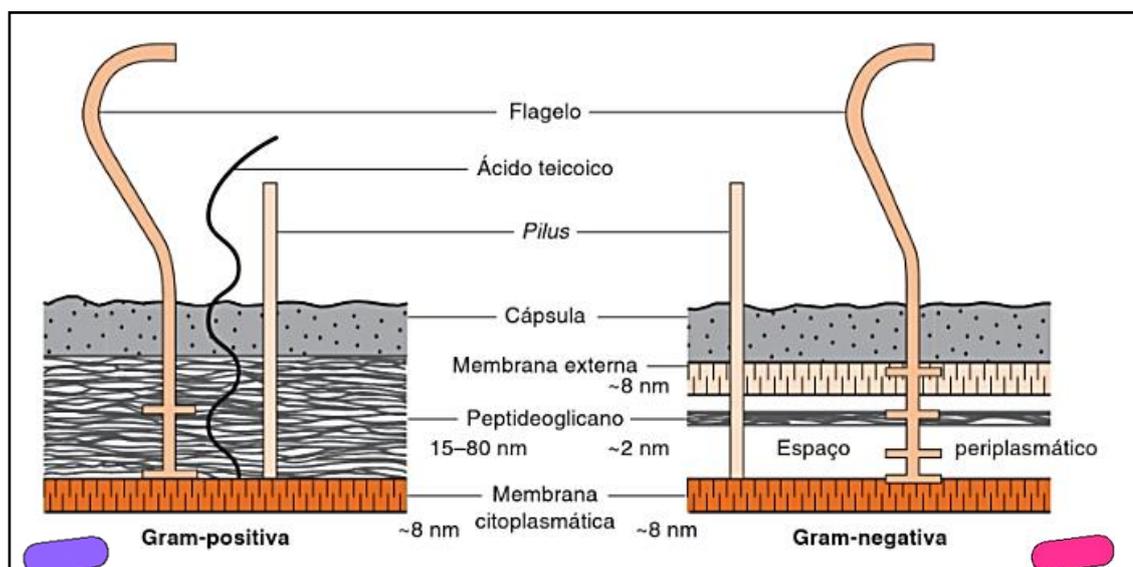


Figura 9- Paredes celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Observa-se que, em bactérias Gram-positivas, o peptidoglicano é muito mais espesso que em bactérias Gram-negativas. (Fonte: Madigan et al., 2016).

No presente trabalho os estudos biológicos foram realizadas com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, pois ambas apresentam maior índice de resistência aos antibióticos e alto fator de patogenicidade.

2.7 *Escherichia coli*

A bactéria *E. coli* pertence à família Enterobacteriaceae e gênero *Escherichia* e foi isolada pela primeira vez em 1885, pelo cientista Theodor Escherich⁸⁷. Trata-se de uma bactéria bastante comum no trato intestinal inclusive dos humanos, é um microrganismo altamente adaptado, que tem a capacidade de causar infecção e doença, sob certas condições. É um bacilo Gram-negativo, com característica aeroanaeróbio facultativo, não esporulado, provido de cílios e flagelos para sua movimentação⁸⁷. A estrutura da *E. coli* pode ser vista na Figura 10.

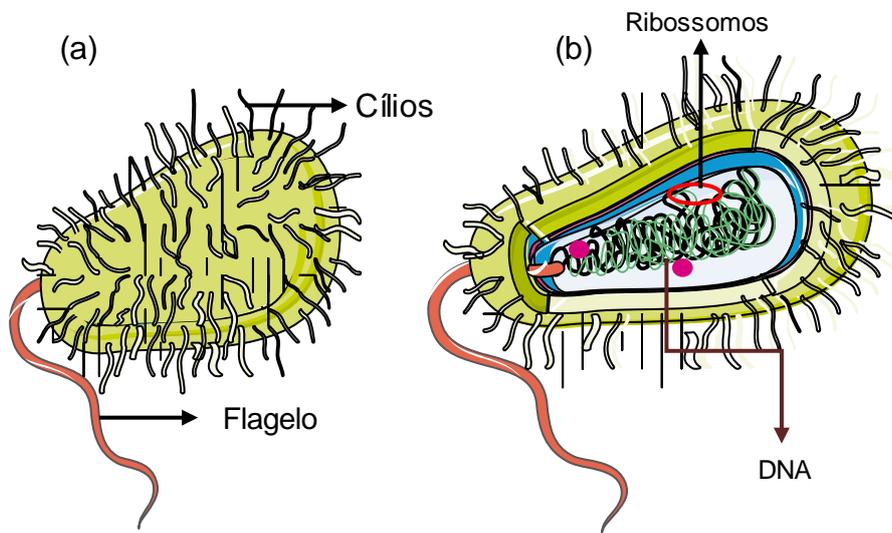


Figura 10- Estrutura externa (a) e interna (b) da bactéria *Escherichia coli*.

Essa bactéria pode ser ingerida através de alimentos ou água, no intestino humano é geralmente colonizada dentro de 40 horas após o nascimento⁸⁹. A *E. coli* é um importante membro do intestino de seres humanos e outros mamíferos. Apesar de ser um habitante intestinal inofensivo, também pode ser altamente versátil, e frequentemente fatal. Vários isolados diferentes de *E. coli* podem sofrer mutação genética e causar diversas doenças por meio de fatores de virulência que afetam uma ampla gama de processos celulares⁸⁷. Uma vez estabelecida, uma linhagem de *E. coli* pode persistir por meses ou anos. Entre as infecções extras intestinais, as principais são as infecções do trato urinário, as meningites, as infecções intra-abdominais, as infecções em feridas e as infecções da corrente sanguínea, ou septicemia⁸⁹.

As infecções extras intestinais possuem o principal agente etiológico das bactérias causadas por bacilos Gram-negativos, tanto em infecções de origem comunitária quanto as de caráter de infecções associadas a ambientes hospitalares⁸⁹. Estas infecções não ocorrem na forma de surtos comunitários que podem colocar em risco grande número de indivíduos simultaneamente, entretanto, são de extrema importância por terem alta morbidade e mortalidade, principalmente no ambiente hospitalar, aonde acometem pacientes que já se encontram debilitados

e imunologicamente deprimidos, seja por sua doença ou pelos tratamentos a que necessitam ser submetidos⁸⁷.

Diante da versatilidade da bactéria *E. coli*, a mesma vem sendo utilizada como indicador microbiológico ou bioindicador, ou seja, uma espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica, principalmente para verificar a poluição das águas por resíduos humanos e/ou animais⁹⁰.

2.8 Staphylococcus aureus

A bactéria *S. aureus* pertence ao grupo dos cocos Gram-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados⁹¹. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas) frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis⁹².

S. aureus são reconhecidos como microrganismos essencialmente oportunistas, que se prevalece de inúmeras situações orgânicas para produzir graves infecções, como pode ser visto na Figura 11⁹⁴.

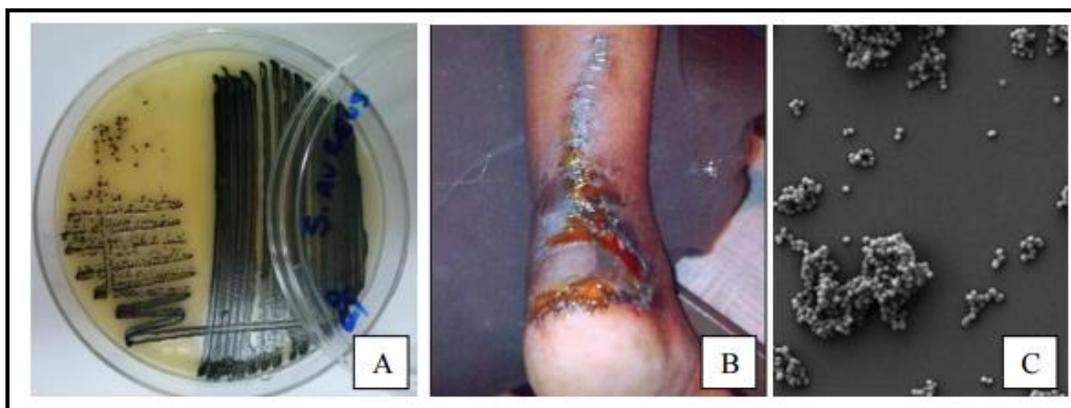


Figura 11- A) Característica da colônia de *S. aureus* cultivada em Ágar. B) Caso clínico de septicemia (infecção generalizada) superficial adquirida em pós-operatório por *S. aureus*. C) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (Fonte: Bernard, et al., 2004).

O *Staphylococcus* foi descrito pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos (acúmulo localizado de pus) cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, e atualmente é um dos microrganismos mais comuns nas infecções em todo o mundo⁹⁷. O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcae*, e possui 33 espécies, sendo que 17 delas podem ser isoladas de amostras biológicas humanas⁹¹.

A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, visto que essa bactéria é significativamente capaz de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira¹⁰¹.

S. aureus pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, sendo o próprio homem seu principal reservatório, além de estar presente em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele⁹². Desses sítios anatômicos, as narinas possuem o maior índice de colonização, cuja prevalência é de cerca de 40% na população adulta, podendo ser ainda maior dentro de hospitais¹⁰¹. O *S. aureus* encontrado nas fossas nasais ou na pele de neonatos, crianças e adultos pode, a partir desses sítios, alcançar outras regiões da pele e das mucosas⁹¹. Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *S. aureus* pode se alojar no tecido e provocar uma lesão local⁹¹.

A colonização nasal pelo *S. aureus* é desprovida de sintomas, ou seja, o indivíduo não desenvolve infecção. Essa colonização assintomática tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecções por contato¹⁰¹. Assim, principalmente em hospitais, o hospedeiro assintomático pode ser um paciente, um visitante, ou mesmo um profissional de saúde. De acordo com alguns estudos, o carreamento nasal também contribui para a transmissão da bactéria por disseminação aérea⁹².

Em hospitais, principalmente em berçários e unidades de terapia intensiva (UTIs), é rotina o isolamento de pacientes colonizados. O *S. aureus* também traz riscos para pacientes que fazem diálise, com queimaduras, diabéticos e HIV-

positivos, visto que pode causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas (relativamente benignas) até infecções sistêmicas (potencialmente fatais)^{92,97}.

Hoje, mais de 95% dos isolados de *S. aureus* de todo o mundo são resistentes a diversos antibióticos tais como a penicilina, ampicilina, metilina e até mesmo a vancomicina (VRSA, do inglês *vancomycin-resistant S. aureus*) um antibiótico de última geração utilizado contra infecções causadas por bactérias Gram-positivas^{97,101}.

2.9 Mecanismo de inibição da atividade bacteriana

Uma maneira de combater as atividades microbianas negativas é através de agentes bactericidas. Bactericidas são compostos capazes de inibir o crescimento ou matar determinados microrganismos¹⁰². A aplicação desta classe de materiais é muito ampla, podendo ser utilizados nos mais diversos produtos e processos, e por isso outros termos são utilizados para diferenciá-los entre si: antibióticos, antissépticos e atualmente, nanopartículas de óxidos metálicos¹⁰².

A inibição da atividade bacteriana não é trivial e ainda está em desenvolvimento dentro da área científica. Recentemente a compreensão dos mecanismos pelos quais ocorre a inibição bacteriana tem avançado, porém, este mecanismo ainda não está bem esclarecido por se tratar de um processo bastante complexo.

Nanopartículas de prata podem atacar a superfície da membrana celular e interferir de forma negativa em suas funções de permeabilidade. Pode-se afirmar que a ligação destas partículas na célula depende da área superficial disponível para a interação. As partículas menores possuem uma área muito maior de superfície disponível para interagir com o microrganismo, portanto, mais eficazes no combate a este, se comparadas a partículas maiores^{103,104}.

Os supostos mecanismos de ação das nanopartículas de prata na eliminação de microrganismos são^{104,105}:

- A prata em escala nanométrica possui uma melhor interação com os microrganismos devido a sua elevada área superficial. Desta forma, estas nanopartículas interagem com a superfície celular e penetram no interior desses organismos.
- As membranas celulares possuem proteínas cujas estruturas contêm enxofre e fósforo. Tanto as nanopartículas de prata quanto os íons de prata podem interagir com essas proteínas. Podem ainda inibir as funções do DNA ao interagirem com esses grupos.
- As nanopartículas de prata podem promover liberação de Ag^+ dentro das células dos microrganismos, podendo formar radicais livres e induzir o estresse oxidativo, reforçando sua atividade antimicrobiana.

Para tanto, a utilização de nanopartículas surge como uma alternativa viável e eficiente para este fim.

As bactérias apresentam um envoltório rígido, a parede bacteriana, que determina a forma da célula e a protege contra agressões físicas do ambiente. O principal componente da parede bacteriana é o peptidoglicano (PGN), ou seja, cadeias de moléculas de açúcar ligadas a pequenas cadeias de aminoácidos, chamados oligopeptídios⁹³.

A Figura 12 ilustra o mecanismo proposto para a interação de nanopartículas de prata com a parede celular bacteriana¹⁰⁶.

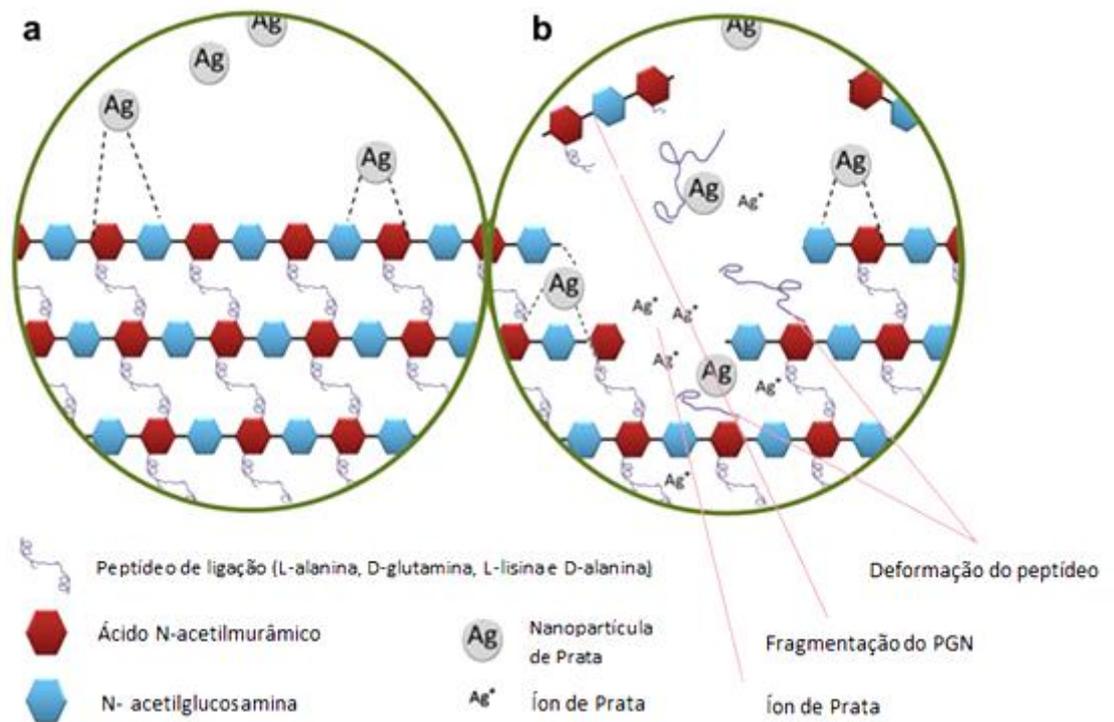


Figura 12- (a) Mecanismo proposto para a interação das nanopartículas com a parede celular bacteriana. (b) Rompimento das ligações peptídicas e fragmentação do peptídeo (PGN). (Fonte: Adaptado de Mirzajani et al., 2006).

As bactérias da família Enterobacteriaceae, por serem Gram-negativas, apresentam além da membrana citoplasmática uma camada adicional que confere a elas uma maior diversidade e integridade estrutural, a membrana externa, constituída por uma camada bi-lipídica onde estão ancoradas diversas classes de moléculas, como proteínas, polissacarídeos, ácidos e lipopolissacarídeos⁹³.

Esta camada adicional é uma barreira para a atuação direta de agentes biocidas. Nestes casos, a membrana citoplasmática normalmente é o local predisposto a ataque de agentes biocidas. Uma vez que, é na membrana citoplasmática das células Gram-negativas e Gram-positivas que ocorrem as interações balanceadas entre os fosfolipídeos e as proteínas enzimáticas e estruturais⁹³. Esta situação de equilíbrio garante uma impermeabilidade controlada e a organização topológica pela qual a homeostase intracelular e o transporte e metabolismo vetorial são mantidos. O citoplasma também é um local muito

importante, onde ocorrem muitos processos catabólicos e anabólicos, contudo por ser mais externa a membrana é mais sujeita à ação de bactericidas⁹³.

Entre eles podemos destacar a oxidação catalítica de radicais na superfície celular inibindo a transferência de oxigênio, a reação com radicais presentes na superfície das bactérias interferindo no transporte eletrônico e a associação com o DNA¹⁰⁶.

Diante exposto, este trabalho tem como proposta a síntese e caracterização de nanopartículas de ZrO_2 e ZrO_2 com Ag, além da avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi sintetizar e caracterizar nanopartículas de ZrO_2 e ZrO_2 com Ag pelo método hidrotermal:

- Obtenção de nanopartículas de zircônia e zircônia com prata pelo método hidrotermal.
- Testar a eficiência das nanopartículas sintetizadas frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus* MSSA e MRSA.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Síntese de ZrO₂

Para a síntese de nanopartículas de ZrO₂ foram utilizados os reagentes listados na Tabela 2:

Tabela 2- Reagentes utilizados para síntese de ZrO₂.

Reagente	Fórmula Química	Fornecedor	Pureza
Butóxido de Zircônio	Zr[(OCH ₂) ₃ CH ₃] ₄	Aldrich	99,99%
Peróxido de Hidrogênio	H ₂ O ₂	Synth	99,94%
Nitrato de Prata	AgNO ₃	Merck	98,80%

Fonte: Elaborada pela autora.

Os nanomateriais foram obtidos por rota híbrida que será descrita no decorrer desta sessão.

Para facilitar o entendimento deste trabalho, a Tabela 3 resume a composição e a nomenclatura utilizada no presente trabalho.

Tabela 3- Composição e nomenclatura das amostras sintetizadas.

Amostra	Composição	Nomenclatura
Amostra 1	ZrO ₂	Z
Amostra 2	ZrO ₂ : Ag (1%)	ZAg1
Amostra 3	ZrO ₂ : Ag (10%)	ZAg10

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Método do Peróxido Oxidante (OPM) com posterior tratamento hidrotérmico.

Esta síntese ocorreu em duas etapas e foi realizada por rota híbrida OPM com posterior tratamento hidrotérmico segundo os parâmetros mostrados no fluxograma da Figura 13.

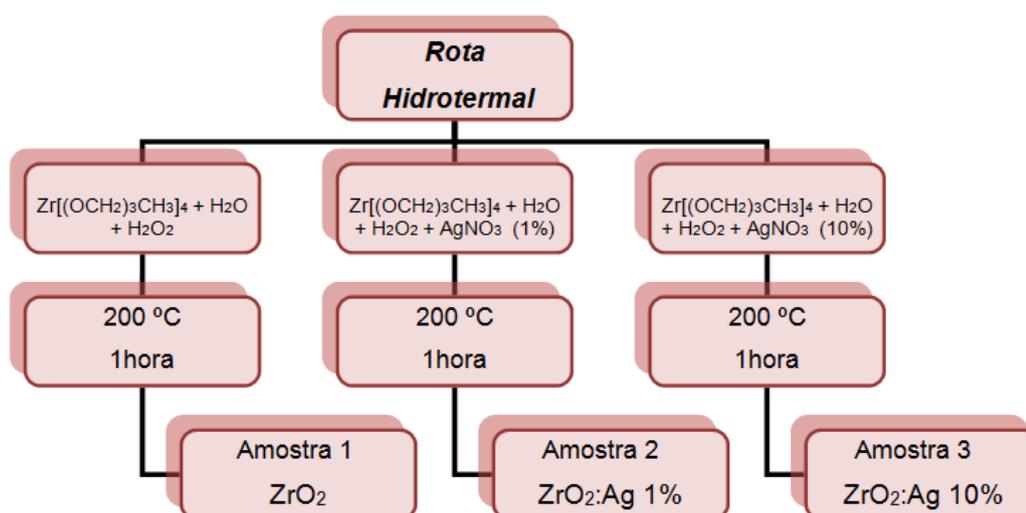


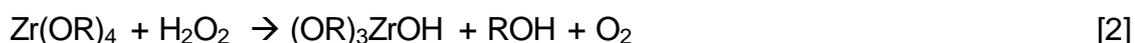
Figura 13- Fluxograma das condições de síntese para obtenção das amostras pela síntese OPM/Hidrotérmica.

Na primeira etapa da síntese foram produzidas três tipos de amostras:

- 1- Amostra 1: Adicionou-se 1 ml de butóxido de zircônio à 30 ml água destilada e 20 ml de peróxido de hidrogênio. Manteve-se agitação magnética por 24 horas.
- 2- Amostra 2: Adicionou-se 1 ml de butóxido de zircônio à 30 ml água destilada e 20 ml de peróxido de hidrogênio e 1% de nitrato de prata em peso. Manteve-se agitação magnética por 24 horas.
- 3- Amostra 3: Adicionou-se 1 ml de butóxido de zircônio à 30 ml água destilada e 20 ml de peróxido de hidrogênio e 10% de

nitrito de prata em peso. Manteve-se agitação magnética por 24 horas.

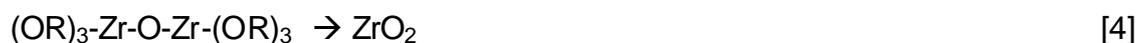
A reação química entre as espécies envolvidas nas soluções foi proposta por QIN, D. e CHEN, H¹¹⁵., é mostrada na equação abaixo, onde primeiro ocorre a reação de hidrólise, formando um complexo de zircônio.



Depois da homogeneização do sistema, observou-se a formação de um sistema coloidal branco. Nesta fase, ocorre o processo de policondensação no qual o complexo reage para formar a ligação Zr–O–Zr, conforme mostra a equação [3].



Na segunda etapa da síntese foi realizado tratamento hidrotermal por 1 hora e temperatura à 200°C para as amostras 1, 2 e 3. Para as amostras 2 e 3 foi adicionado nitrito de prata 1% e 10% em peso, para formação da heteroestrutura de ZrO₂:Ag, conforme mostrado no fluxograma da Figura 11. Nesta etapa ocorre a formação do óxido de zircônio, conforme a equação [4].



A taxa de aumento de temperatura foi 20°C/min até atingir o patamar desejado. Neste patamar a pressão interna do reator foi de aproximadamente 10 kgf/cm² para todas as amostras sintetizadas. O resfriamento ocorreu de forma espontânea. Após esta etapa foram obtidas as nanopartículas em forma de pó de ZrO₂, ZrO₂:Ag 1% (p/p) e ZrO₂:Ag 10% (p/p) respectivamente.

Os óxidos foram lavados, centrifugados e secos como apresentado na Figura 14.

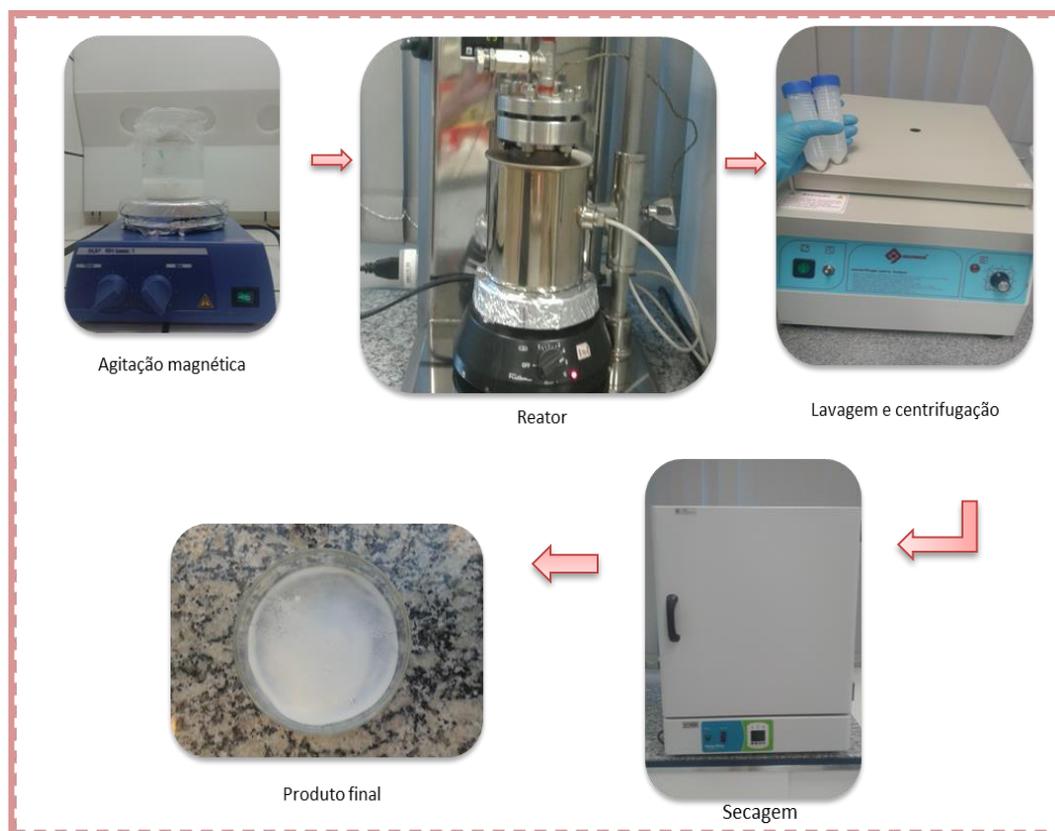


Figura 14- Imagem das etapas de síntese por rota híbrida OPM com tratamento hidrotérmico. (Fonte: Elaborada pela autora).

O volume total da solução para o tratamento hidrotérmico em todas as sínteses representa aproximadamente 80% do volume total do reator. Nestas condições é garantido o equilíbrio entre o vapor e o líquido durante o tratamento.

Após os processos de síntese cada solução foi lavada com água deionizada por quatro vezes. Este procedimento tem como objetivo eliminar os subprodutos da reação e aumentar a precipitação do óxido. Para a separação do material as amostras foram centrifugadas por 7 minutos à 10 mil RPM (rotações por minuto), numa centrífuga Quimis, Modelo Q222T2 e secos a 80°C em uma estufa Nova Ética por 4h.

A Figura 15 ilustra o reator hidrotérmico utilizado no processo de síntese.

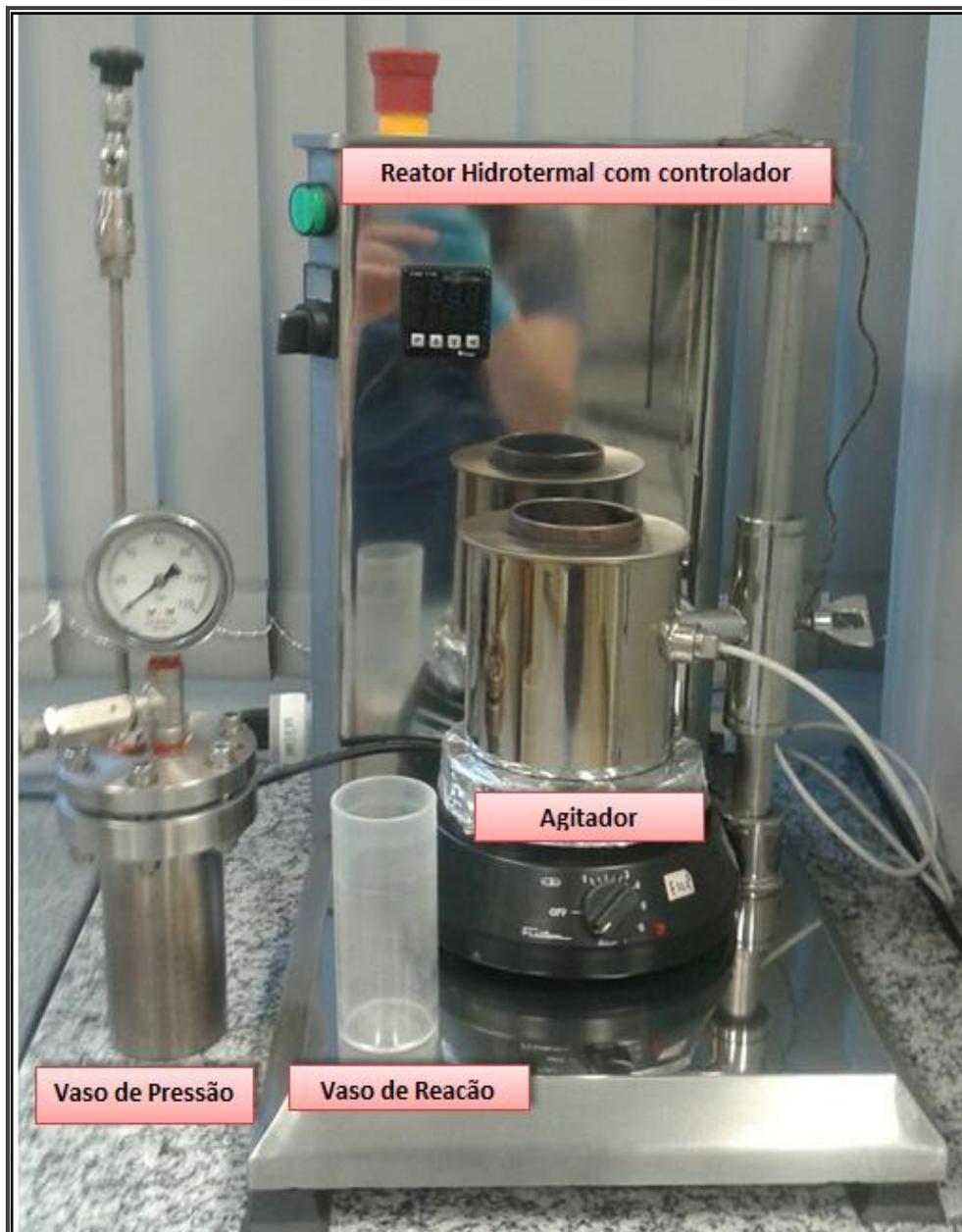


Figura 15- Imagem do Reator Hidrotermal. (Fonte: Elaborada pela autora).

Após o processo de síntese, tratamento hidrotérmico, centrifugação e secagem, os produtos finais produzidos podem ser vistos na Figura 16.

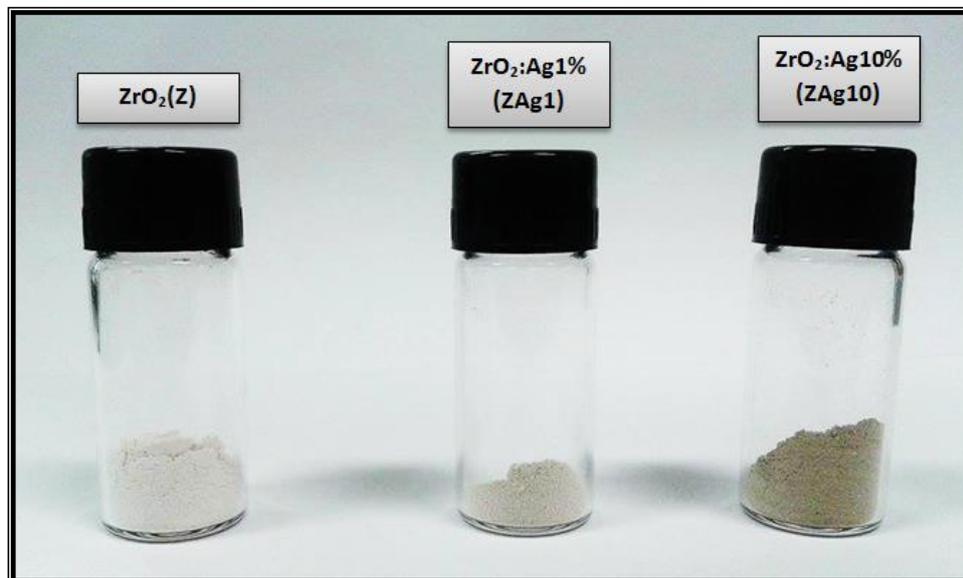


Figura 16- Imagem dos nanomateriais produzidos: Z, ZAg1, ZAg10.(Fonte: Elaborada pela autora).

4.3 Biotestes

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos nanomateriais sintetizados foram realizados os seguintes ensaios: cinética de crescimento com análise estatística dos dados, viabilidade bacteriana pelo ensaio colorimétrico do MTT e Microscopia Eletrônica de varredura (MEV).

Para melhor entendimento dos ensaios biológicos esta sessão está dividida em itens.

- I. **Microrganismos:** *E. Coli* (cepa ATCC 25992), *S. aureus* MRSA (cepa ATCC 43300) e *S. aureus* MSSA (cepa ATCC 25923) armazenadas à -80°C. Para a execução dos protocolos, as cepas foram mantidas em caldo Muller Hinton (MH) à 4°C.

- II. **Nanopartículas:** No presente estudo, foram testadas as nanopartículas de ZrO_2 , ZrO_2 com 1% e 10% de Ag que foram preparadas em caldo MH.
- III. **Desenho experimental:** Suspensões de *E. coli*, *S. aureus* MSSA e *S. aureus* MRSA foram testadas com os materiais Z, ZAg1, ZAg10 e com caldo MH, utilizada como controle interno. Desse modo, as três cepas de bactérias formaram três grupos e quatro subgrupos experimentais, conforme segue:
- Grupo *E. coli*: 1) ZrO_2 ; 2) ZrO_2 :Ag 1%; 3) ZrO_2 :Ag 10%; 4) Caldo MH.
 - Grupo *S. aureus* MSSA: 1) ZrO_2 ; 2) ZrO_2 :Ag 1%; 3) ZrO_2 :Ag 10%; 4) Caldo MH.
 - Grupo *S. aureus* MRSA: 1) ZrO_2 ; 2) ZrO_2 :Ag 1%; 3) ZrO_2 :Ag 10%; 4) Caldo MH.

Para todos os grupos, a cultura celular foi incubada por até 6 horas a 37°C, sob agitação.

- IV. **Preparo do inóculo:** Vinte e quatro horas anteriores ao experimento realizou-se o repique de *E. coli*, *S. aureus* MSSA e *S. aureus* MRSA em placa contendo ágar Mueller Hinton (AMH) pela técnica de esgotamento (Figura 17). No dia do bioensaio, o ajuste do inóculo foi determinado pela leitura de absorbância ($\lambda = 620$ nm) em espectrofotômetro de microplaca (EL800, BIO-TEK Instrumentos, INC) (Figura 18), com densidades ópticas entre 0,100 – 0,200. Neste intervalo de densidade óptica a suspensão bacteriana equivale a aproximadamente, $2,0 - 3,0 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml, previamente validado. Em seguida, a solução padrão foi diluída 100µl em 900µl (1:10) e para a realização do ensaio foi utilizada a quantidade aproximada de 10^5 Unidades Formadoras de Colônias (CFU)/ml, num volume final de 10 µl
- V. **Avaliação antimicrobiana por curva de crescimento (cinética):** A curva de diluição foi preparada em placa de 96 poços estéril, na qual a concentração

inicial testada foi de 2 mg/ml e a concentração final 0,25 mg/ml. Foi realizada a transferência de 10 µl do inóculo, em triplicata, em cada poço na presença de 100 µl das soluções contendo as nanopartículas ou caldo MH, como controle positivo. A cultura celular foi incubada à 37°C, sob agitação. Foi realizada a leitura nos tempos: 0h, 2h, 4h e 6h em espectrofotômetro de microplaca pela leitura de absorbância ($\lambda = 570$ nm).

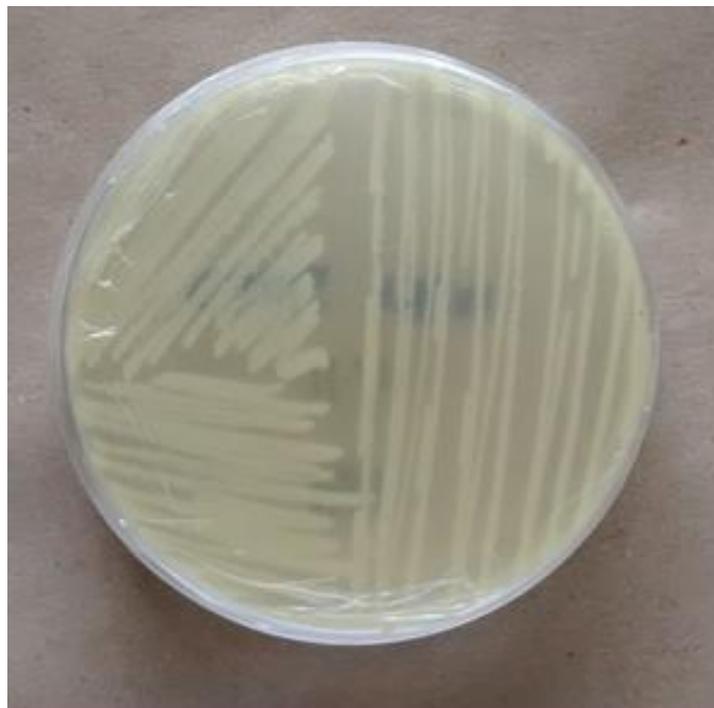


Figura 17- Repique de *E.coli* feito em placa contendo ágar BHI pela técnica de esgotamento, vinte e quatro horas anteriores ao experimento.



Figura 18- Ajuste do inoculo determinado pela leitura de absorbância ($\lambda = 620 \text{ nm}$) em espectrofotômetro de microplaca, com densidades ópticas entre 0,100 – 0,200. Densidade óptica da suspensão bacteriana equivale a, aproximadamente, $2,0 - 3,0 \times 10^5$ Unidades Formadora.

VI. Determinação da viabilidade bacteriana: Em microplaca estéril de 96 poços, realizou-se a transferência de $10 \mu\text{l}$ do inoculo, em duplicata, em cada poço na presença de $100 \mu\text{l}$ das soluções contendo as nanopartículas ou caldo MH, como controle positivo. Após 6 horas do período de incubação (Figura 19-a), a viabilidade bacteriana foi determinada pelo método colorimétrico utilizando MTT (Brometo de (3-(4,5 dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido)), conforme proposto por Wang e colaboradores¹¹². Resumidamente, foi transferido o volume de $100 \mu\text{l}$ de cada poço da microplaca para microtubos estéreis, pré-aquecidos. Adicionou-se $10 \mu\text{l}$ de solução estoque de MTT (5 mg/ml) em cada microtubo, os quais foram incubados, com a tampa aberta, a 37°C (Figura 19-b). Após 20 minutos, foi adicionado $250 \mu\text{l}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada amostra. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado. O volume de $250 \mu\text{l}$ de DMSO foi adicionado em

cada amostra para dissolução completa do *pellet* formado (Figura 20). Em seguida, foi realizada a transferência de 200 μ l das amostras para microplaca de 96 poços estéril. A viabilidade bacteriana foi determinada através da leitura de absorbância ($\lambda=570$ nm) em espectrofotômetro de microplaca.



Figura 19- (a) Cultura celular juntamente com microtubos, durante a incubação de 6 horas à 37°C, sob agitação. (b) Microtubos incubados por 20 minutos, com a tampa aberta, à 37°C, durante a determinação da viabilidade bacteriana pelo método colorimétrico MTT (Brometo de (3-(4,5 dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido)).

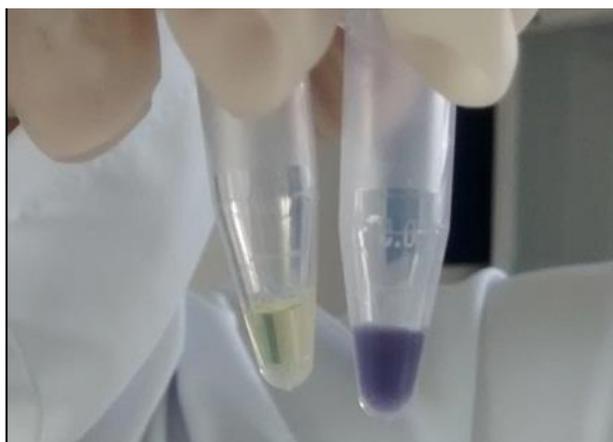


Figura 20- Amostras dos controles negativo (à esquerda) e positivo (à direita), após adição de MTT (Brometo de (3-(4,5 dimetietiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio bromido)), o qual é reduzido quando interage com células vivas, formando cristais de formazan, com coloração azul, representado pelo controle positivo. A quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Como pode ser visto na Figura 20 a variação da coloração indica a presença ou a ausência de células vivas.

Para melhor entendimento das etapas do bioteste a Figura 21 ilustra resumidamente o preparo do inoculo e a 22 a viabilidade bacteriana.

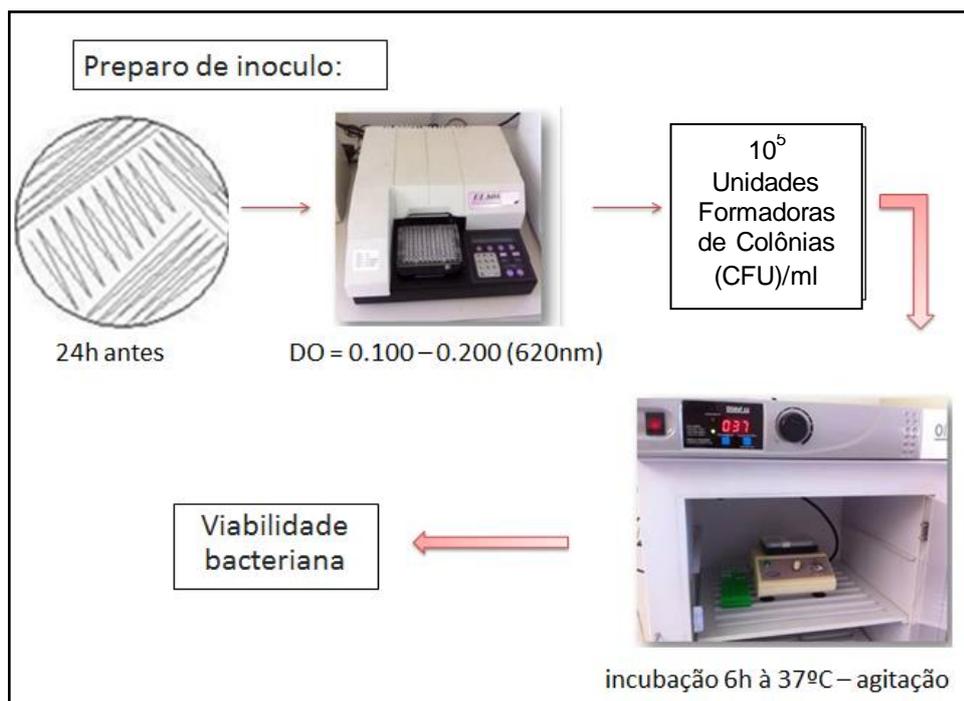


Figura 21- Preparo do inoculo.

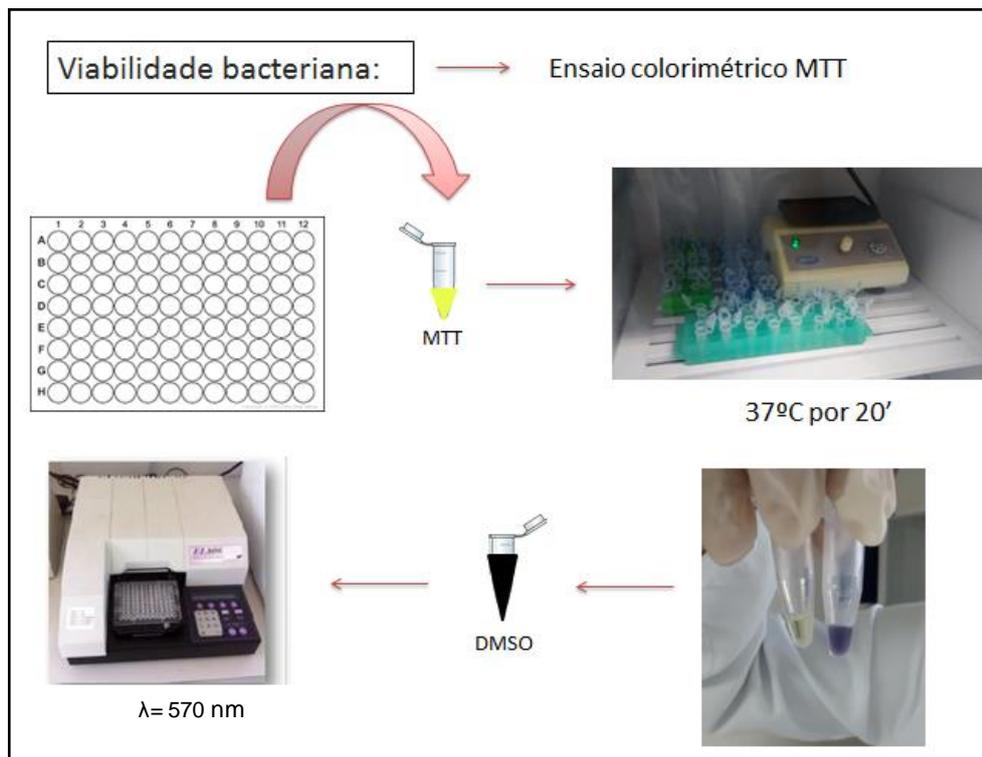


Figura 22- Viabilidade bacteriana.

Maiores informações serão apresentadas na sessão de resultados e discussão do presente trabalho.

5. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

5.1 Difração de Raios X (DRX)

Esta técnica permite determinar as fases formadas de um material cristalino, sua identificação química e o tamanho do cristalito formado através da equação de Scherrer¹¹³.

Neste trabalho as análises de difração de Raios X foram efetuadas para determinar a fase cristalina e estimar o tamanho médio das nanopartículas sintetizadas.

Para calcular o tamanho do cristalito foi utilizada a equação de Scherrer¹¹³:

$$D = 2R = \frac{0.9\lambda}{\cos \theta \sqrt{B^2 - B_R^2}}$$

[5]

Onde:

λ = Comprimento de onda da fonte dos Raios X;

θ = Ângulo de difração;

B= Largura à meia altura do pico de difração;

B_R= Largura à meia altura do pico de difração de um cristal de referência.

O equipamento utilizado para a obtenção dos difratogramas foi o difratômetro de bancada MiniFlex 600/RIGAKU, operado nas condições 40kV e 15 mA. As medidas utilizaram radiação Cu $\kappa\alpha$ ($\lambda = 1,541\text{Å}$) com taxa de varredura 0,02° por minuto no intervalo (2θ) de 20° a 70°.

5.2 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia vibracional na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) fornece informações da presença de diversos grupos funcionais na amostra investigada, devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam. O espectro vibracional aparece como uma série de bandas, pois cada mudança de nível de energia vibracional corresponde a uma série de mudanças de níveis de energia rotacional, desta forma, as linhas se sobrepõem dando origem às bandas observadas no espectro¹¹³.

Os espectros de FTIR das amostras sintetizadas foram obtidos em um equipamento espectrofotômetro da marca Bomem MB100 no modo de transmitância utilizando pastilhas de KBr.

5.3 Análise Térmica: Termogravimetria - TG

Análise Térmica é o estudo da relação entre uma propriedade da amostra e sua temperatura, enquanto a amostra é aquecida ou resfriada de maneira controlada¹¹⁴.

Termogravimetria é uma técnica na qual a massa da amostra é medida como uma função da temperatura, esta técnica permite estabelecer a faixa de temperatura que a massa da substância começa a se decompor, bem como para se seguir o andamento de reações de desidratação, oxidação e decomposição¹¹⁴.

Esta técnica foi utilizada neste trabalho para verificar quantitativamente resíduos de matéria orgânica nas nanopartículas sintetizadas.

O equipamento utilizado para a análise térmica foi o STA 449 F3 Jupiter (Netzsch), utilizando razão de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, atmosfera de ar sintético com um fluxo de 50 ml min^{-1} e amostras com massa de aproximadamente 5 mg.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) fornece informações morfológicas associadas às informações químicas por meio do acoplamento a um detector do tipo EDX (Energy Dispersion Spectroscopy), essa técnica é denominada espectroscopia de energia dispersiva de raios X¹¹³.

Esta técnica foi utilizada neste trabalho para verificar as morfologias das nanopartículas sintetizadas. As microscopias foram feitas em um equipamento ZEISS modelo supra 35.

5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Para sistemas nanoparticulados a Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) é mais adequada, pois existe a vantagem da obtenção de informações estruturais localizadas com melhor resolução¹¹³.

Neste trabalho esta técnica foi utilizada para estudo de tamanho e forma das nanopartículas. As microscopias foram feitas no equipamento FEI TECNAI G2 F20-200kV.

5.6 Espectroscopia na Região do UV-Vis

A espectroscopia de reflectância difusa é uma técnica para determinação das propriedades de absorção dos materiais cristalinos ou amorfos. Quando a radiação UV-vis interage com a superfície de um material, ocorre radiação que pode ser absorvida, transmitida, refletida ou espalhada¹¹³.

No caso a reflectância difusa refere-se à luz refletida de uma superfície fosca, onde a luz incidente dá origem a um feixe refletido com raios em várias direções.

A técnica de reflectância difusa na faixa do UV-vis possibilita determinar o *band gap* de materiais semicondutores, seja pó ou filme, além de características como o tamanho do cristalito¹¹³. Associado a técnica, utiliza-se o modelo de Kubelka-Munk, onde se pressupõe que a reflectância difusa origina-se a partir da absorção e do espalhamento da luz pelo material analisado¹¹³. Kubelka e Munk foram os autores que desenvolveram a expressão que transforma os dados de reflectância difusa em absorbância que pode ser representada por:

$$F(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{\alpha}{s}, \quad [6]$$

Onde $R_{\infty} = (I_1/I_0)$ difusa é a reflectividade difusa do pó, α é o coeficiente de absorção em cm^{-1} e s é um fator de espalhamento. Para facilitar a transformação, a plotagem dos valores de $\log(I_1/I_0)$ difusa em função do comprimento de onda possibilitam uma representação correta do espectro. O comprimento de onda está relacionado à transição BV→BC (banda de valência para banda de condução) e é determinado a partir de uma extrapolação da porção linear da borda de absorção, onde a mesma intersecciona o eixo da abcissa, ou seja, o comprimento de onda.

Os espectros das amostras sintetizadas foram obtidos em um equipamento da marca Varian Cary 5000, as medidas foram realizadas na faixa de 200 a 800 nm.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método escolhido para a síntese de nanopartículas de ZrO_2 e ZrO_2 com Ag neste trabalho foi o método hidrotermal. Foi possível observar que a maioria dos artigos aborda a síntese de nanopartículas de prata com estudo de morfologia ou aplicações como biosensores e catalisadores, ou ainda como funcionalização em estruturas orgânicas. Já a síntese de ZrO_2 foi bastante abordada em trabalhos científicos, com aplicações em biosensores, resinas odontológicas, catalisadores e heteroestruturas.

A correlação entre ZrO_2 e Ag será apresentada neste trabalho nos âmbitos síntese, caracterizações e aplicações antimicrobianas.

O método utilizado para a síntese das nanopartículas mostrou-se eficiente na produção das estruturas de ZrO_2 e ZrO_2 com Ag como foi evidenciado pelas técnicas de caracterizações que serão discutidas no decorrer deste trabalho.

6.1 Caracterização estrutural por Difração de Raios X

Os difratogramas de Raios X pelo método do pó são mostrados na Figura 23. Os picos foram medidos quanto à posição angular (2θ) e intensidade, os dados foram comparados com o padrão de difração do banco de dados JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) e os picos de difração coincidiram com as fichas JCPDS da zircônia e da prata, 791769 e 893722 respectivamente, que corresponde a ZrO_2 com estrutura tetragonal e Ag metálica com estrutura cúbica de face centrada.

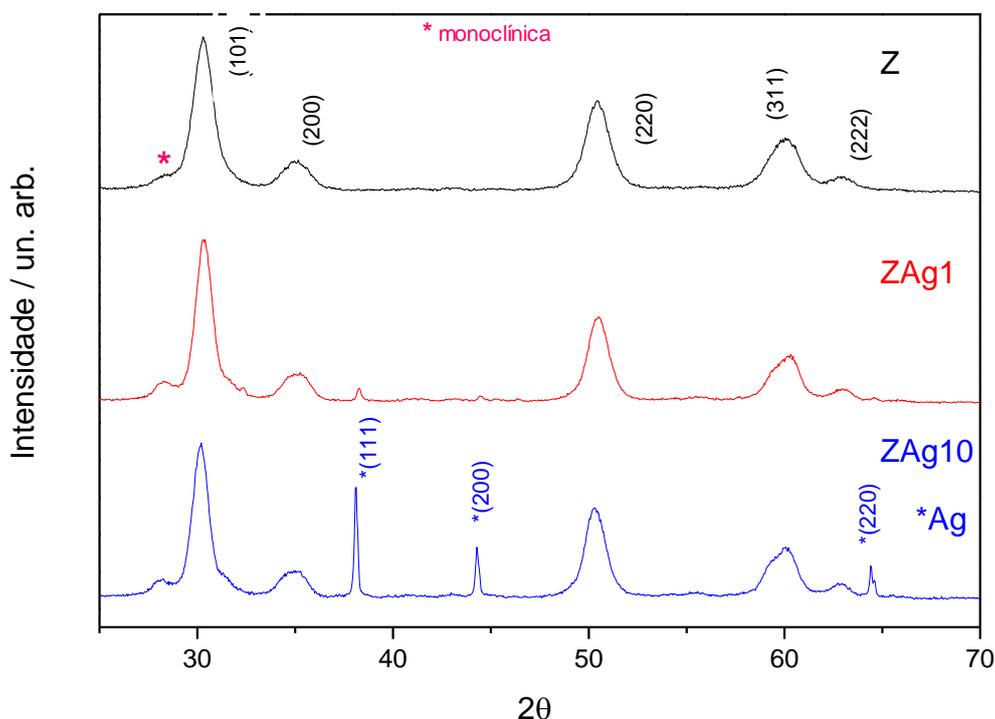


Figura 23- Difratogramas de raios-X das amostras Z, ZAg1 e ZAg10.

Nas amostras sintetizadas por rota hidrotérmica, Figura 23, foi possível verificar que o perfil cristalográfico do ZrO_2 foi obtido em sua forma majoritária tetragonal, com seus picos característicos (101), (200), (220), (311) e (222) bem definidos nas três amostras, observou-se também a presença da fase monoclinica.

As amostras ZAg1 e ZAg10 apresentam os picos característicos da prata cúbica, sendo eles (111), (200) e (220). KURANAGA, C. e colaboradores³⁰ relataram que a predominância da fase tetragonal do ZrO_2 aumenta à medida que se eleva a temperatura e/ou tempo de rota sintética, ou seja, a partir de 150°C, via método hidrotermal.

A obtenção dos materiais produzidos com fase majoritária tetragonal era desejada, devido ao método hidrotermal favorecer a predominância da fase citada e também a sua gama de aplicações já expostas neste trabalho.

DAGUANO, J.K.M.F. e colaboradores²⁸ estudaram a influência do tempo e temperatura de sinterização no desenvolvimento microestrutural de compósitos

cerâmicos à base de ZrO_2 estabilizada com ítrio (Y) e alumina (Al_2O_3), visando aplicação do material como componente de sistemas de implantes dentários. Os pesquisadores fizeram os estudos em condições de alta temperatura, entre 1500 °C e 1600 °C e tempo variado, os materiais apresentaram apenas as fases Al_2O_3 e ZrO_2 tetragonal, indicando que o tempo e a temperatura de sinterização não influenciam nas transformações de fases desse material, devido ao fato do ZrO_2 estar estabilizado, conforme o difratograma de raios X da imagem apresentada à seguir.

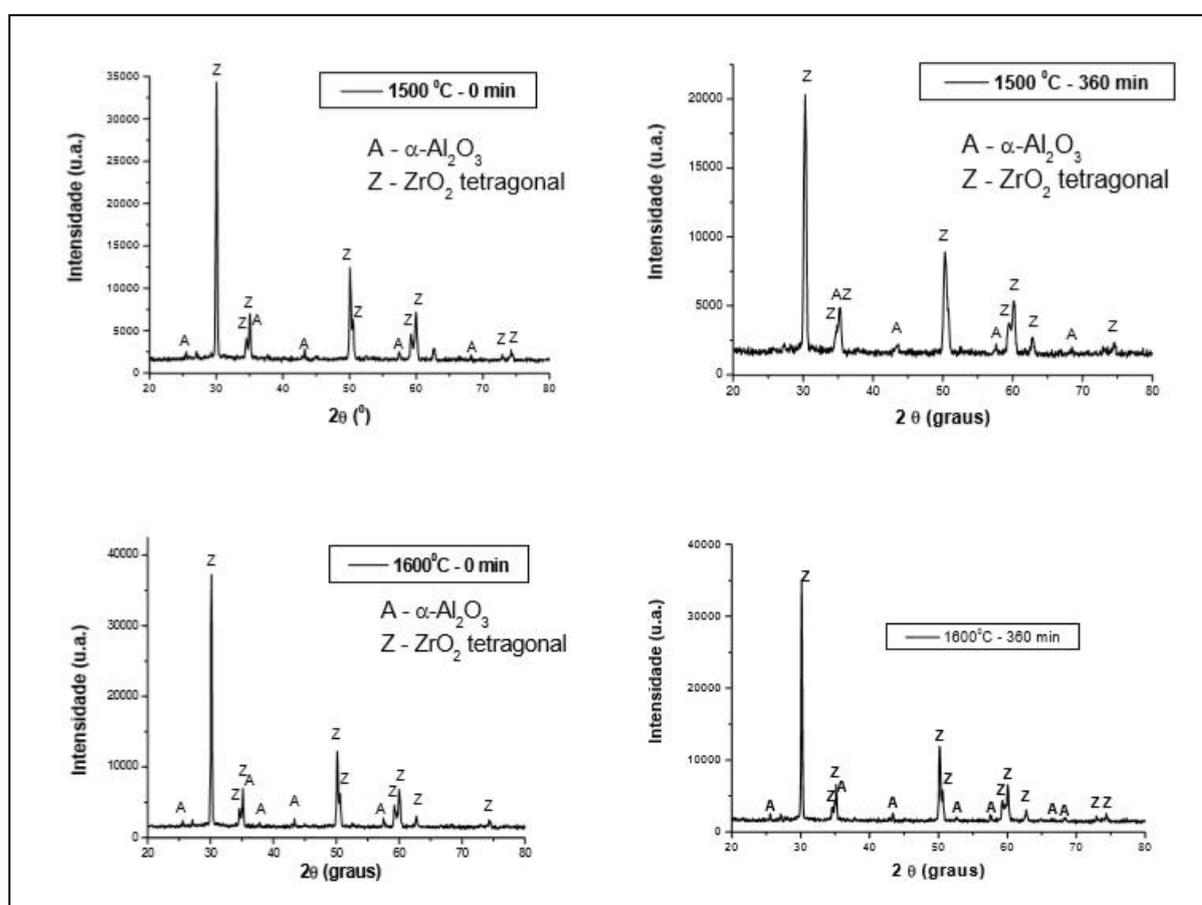


Figura 24- Difratogramas de raios X da mistura ZrO_2 -Y- Al_2O_3 , sinterizado a 1500°C e 1600°C, com 0 e 360 minutos de isoterma. (Fonte: Daguano et al., 2006).

Segundo Daguano e colaboradores, a fase tetragonal da ZrO_2 melhora as propriedades mecânicas do material ²⁸.

Diante desta discussão é importante destacar a relevância da rota hidrotermal para este trabalho, pois foi possível produzir, ZrO_2 com estrutura majoritariamente tetragonal, com picos idênticos ao trabalho supracitado, sem adição de substâncias estabilizadoras, sem agente mineralizador (ácido ou básico) e com temperatura de 200°C, relativamente baixa.

Com base nos difratogramas foi possível realizar os cálculos para determinar os tamanhos dos cristalitos através da equação de Scherrer, sendo utilizados os picos (101) e (111) da zircônia e da prata, respectivamente. Os valores dos nanocristalitos encontrados para ZrO_2 , $ZrO_2:Ag$ 1% e $ZrO_2:Ag$ 10% foram, respectivamente, 7,58, 8,91 e 9,28 nm, valores estes que corroboram com a literatura, pois, segundo Guo e Chen, é esperado a formação da fase tetragonal preferencialmente com tamanho de partícula entre 7 e 10 nm⁹⁵.

As posições do baricentro dos picos, a largura da banda a meia altura (FWHM) e o tamanho dos cristalitos estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4-Parâmetros utilizados e valores encontrados através da Equação de Scherrer.

Amostra	ZrO_2 (101)			Ag (111)		
	Baricentro	FWHM	Cristalito	Baricentro	FWHM	Cristalito
	(2θ)	(2θ)	(nm)	(2θ)	(2θ)	(nm)
Z	30,26	1,1347	7,58	-	-	-
ZAg1	30,38	0,9654	8,91	38,28	0,2548	34,48
ZAg10	30,22	0,9267	9,28	38,12	0,1945	45,15

6.2 Caracterização Microestrutural por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As micrografias apresentadas a seguir se referem às caracterizações microestruturais das nanopartículas sintetizadas neste trabalho.

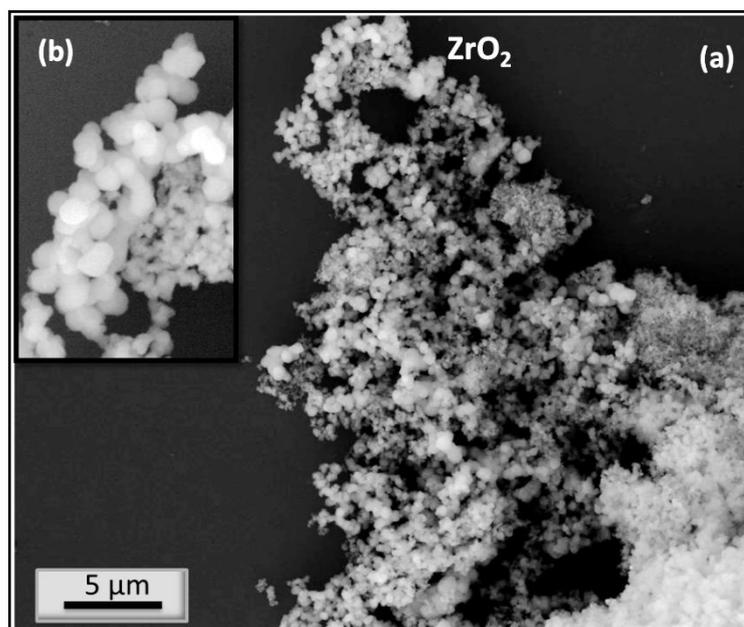


Figura 25- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da amostra Z (ZrO₂) com aumento de 33 mil vezes.

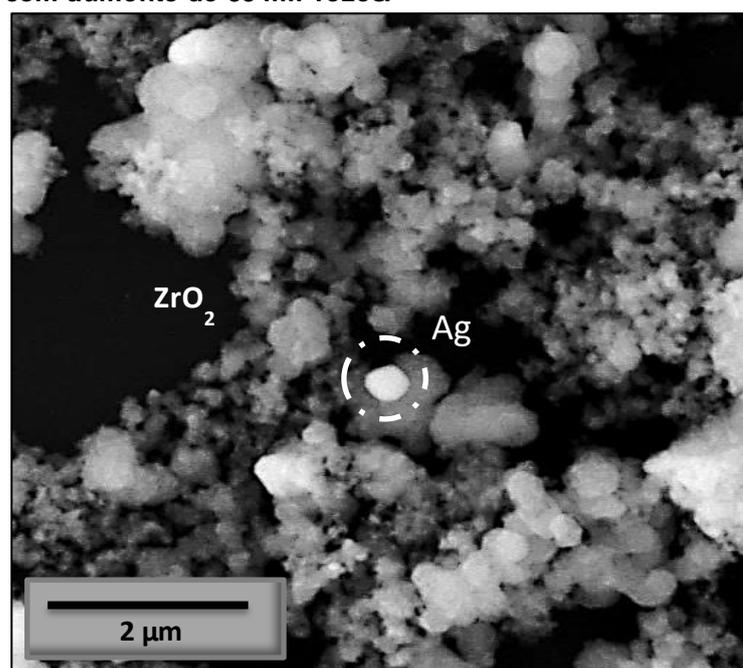


Figura 26- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da amostra ZAg1(ZrO₂:Ag 1%) com aumento de 100 mil vezes.

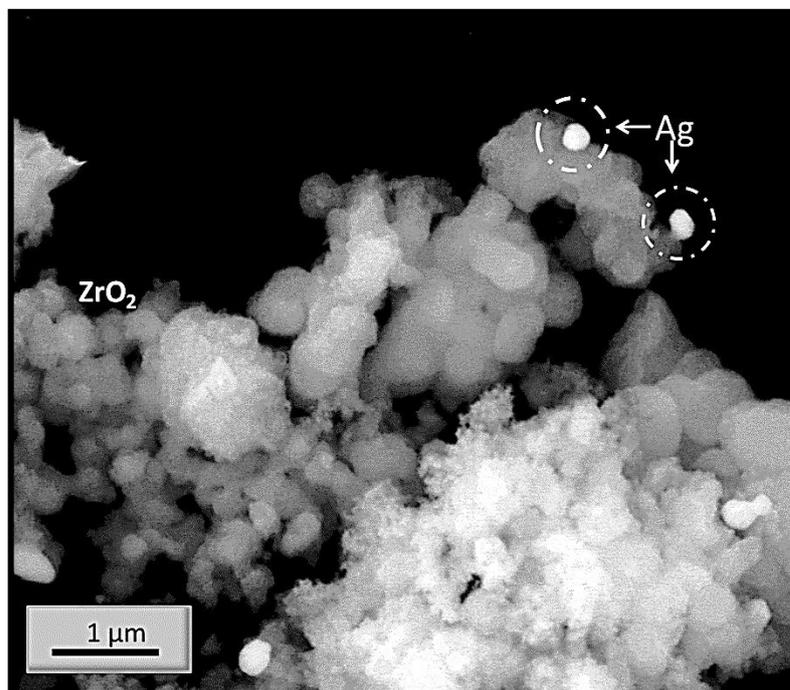


Figura 27-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da amostra ZAg10 (ZrO₂:Ag 10%) com aumento de 100 mil vezes.

As Figuras 25, 26 e 27 apresentam as imagens de microscopia obtidas para as amostras Z, ZAg1 e ZAg10 respectivamente. As nanoestruturas de ZrO₂ puro, amostra Z, e nanoestruturas de ZrO₂ com Ag, amostras ZAg1 e ZAg10, mostraram-se aglomeradas, levando a reincidência de partículas pequenas, em concordância com a análise de DRX, pois de acordo com Kataoka⁵⁶, o material que possui menor tamanho de partícula apresenta estrutura mais aglomerada. Isso ocorre devido aos átomos da superfície estarem com coordenação insatisfeita, o que torna a superfície da partículas mais energética, favorecendo assim a aglomeração.

Segundo Kaliszewski e Heuer⁹⁶ as partículas de ZrO₂ também podem se aglomerar no processo de síntese, nas etapas de lavagem, centrifugação e secagem, já que o pó na presença de água forma ligações químicas entre os átomos de oxigênio das partículas vizinhas, derivadas da reação de condensação de grupos OH⁻ superficiais quando este é seco.

A presença de partículas esféricas de Ag nos materiais ZAg1 e ZAg10 é nítida e os tamanhos das partículas são da ordem de 50 nm, também em

concordância com os cálculos de tamanho dos cristallitos, segundo a equação de Scherrer .

A composição química das nanoestruturas também foi confirmada e comprovada a partir da análise de EDX, como apresentado na Figura 28.

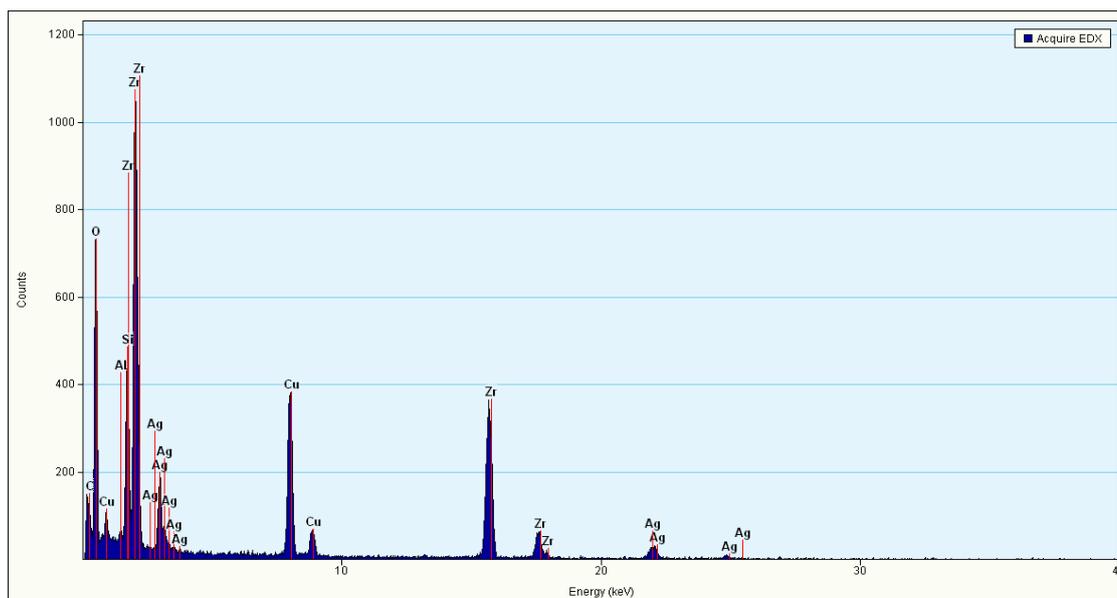


Figura 28- Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDX) da amostra ZAg10 (ZrO₂:Ag10%).

Observou-se na imagem de EDX, Figura 28, os picos característicos dos metais Zr e Ag, confirmando a composição química do material produzido.

6.3 Caracterização Microestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As micrografias apresentadas adiante se referem às caracterizações microestruturais das nanopartículas sintetizadas neste trabalho.

As imagens de TEM mostraram que esta rota de síntese proporciona partículas de ZrO₂ bem aglomeradas.

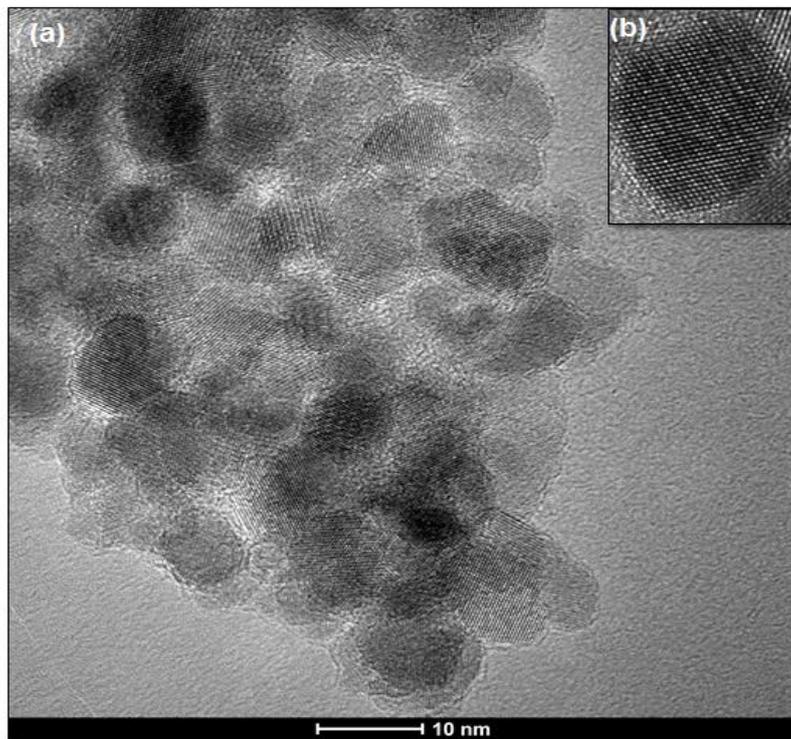


Figura 29- (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da amostra Z; (b) ampliação dos planos cristalinos da ZrO_2 .

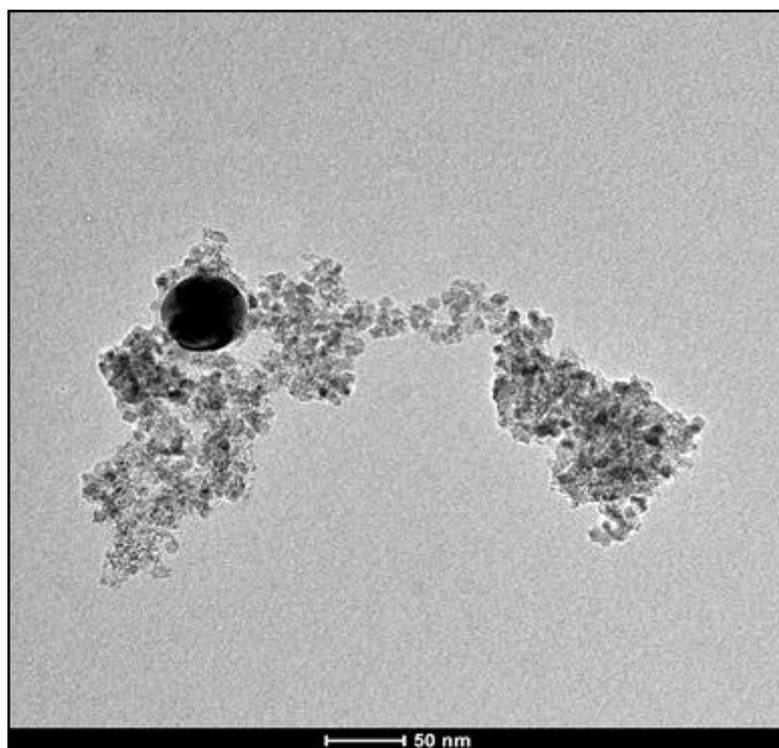


Figura 30- Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da amostra ZAg1.

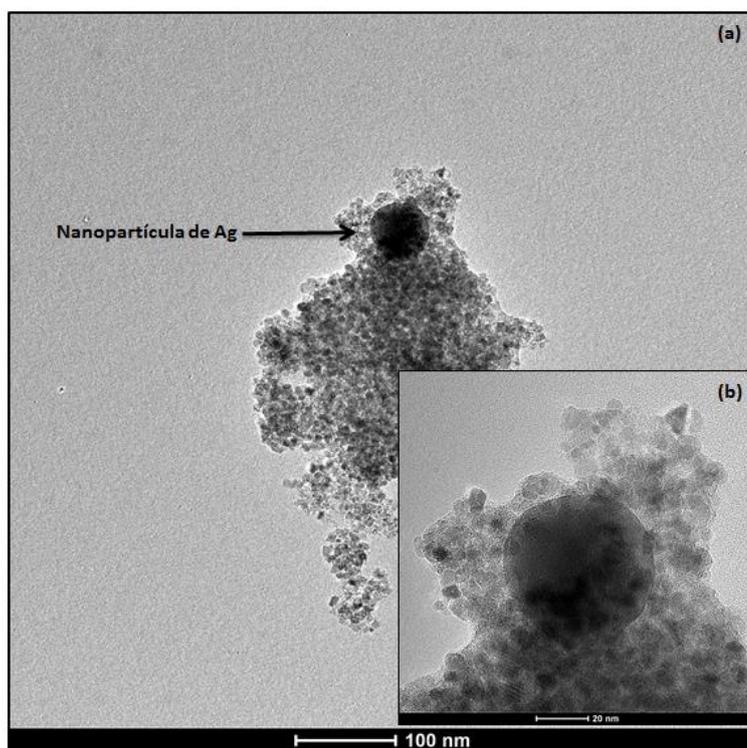


Figura 31- (a) Imagem de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) da amostra ZAg10; (b) Ampliação da imagem.

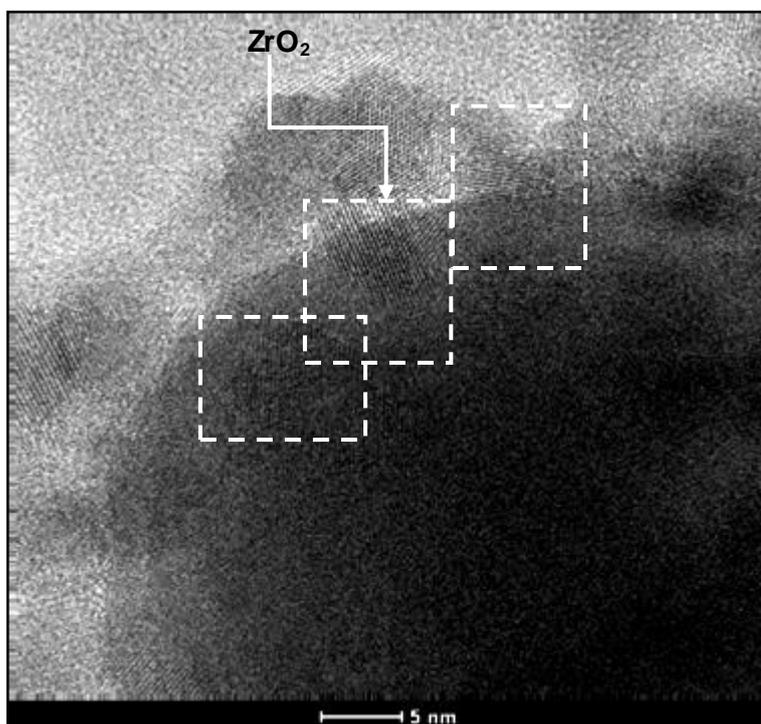


Figura 32- Detalhe da imagem obtida por TEM do ancoramento de ZrO₂ sobre a nanopartícula de Ag da amostra ZAg10.

A imagem por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) revelou a formação de nanopartículas cristalinas de ZrO_2 com tamanho da ordem de 10 nm para a amostra Z, Figura 29(a). A imagem da Figura 29(b) em detalhe tornou evidente os planos cristalinos do ZrO_2 .

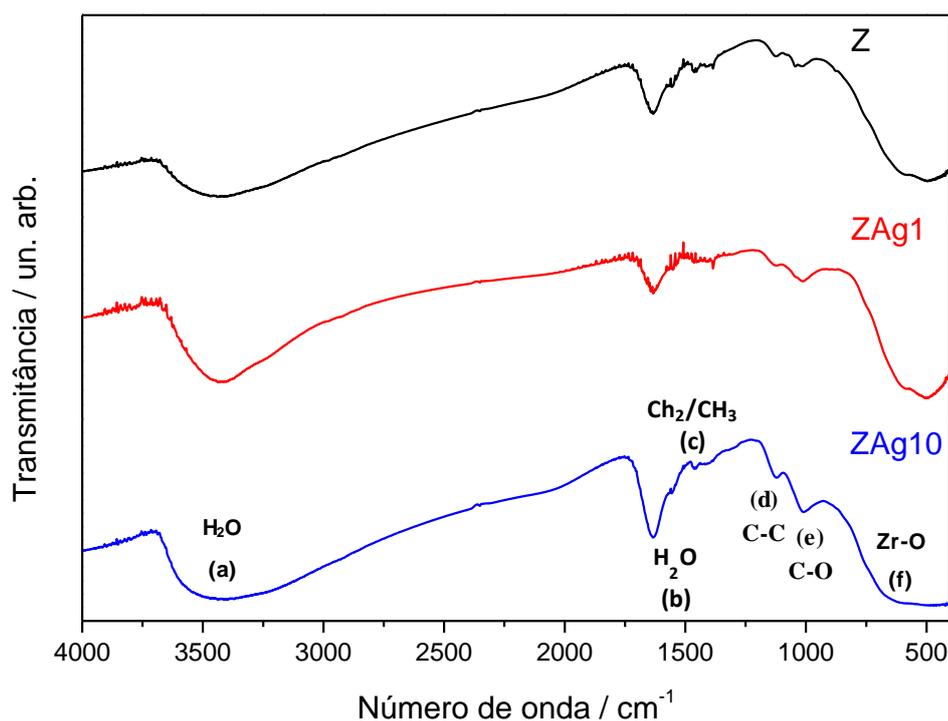
As Figura 30 e 31 referem-se as amostras ZAg1 e ZAg10, respectivamente, às quais possibilitaram a visualização de nanopartículas de Ag esféricas, além dos aglomerados de partículas também esféricas de ZrO_2 , assim como foi visualizado na amostra Z. A Figura 32 mostra em detalhe nanopartículas de ZrO_2 cristalinas ancoradas sobre a superfície da partícula de prata. Sendo assim, os resultados de de Z, ZAg1 e ZAg10 apresentados até o momento corroboram com os difratogramas de raios-x.

6.4 Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de transmitância na região do infravermelho para as amostras sintetizadas foram obtidas na região de 400 a 4000 cm^{-1} .

Os espectros de infravermelho são apresentados na Figura 33 para a identificação dos grupos funcionais da matéria orgânica residual presente nas amostras.

Figura 33- Espectro na região do infravermelho das amostras Z, ZAg1 e ZAg10 obtidas através da rota hidrotermal.



Em todas as amostras sintetizadas foram observadas bandas largas centradas em 3430 (a) e 1635 cm^{-1} (b), as quais são atribuídas ao estiramento OH (simétrico e assimétrico) e as vibrações de deformação angular das moléculas de água, respectivamente. A banda próxima a 1460 cm^{-1} (c) é atribuída ao balanço antissimétrico CH_3 e ao balanço do CH_2 (modo tesoura). As bandas próximas a 1125 (d) e 1015 cm^{-1} (e), estão relacionadas com os estiramentos C-C e C-O do precursor butóxido, respectivamente. A banda larga na região de 800-400 cm^{-1} (f) está relacionada com a ligação Zr-O.

6.5 Caracterização por Termogravimetria (TG)

A quantificação da matéria orgânica residual e do teor de água presente nas amostras foi realizada através da termogravimetria, Figura 34.

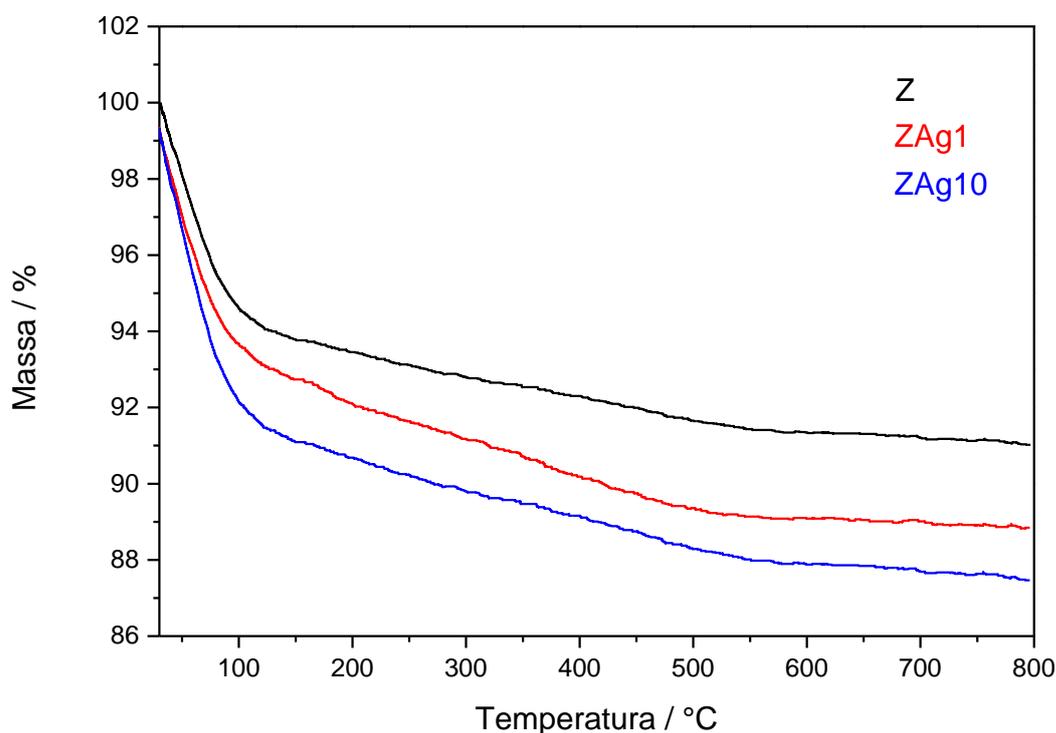


Figura 34- Curvas termogravimétricas das amostras obtidas através síntese hidrotermal.

As curvas TG mostradas na Figura 34 indicam que as nanopartículas apresentam dois eventos principais de decomposição térmica. O primeiro evento ocorre no intervalo de 35-150 °C e atribuiu-se essa perda às moléculas de água adsorvidas na superfície da nanoestrutura do ZrO_2 , enquanto que o segundo evento, o qual ocorreu no intervalo de 150-650 °C, sendo que ocorre em duas etapas, é atribuído a decomposição da matéria orgânica devido ao butóxido não ter oxidado durante o tratamento hidrotermal. As porcentagens referentes às perdas de massa foram listadas na Tabela 5.

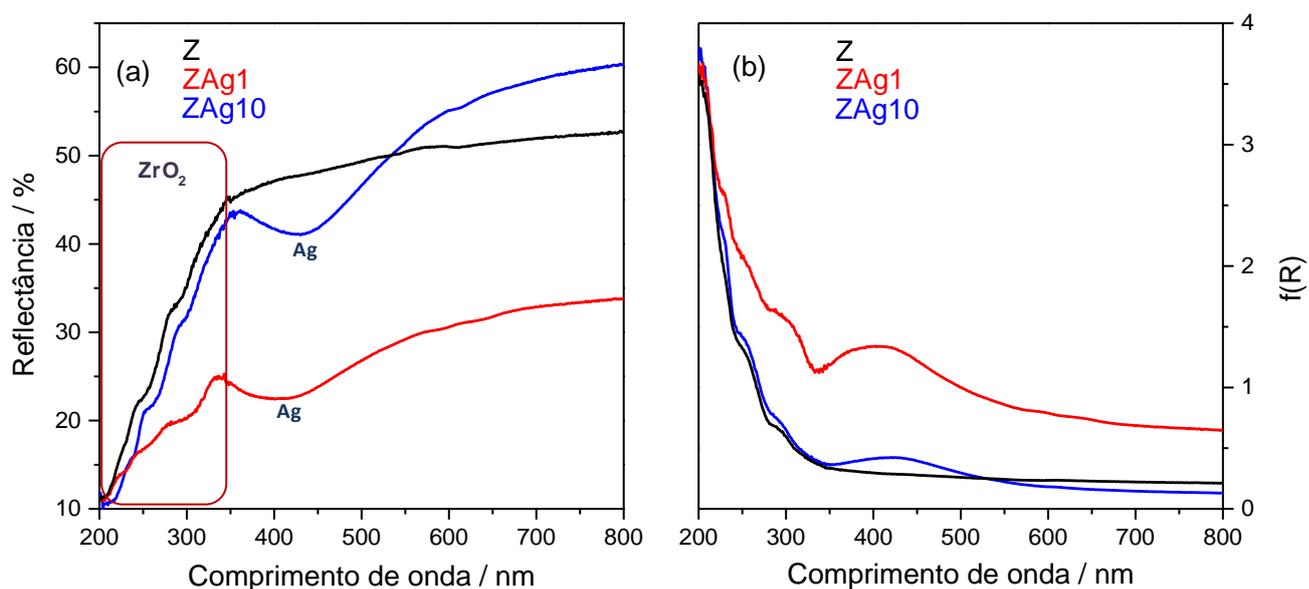
Tabela 5- Dados referentes às etapas da decomposição térmica das nanopartículas.

Evento	Z	ZAg1	ZAg10	Intervalo	Atribuição
1	6,24 %	4,95 %	6,18 %	30-150 °C	Perda de água adsorvida na superfície
2	2,46 %	2,77 %	2,44 %	150-650 °C	Perda da matéria orgânica
1 + 2	8,70%	7,72%	8,62%	30-650 °C	Perda total

6.6 Caracterização por Espectroscopia na região do UV-VIS

Os espectros de reflectância difusa são apresentados na Figura 35(a). Os espectros em função de $f(R)$ são apresentados na Figura 35(b).

Figura 35- Espectros de (a) reflectância difusa e (b) $f(R)$ para as amostras sintetizadas através do método hidrotermal.



Os espectros de reflectância difusa são apresentados na Figura 36(a) e pode ser notado que a banda referente à zircônia inicia-se próximo a 350 nm nas três amostras. Plotando os espectros em função de $f(R)$ (Figura 36(b)) e aplicando a função de Kubelka-Munk, o *band gap* foi determinado através das tangentes, encontrou-se os valores apresentados na Tabela 6. Os valores encontrados para os materiais Z, ZAg1 e ZAg10, via rota hidrotermal estão em concordância com o valor do *band gap* da zircônia tetragonal encontrado na literatura de aproximadamente 5,10 eV¹¹⁶.

Outros trabalhos apresentaram bandas de transição para ZrO₂ em fase monoclinica a 210 nm (5,93 eV) e 240 nm (5,17 eV) e em fase tetragonal a 243nm (5,1 eV)⁹⁸. Por outro lado, Scheithauer⁹⁹ e colaboradores apresentam valores de 240 nm (3,81 eV) e 325 nm (5,17 eV), sendo que o segundo valor foi atribuído a bandas da fase tetragonal da ZrO₂. Em outro trabalho, apresentado por Ranjan Sahu e Ranga Rao⁹⁸, mostraram a presença de picos de ZrO₂ em fase monoclinica com máximo em 214 nm.

Existe certa discrepância em relação aos valores das bandas atribuídas ao ZrO₂ na literatura, como supracitado. Isso pode ocorrer devido à diferença de metodologia utilizada para sintetizar os materiais, além da metodologia escolhida na preparação das amostras, pois a literatura mostra que o valor do *band gap* pode estar relacionado com o método de preparação, morfologia e/ou as condições experimentais (temperatura de tratamento térmico e tempo de processamento)¹⁰⁰.

No espectro das amostras ZAg1 e ZAg10, notou-se a presença da banda de ressonância plasmônica da prata em 405 e 424 nm, respectivamente. A presença da banda para a prata está em concordância com a morfologia esférica para a prata, corroborando com a literatura, ao qual apresenta a banda da prata em 407nm, conforme ilustrado na Figura 36⁸¹.

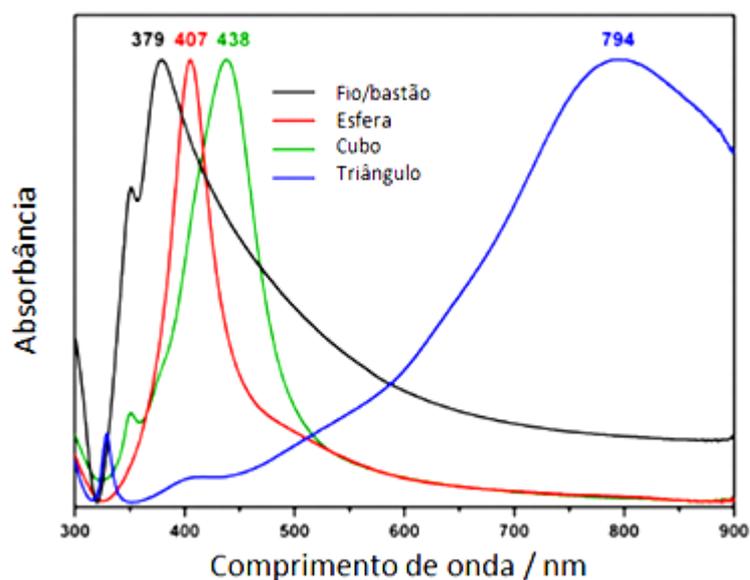


Figura 36- Espectro da banda de ressonância plasmônica da prata nas morfologias bastão, esfera, cubo e triângulo. (Fonte: Adaptado de RYCENGA et al., 2011).

Observou-se também que com o aumento do cristalito das nanopartículas de prata, houve um deslocamento para região de menor energia (maior comprimento de onda) da banda de ressonância plasmônica.

Tabela 6- Valores do *band gap* do ZrO_2 e da banda de *plasmon* da prata obtidos através dos espectros de reflectância difusa para os materiais Z, ZAg1 e ZAg10.

Amostra	Band gap (ZrO_2)	Banda de <i>plasmon</i> da Ag
Z	5,21 eV	-
ZAg1	5,16 eV	405 nm
ZAg10	5,18 eV	424 nm

6.7 Avaliação Antimicrobiana por Cinética de Crescimento, Determinação da Viabilidade Bacteriana pelo Método Colorimétrico e por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O efeito antibacteriano das amostras sintetizadas Z, ZAg1 e ZAg10 foram avaliados por cinética de crescimento por um período de 6 horas, por determinação da viabilidade bacteriana pelo método colorimétrico e por MEV, para os microrganismos *E. coli*, *S. aureus* MSSA e MRSA.

A cinética de crescimento teve como parâmetro o tempo e a concentração das nanopartículas, ao qual foi analisado do início ao final de cada ensaio, nos tempos: 0h, 2h, 4h e 6h. As concentrações de nanopartículas utilizadas para os ensaios foram: 2,0, 1,0, 0,5 e 0,25 mg/ml.

Todos os ensaios foram realizados em quadruplicadas por amostra para avaliar o resultado final com base na média e, com três a quatro repetições.

Para melhor entendimento dessa etapa, a cinética de crescimento bacteriano foi acompanhada da análise de MEV (Microscopia Eletrônica de Varredura) com a intenção de visualizar as possíveis alterações morfológicas na parede celular das bactérias, *E. coli* e *S. aureus* MRSA tratadas com os nanomateriais Z e ZAg10. Portanto, para cada tempo de tratamento, uma imagem de microscopia será apresentada na sequência.

A Figura 37 (a-c), apresentada a seguir, refere-se à cinética de crescimento para a bactéria *E. coli* e a Figura 37(d) refere-se à porcentagem de inibição bacteriana pelo método colorimétrico.

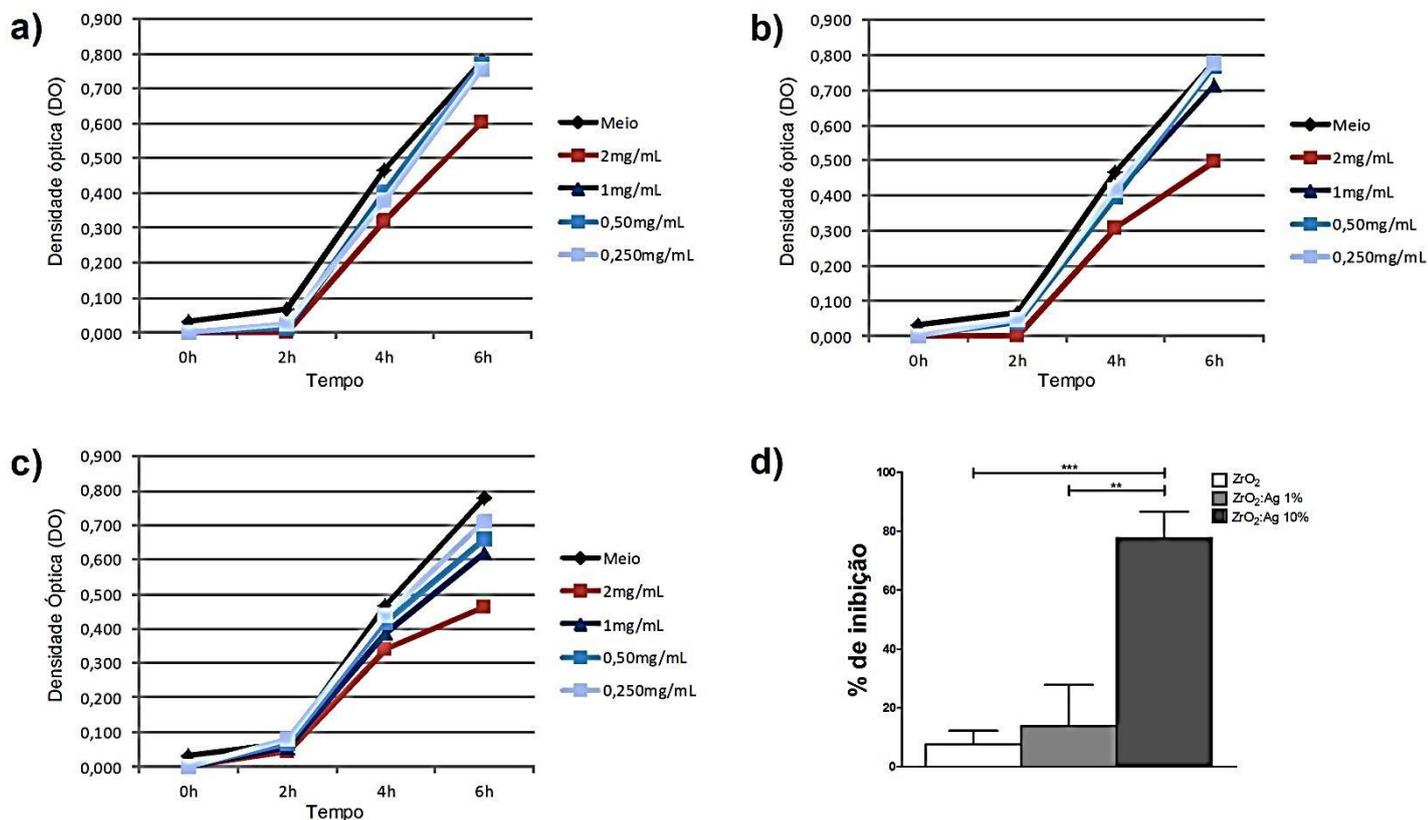


Figura 37- Cinética do crescimento de *E.coli* por densidade óptica (DO) na presença de (a) Z; (b) ZAg1; (c) ZAg10 (concentrações de 0,25mg/ml a 2mg/ml). Bactérias foram cultivadas, sob agitação, a 37°C por 6h. (d) Determinação da porcentagem de inibição bacteriana após 6h de tratamento com as nanopartículas na concentração de 2mg/ml (teste t-pareado, n=4, ** p < 0,01; *** p < 0.001).

As Figuras 38 e 39 referem-se à microscopia (MEV) da cinética de crescimento para a *E. coli*.

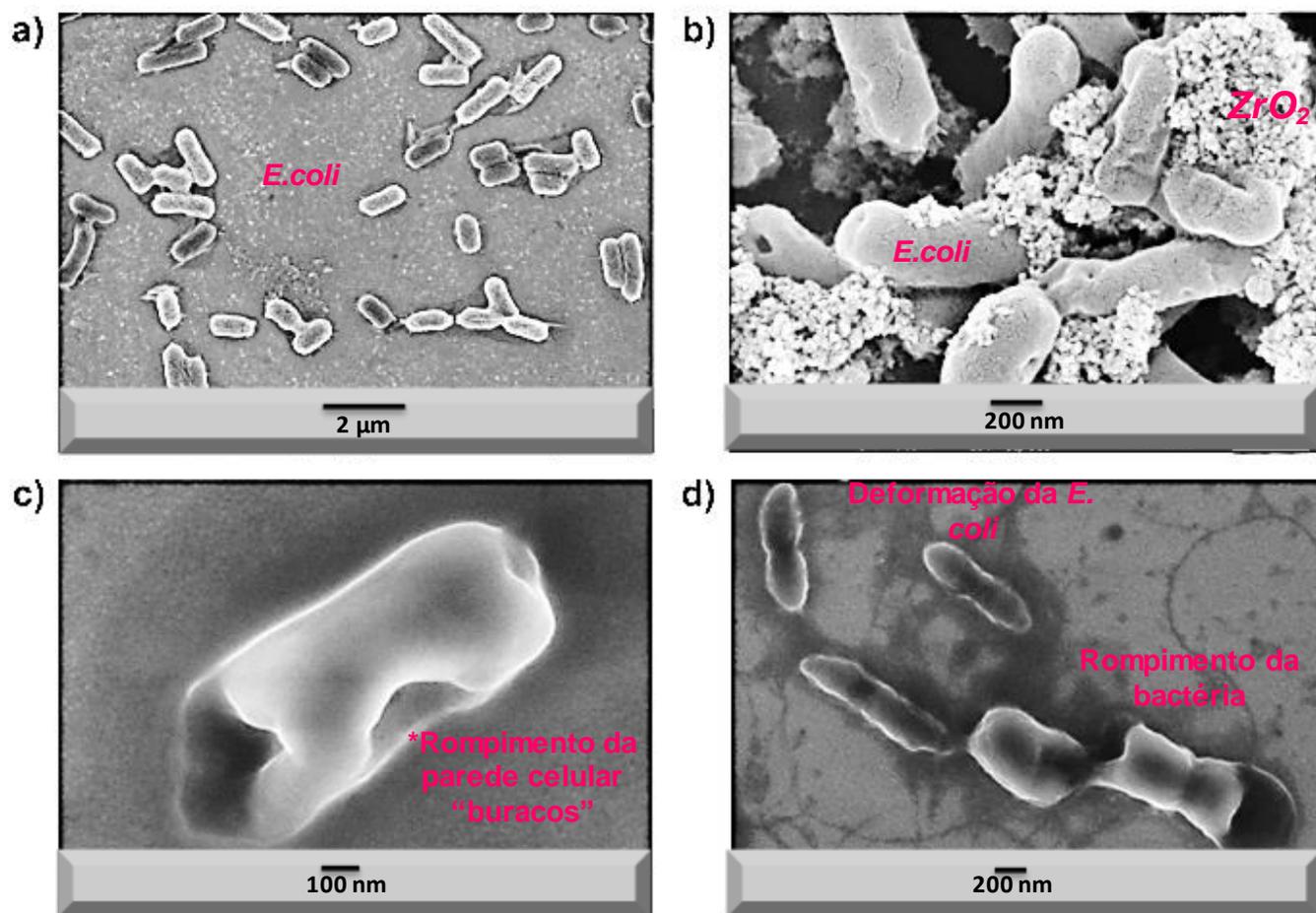


Figura 38- Microscopia eletrônica de varredura de *E. coli* (a) tempo zero, com aumento de 15 mil vezes; (b) 2 horas, com aumento de 45 mil vezes; (c) 4 horas, com aumento de 100 mil vezes e (d) 6 horas, com aumento de 42 mil vezes, após o tratamento com ZrO_2 .

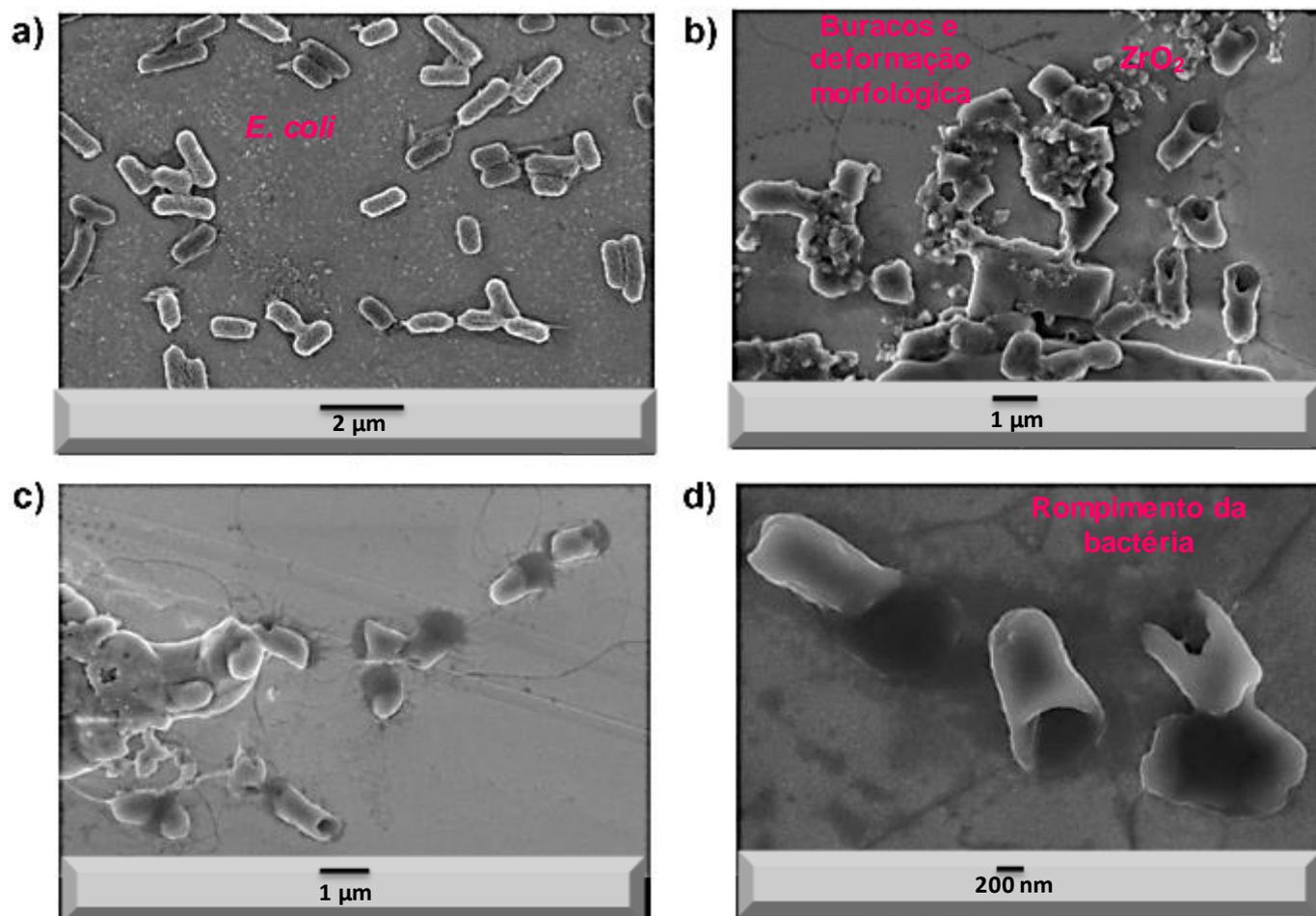


Figura 39- Microscopia eletrônica de varredura de *E.coli* (a) tempo zero, com aumento de 15 mil vezes; (b) 2 horas, com aumento de 33 mil vezes; (c) 4 horas, com aumento de 20 mil vezes e (d) 6 horas, com aumento de 10 mil vezes, após o tratamento com $ZrO_2:Ag$ 10%.

Nas condições ensaiadas, a cinética de crescimento por densidade óptica (DO), Figura 36(a-c) para a bactéria *E. coli* apresentou melhor resultado de inibição bacteriana com concentração de 2 mg/ml para todas as nanopartículas testadas. Esse resultado corrobora com a literatura^{117,118,119}. Entretanto, Z apresentou efeito bacteriostático de 9%, ZAg1 de 13% e ZAg10 de 77%, como mostra a Figura 36(d).

As Figuras 37 e 38 apresentam as microscopias para os ensaios da cinética de crescimento para os nanomateriais Z e ZAg10, respectivamente. Foi possível observar que no tempo 0h as bactérias estavam com morfologias estruturais perfeitas, para ambas as Figuras, ou seja, parede celular intacta. No tempo de 2h para as bactérias tratadas com ZrO_2 , Figura 37 (b) foi possível visualizar uma

pequena deformação morfológica na parede celular de algumas bactérias, entretanto, para o mesmo tempo as bactérias tratadas com $ZrO_2:Ag$ 10% apresentaram além da deformação na parede celular, o rompimento da estrutura celular, Figura 39 (b). O mesmo acontece no tempo de 4h, Figura 39 (c). No final do tratamento com as nanopartículas, tempo de 6h, observou-se na Figura 38(d) bactérias inteiras, com pouca deformação na parede celular, além de uma bactéria rompida, enquanto na Figura 38(d) observaram-se as bactérias rompidas.

Comparando os resultados da cinética para as bactérias tratadas com ZrO_2 e $ZrO_2:Ag$ 10%, reforça-se o efeito da prata, de modo a inativar e/ou, eliminar as bactérias. Desse modo, os ensaios de MEV corroboraram o estudo cinético.

A Figura 40 (a-c), apresentada a seguir, refere-se ao estudo cinético da bactéria *S. aureus* MSSA. A Figura 40 (d) apresenta a porcentagem de inibição bacteriana pelo método colorimétrico, após as 6 horas de tratamento com as nanopartículas.

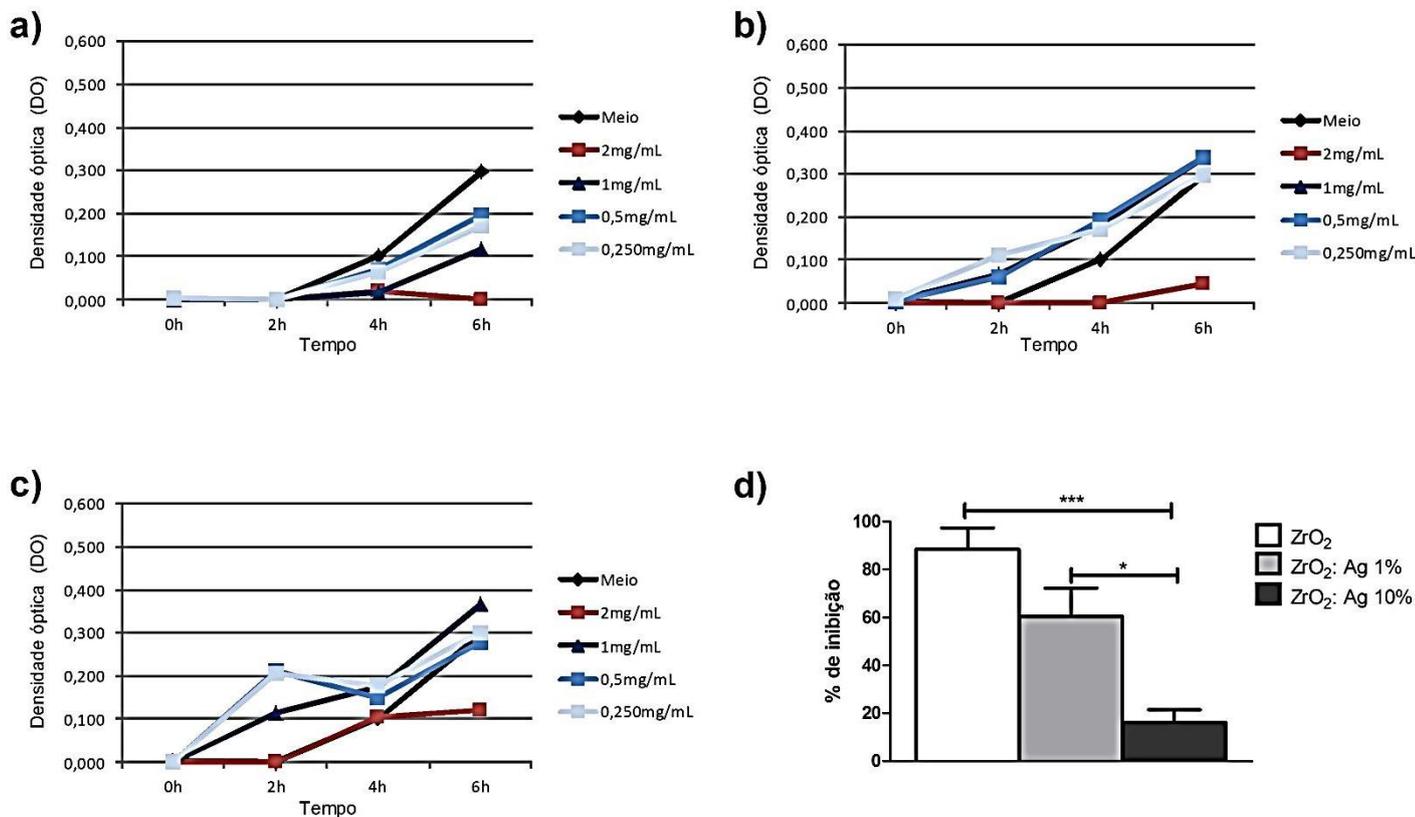


Figura 40- Cinética do crescimento de *S.aureus* MSSA na presença de (a) Z; (b) ZAg1; (c) ZAg10 (concentrações de 0,25 mg/ml a 2 mg/ml. Bactérias foram cultivadas, sob agitação, à 37°C por 6h. (d) Determinação da porcentagem de inibição bacteriana após 6h de tratamento com as nanopartículas na concentração de 2mg/ml (teste t-pareado, n=4, * p < 0,1; *** p < 0,001).

Nas condições ensaiadas, a cinética de crescimento por densidade óptica (DO), Figura 40, para a bactéria *S.aureus* MSSA apresentou melhor resultado de inibição bacteriana com concentração de 2 mg/ml para todas as nanopartículas testadas, assim como para a *E. coli*, como supracitado. Entretanto, Z apresentou efeito bacteriostático de 90%, ZAg1 de 60% e ZAg10 de 18%, como mostra a Figura 40(d).

A Figura 41 (a-c), apresentada abaixo, refere-se ao estudo cinético de crescimento para a bactéria *S. aureus* MRSA.

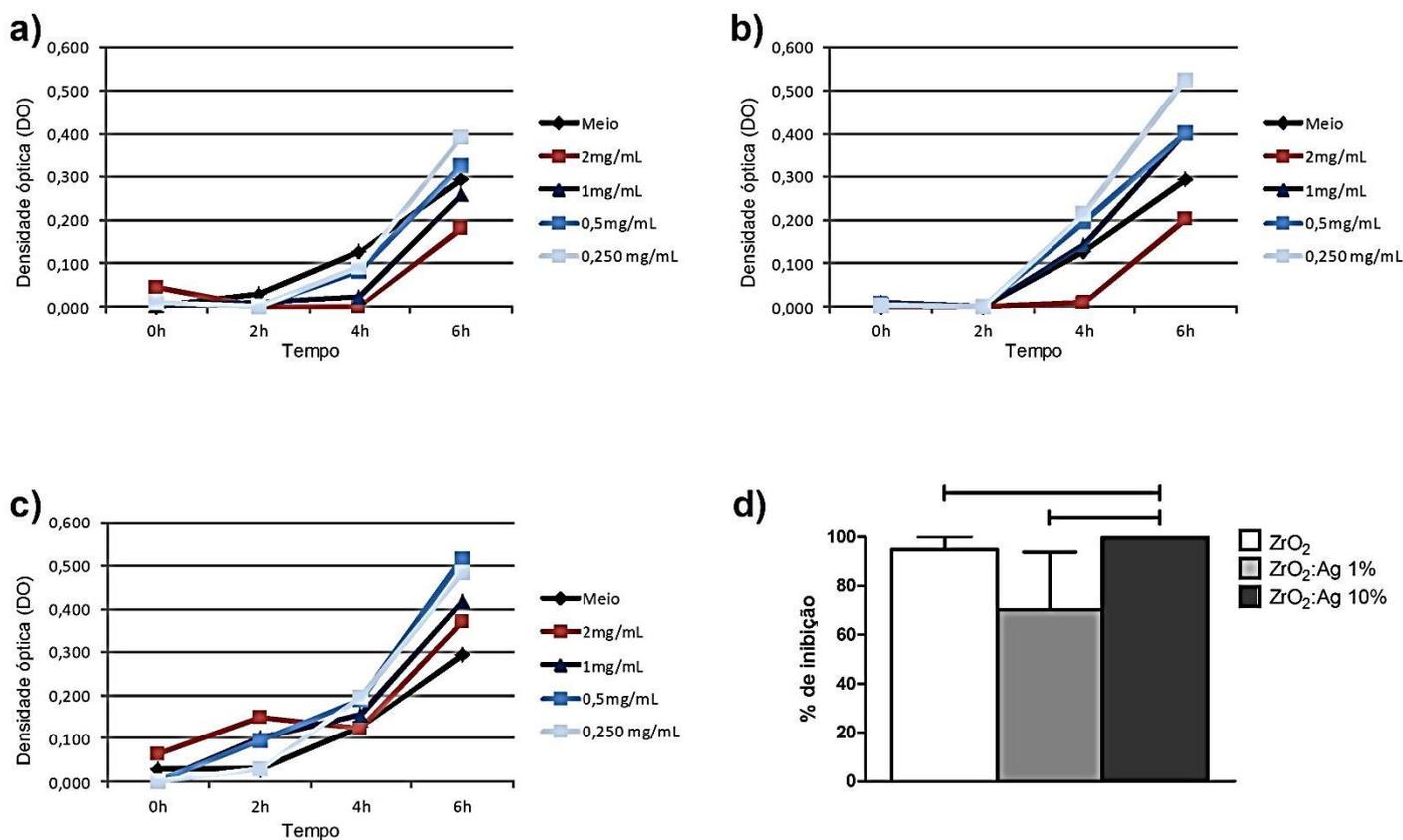


Figura 41- Cinética do crescimento de *S.aureus* MRSA na presença de (a) Z; (b) ZAg1; (c) ZAg10 (concentrações de 0,25mg/ml a 2mg/ml. Bactérias foram cultivadas, sob agitação, a 37°C por 6h. (d) Determinação da percentagem de inibição bacteriana após 6h de tratamento com as nanopartículas na concentração de 2mg/ml (teste t-pareado, n=4, p > 0,03).

As Figuras 42 e 43 referem-se à microscopia (MEV) da cinética de crescimento para a *S. aureus* MRSA.

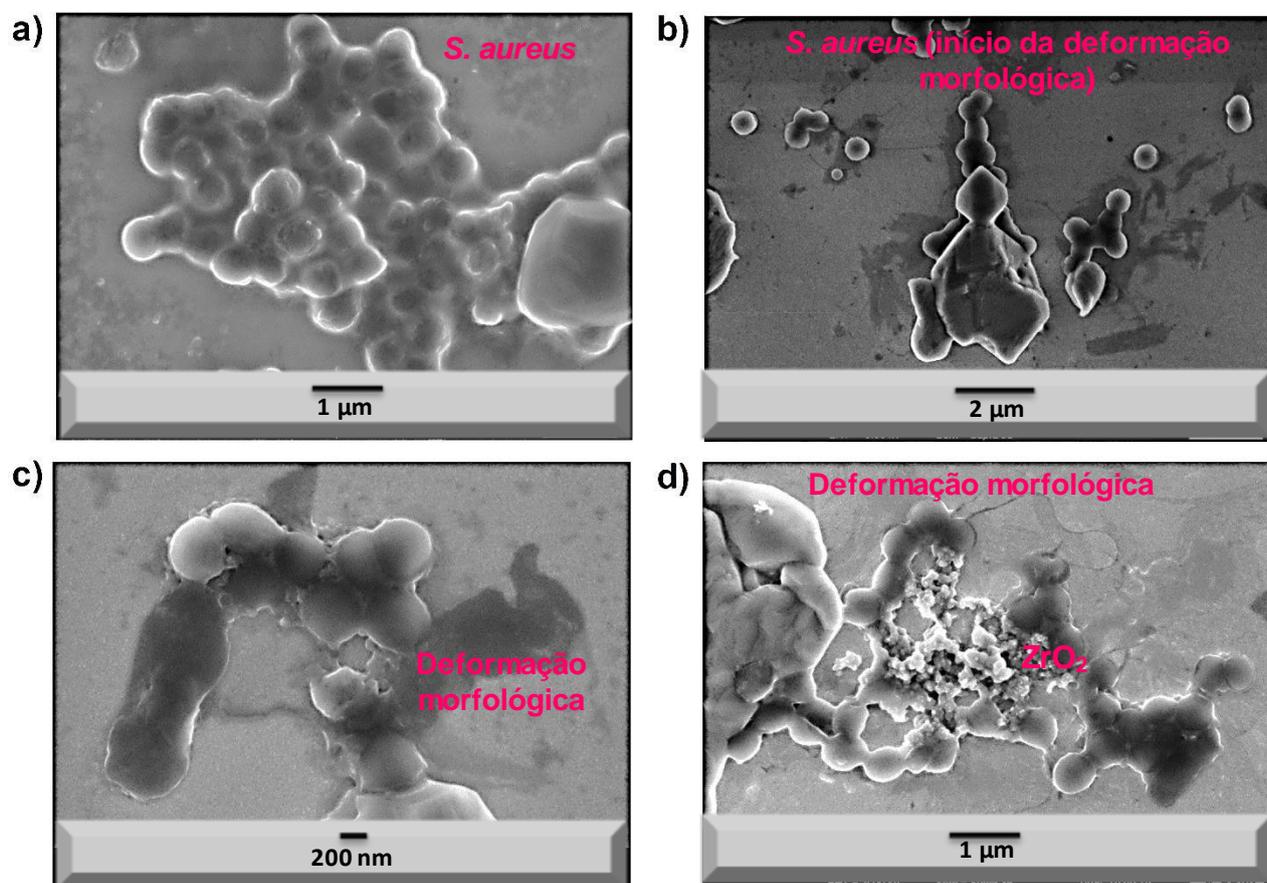


Figura 42- Microscopia eletrônica de varredura de *S.aureus* MRSA (a) tempo zero, com aumento de 27 mil vezes; (b) 2 horas, com aumento de 14 mil vezes; (c) 4 horas, com aumento de 40 mil vezes e (d) 6 horas, com aumento de 25 mil vezes, após o tratamento com ZrO₂.

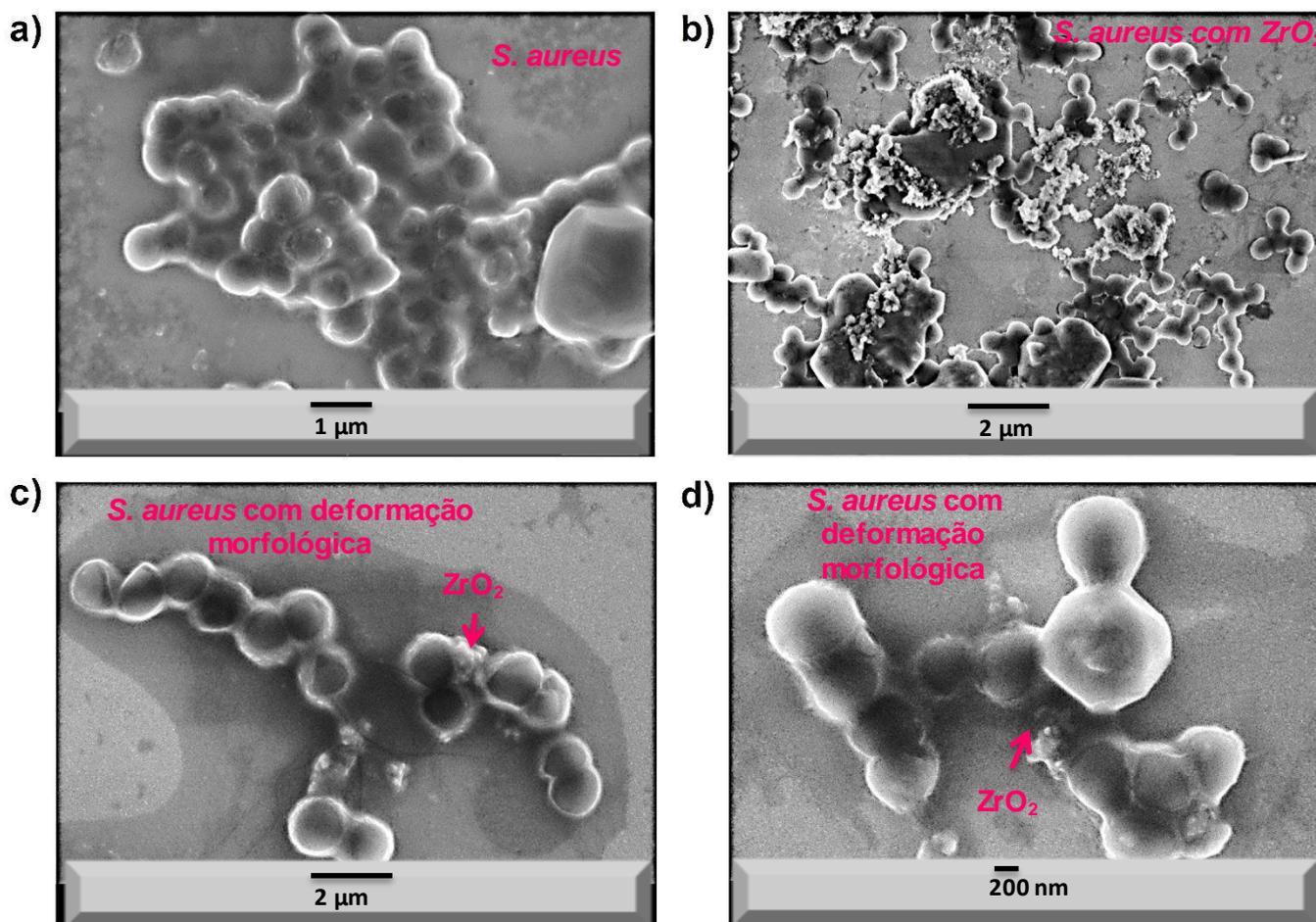


Figura 43- Microscopia eletrônica de varredura de *S. aureus* MRSA (a) tempo zero, com aumento de 27 mil vezes; (b) 2 horas, com aumento de 15 mil vezes; (c) 4 horas, com aumento de 32 mil vezes e (d) 6 horas, com aumento de 43 mil vezes, após o tratamento com $ZrO_2:Ag$ 10%.

Nas condições ensaiadas, a cinética de crescimento por densidade óptica (DO), Figura 41 para a bactéria *S. aureus* MRSA, apresentou melhor resultado de inibição bacteriana com concentração de 2 mg/ml para todas as nanopartículas testadas, assim como para os outros microrganismos supracitados. As nanopartículas de ZrO_2 , amostra Z apresentou efeito bacteriostático de 96%, ZAg1 de 68% e ZAg10 de 99%, como mostra a Figura 40(d).

As Figuras 42 e 43 apresentam as microscopias para os ensaios da cinética de crescimento para os nanomateriais Z e ZAg10, respectivamente. Foi possível observar que no tempo 0h as bactérias estavam com morfologias estruturais perfeitas, para ambas as Figuras, ou seja, parede celular intacta. Nos tempos seguintes, 2h, 4h e 6h, foi possível pouca variação na morfologia celular das

bactérias, pois no tempo 0h a bactéria possuía morfologia esférica, após o tratamento com os nanomateriais, Z e ZAg10, as bactérias apresentaram-se menos esféricas, com aparência “murcha”, porém, não foi possível visualizar rompimento na parede celular.

Comparando os resultados da cinética para as bactérias tratadas com ZrO_2 e $ZrO_2:Ag$ 10%, foi possível avaliar que a ação das nanopartículas são praticamente as mesmas, com inibição de 96 e 99%, respectivamente, portanto as MEV corroboraram com o estudo cinético.

Para facilitar o entendimento deste trabalho, a tabela 7 apresenta os resultados de inibição bacteriana.

Tabela 7- Porcentagem de inibição bacteriana das nanopartículas ZrO_2 , $ZrO_2:Ag$ 1% e $ZrO_2:Ag$ 10% nas concentrações ensaiadas de 2 mg/ml.

Bactéria	Inibição Bacteriana (%) das nanopartículas nas concentrações de 2 mg/ml		
	ZrO_2	$ZrO_2:Ag$ 1%	$ZrO_2:Ag$ 10%
<i>E. coli</i>	09	13	77
<i>S. aureus</i> MSSA	90	60	18
<i>S. aureus</i> MRSA	96	68	99

Conforme os resultados apresentados, nas condições ensaiadas para a bactéria *E. coli*, as nanopartículas de ZrO_2 e $ZrO_2:Ag$ 1% não apresentaram efeito bacteriostático satisfatório, sendo 9 e 13%, respectivamente, já as nanopartículas com 10% de prata apresentaram efeito de 77%. Para a bactéria *S. aureus* MSSA o resultado com melhor eficiência foi para ZrO_2 , 90% de inibição, seguidos de 60% com 1% de Ag, e baixa eficiência para nanopartículas com 10% de Ag, de apenas 18%. A *S. aureus* MRSA tratada com ZrO_2 apresentou efeito bacteriostático de 96%, seguidos de 68% para $ZrO_2:Ag$ 1% e 99% para $ZrO_2:Ag$ 10%. É importante esclarecer que os testes com *S. aureus* serão refeitos, devido à discrepância entre a densidade óptica (DO) controle positivo e os valores testes.

De acordo com esses dados, a concentração mínima inibitória (CMI) das nanopartículas para a *E. coli* foi eficiente quando associada com prata, na

concentração de 10%, enquanto para as *S. aureus* a CMI foi eficiente para nanopartículas de ZrO_2 com ou sem prata.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a toxicidade de nanopartículas às bactérias, nanopartículas com tamanho menor de 15 nm são mais eficientes, pois ficam adsorvidas sobre a superfície da membrana celular e, em seguida, difundem-se para a célula e afetam as funções celulares, incluindo replicação e respiração, as quais levam à morte celular¹²⁰.

A tendência de inibição de óxidos com metais, como $ZrO_2:Ag$ exibe uma elevada inibição de crescimento bacteriano por causa do efeito sinérgico, ou seja, as partículas espalham-se em células através da membrana, então as nanopartículas de Ag são lentamente oxidadas para Ag^+ causando danos graves para as funções celulares, de modo que ambos os efeitos levam a uma morte celular rápida¹²⁰.

Na literatura, estudos sugerem que o efeito das nanopartículas de prata é mais intenso em bactérias Gram-negativas^{121,122}. A diferença de sensibilidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é atribuída à estrutura da parede celular destes microrganismos. A parede celular de bactérias Gram-negativas é composta de uma camada fina de peptídeoglicano de 2 nm, localizada entre a membrana citoplasmática e da membrana externa, e de uma camada de lipopolissacarídeo^{93,120,122}. As bactérias Gram-positivas não possuem membrana externa, mas, a parede celular é composta de uma camada de peptídeoglicano mais espessa, de 15 ~ 80 nm, ligado a peptídeos curtos, formando uma estrutura rígida, dificultando a impregnação das nanopartículas de prata para dentro da célula^{93,122}.

De acordo com RAVIKUMAR e GOKULAKRISHNAN¹¹⁷, o efeito biocida das nanopartículas de ZrO_2 dependem do tempo de tratamento, podendo variar de acordo com tempo de aplicação. O mecanismo de inibição bactericida pode ser através do estresse oxidativo na parede celular que aumenta a produção de enzimas lactato desidrogenase (LDH), que é um indicador de dano da membrana celular.

THAKARE e colaboradores, sintetizaram ZrO_2 na fase tetragonal utilizando o método sol-gel e testaram as nanopartículas com as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, segundo os pesquisadores a concentração de 15,62 $\mu g/ml$ foi considerada a mínima inibitória para eliminação de 50% das bactérias¹¹⁹. Sugerem também que o

desempenho antimicrobiano de nanopartículas de ZrO_2 ocorre devido ao estresse oxidativo, pois nanopartículas de ZrO_2 inibem o crescimento de células de *S. aureus* por acumulação ou deposição na superfície da bactéria. Também é sugerido que as nanopartículas de ZrO_2 são capazes de retardar o crescimento de *E. coli* devido à desorganização das membranas da bactéria, o que aumenta a permeabilidade da membrana levando à acumulação de nanopartículas na membrana bacteriana e regiões citoplasmáticas de células¹¹⁹.

Assim, frente aos nossos resultados, é possível que a sinergia entre ZrO_2 e Ag estejam inativando a *E. coli* através da destruição das funções celulares. Para as bactérias *S. aureus* MSSA e MRSA, ZrO_2 mostrou-se altamente eficiente, pois inativou ambas as bactérias com a mesma concentração relatada na literatura, porém, com maior eficiência e menor tempo de cultura.

Para maior clareza dos resultados, um estudo mais detalhado e com diversas ampliações das microscopias será apresentado a seguir. Esses resultados mostram que há danos visíveis na parede celular das bactérias após tratamento com as nanopartículas.

A Figura 44(a) e 44(b) refere-se à microscopia das bactérias *E. coli* e *S. aureus* MRSA, respectivamente, antes do tratamento com as nanopartículas.

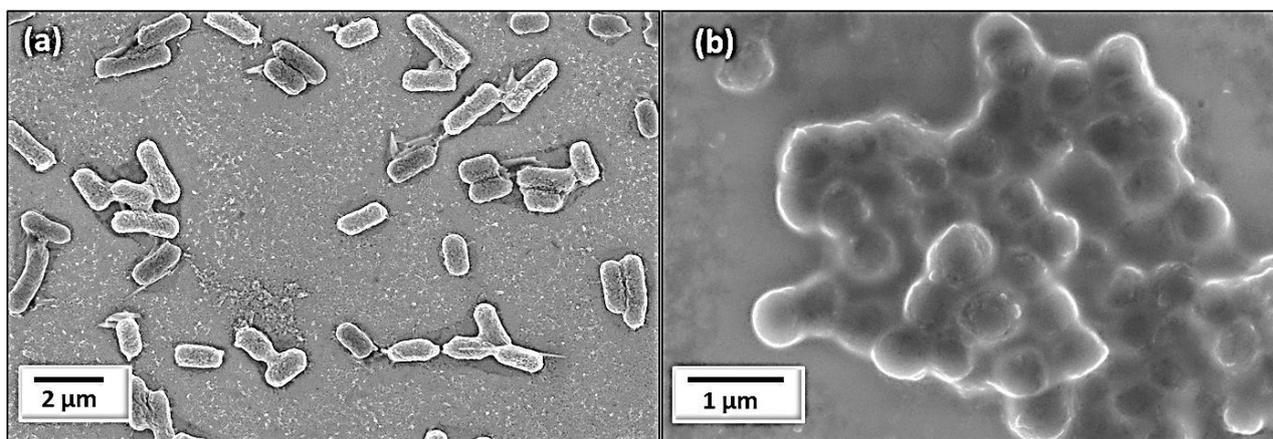


Figura 44- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das bactérias antes do tratamento com as nanopartículas. (a) Imagem da *E. coli* com aumento de 15 mil vezes. (b) Imagem da *S. aureus* MRSA com aumento de 27 mil vezes.

Na imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura, Figura 44 (a) observou-se as bactérias *E. coli* intactas, notou-se também o formato bastonete das bactérias.

A Figura 44 (b) refere-se às bactérias *S. aureus*, também intactas, com morfologia esférica.

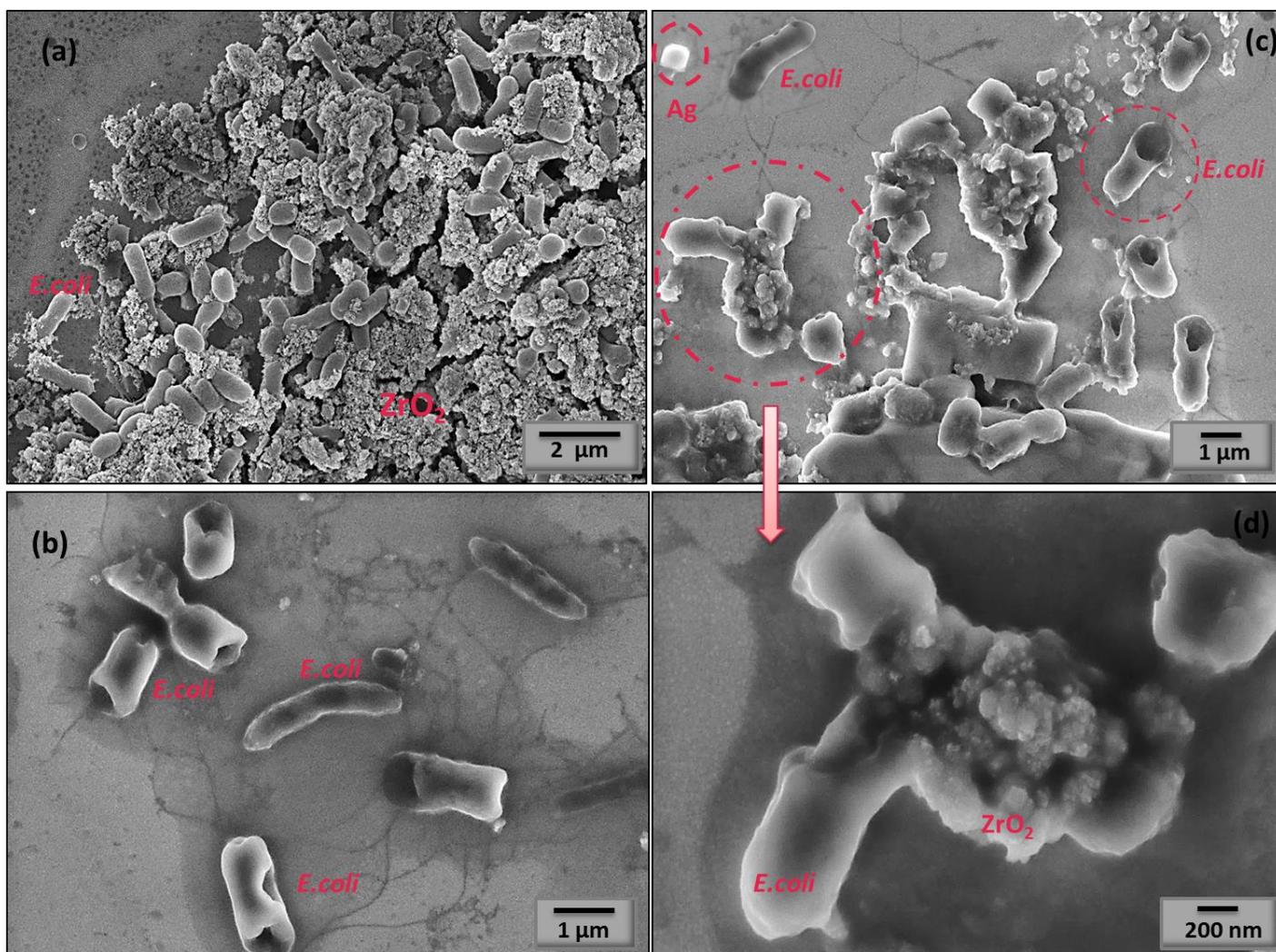


Figura 45- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (a) *E. coli* com nanopartículas de ZrO₂:Ag 10% antes de incubar, imagem com aumento de 12 mil vezes. (b) *E. coli* com ZrO₂ após 2h de incubação, imagem com aumento de 25 mil vezes. (c) *E. coli* com ZrO₂ e Ag após 6h de incubação, imagem com aumento de 20 mil vezes. (d) Detalhe de uma *E. coli* com ZrO₂ após 6h de incubação, imagem com aumento de 60 mil vezes.

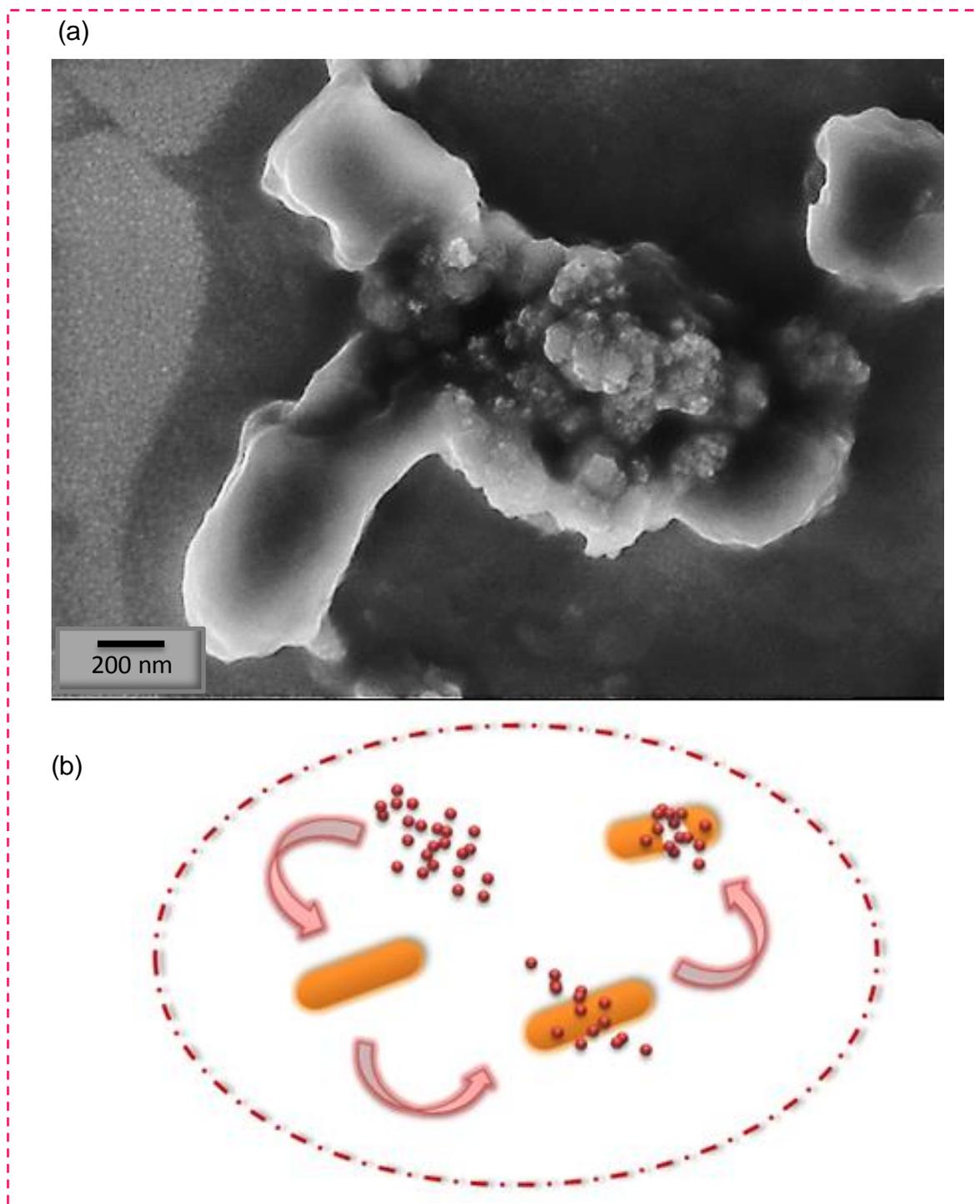


Figura 46 - (a) Bactéria *E. coli* com nanopartículas de $ZrO_2:Ag10\%$ e (b) esquema ilustrativo de inativação bacteriana. No início do esquema a bactéria encontra-se com morfologia perfeita, inalterada. Após a ação das nanopartículas é possível visualizar sua estrutura rompida.

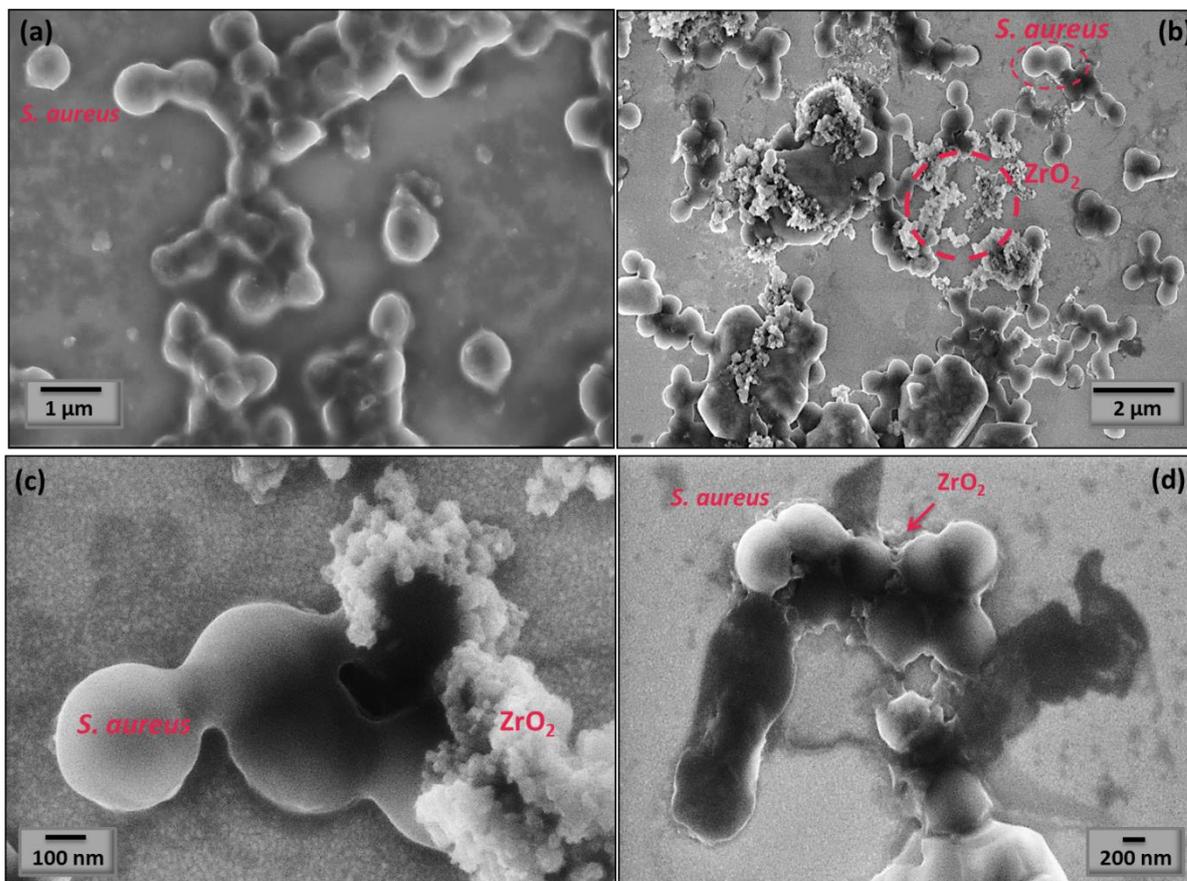


Figura 47- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). (a) *S.aureus* MRSA imagem com aumento de 25 mil vezes, antes de incubar. (b) *S.aureus* com nanopartículas de ZrO_2 com 2h de tratamento, imagem com aumento de 15 mil vezes. (c) *S.aureus* com nanopartículas de ZrO_2 após 4h de incubação, imagem com aumento de 100 mil vezes. (d) *S.aureus* com nanopartículas de ZrO_2 após 6h de incubação, imagem com aumento de 45 mil vezes.

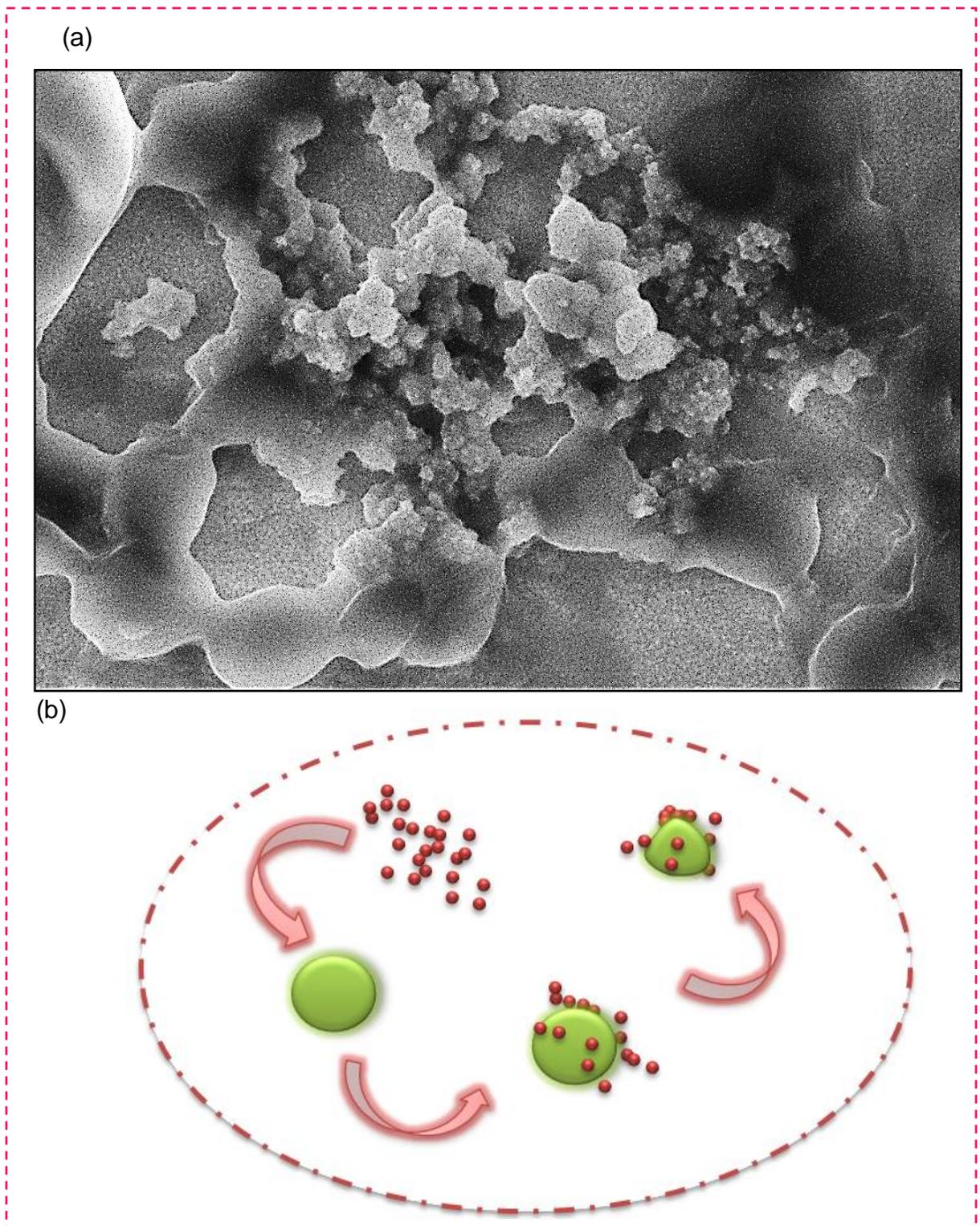


Figura 48- (a) Bactéria *S.aureus* com nanopartículas de ZrO_2 e (b) esquema ilustrativo de inativação bacteriana. No início do esquema a bactéria encontra-se com morfologia perfeita, inalterada. Após a ação das nanopartículas é possível visualizar sua estrutura deformada.

A micrografia da Figura 45 (a) refere-se às bactérias *E. coli* com nanopartículas de $ZrO_2:Ag$ antes de incubar, foi possível observar que as bactérias estão envolvidas pelas nanopartículas, entretanto, como o tempo de incubação é 0, não foi possível observar variação na estrutura das bactérias. Na Figura (b), após 2h de tratamento com as nanopartículas foi possível observar buracos na parede celular de algumas bactérias, outras rompidas, além de algumas levemente torcidas. Na Figura (c) observou-se a maior parte das bactérias danificadas, também foi possível visualizar uma partícula de prata em destaque na microscopia. A Figura (d) refere-se a uma bactéria danificada, em destaque, com aumento de 60 mil vezes. Foi possível visualizar um aglomerado de nanopartículas e a bactéria totalmente desestruturada.

A Figura 46 é uma ampliação de uma bactéria danificada envolvida por nanopartículas de ZrO_2 com um esquema ilustrativo de inativação bactericida.

Notou-se muitos buracos produzidos nas membranas das células tratadas com nanopartículas de $ZrO_2:Ag$ 10%, além de bactérias destruídas, isso nos leva ao entendimento de que as nanopartículas podem provocar a oxidação celular, através dos íons Ag^+ produzidos, ou ainda ligar-se sobre a superfície da célula, devido às interações eletrostáticas entre o nanomaterial e a membrana celular, pois as superfícies de bactérias são carregadas negativamente, devido aos grupos fosfatos. Já as nanopartículas são óxidos metálicos com Ag metálica, sendo assim possuem carga ligeiramente positiva, fazendo com que a deformação das paredes celulares. Isto afeta as funções bacterianas através da interação com outros componentes bacterianos, levando a morte bacteriana.

A micrografia da Figura 47 (a) refere-se às bactérias *S. aureus* MRSA antes de incubar. Observaram-se bactérias com morfologia esférica. A Figura (b) apresentou bactérias *S. aureus* com 2h de tratamento, foi possível observar que as bactérias estão envolvidas pelas nanopartículas, entretanto, não foi possível observar variação na estrutura das bactérias. Na Figura (c), após 4h de tratamento com as nanopartículas foi possível observar as bactérias alterando sua morfologia, com aparência mais maleáveis e levemente torcidas, além de algumas envolvidas por aglomerados de nanopartículas. Na Figura 47 (d), refere-se às bactérias no final do tratamento, após as 6h. Observou-se a maior parte das bactérias danificadas,

também foi possível visualizar uma partícula de prata em destaque na microscopia. Notou-se que nenhuma bactéria apresentou-se rompida ou totalmente degenerada, apenas apresentaram redução volumétrica, devido à resposta do agente agressor, ou seja, as nanopartículas.

A Figura 48 é uma ampliação de bactérias *S. aureus* danificadas, envolvidas por nanopartículas de ZrO_2 com um esquema ilustrativo de inativação bactericida. Com a ampliação foi possível visualizar a deformação morfológica das bactérias.

Portanto, nossos resultados são importantes na medida em que fornecem novas evidências de se utilizar ZrO_2 e $ZrO_2:Ag$ em ações que visem o manejo de resíduos biológicos e na prevenção/inibição de contaminação em materiais cirúrgicos e hospitalares.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas de ZrO_2 e ZrO_2 com Ag através do método hidrotermal com parâmetros tempo e temperatura definidos.

Foram produzidas nanopartículas cristalinas de ZrO_2 tetragonal e Ag cúbica, com morfologia esférica por rota hidrotérmica.

Foram obtidas nanopartículas de ZrO_2 com tamanhos entre 7 e 10 e nanopartículas de prata com tamanho médio de entre 40 e 50 nm.

As técnicas de termogravimetria e espectroscopia na região do infravermelho indicaram e permitiram quantificar e identificar a presença de matéria orgânica residual do processo de síntese nas nanopartículas, respectivamente.

Os espectros de reflectância difusa na região do ultravioleta e visível permitiram calcular o *band gap* do ZrO_2 , no valor médio de 5,19 eV, o qual está em concordância com os valores encontrados na literatura para a fase tetragonal da zircônia. Foram também notados a presença da banda plasmon nos espectros, referente à Ag 1% e 10% com 405 e 424 nm, respectivamente.

Os ensaios biológicos revelaram que ZrO_2 apresentou maior eficiência bacteriostática para *S. aureus* MRSA e MSSA, com inibição de 96 e 90% respectivamente, e para *E. coli* de apenas 9%. Quando ZrO_2 foi associado a 1% de Ag, a inibição foi de 13% para a *E. coli*, 60 e 68% para as *S. aureus* MSSA e MRSA, respectivamente. O resultado mais eficiente para a *E. coli* foi para ZrO_2 com 10% de Ag, com efeito bacteriostático de 77%. Para a *S. aureus* MRSA ZrO_2 com 10% de Ag inibiu praticamente todas as bactérias, com eficiência de 99%, porém o mesmo não ocorreu para a MSSA, pois o efeito bacteriostático foi de apenas 18%.

Diante do exposto, fica claro que as nanopartículas foram eficientes para inibição e/ou inativação das bactérias. Portanto, os prováveis mecanismos de interação das nanopartículas com os microrganismos são:

- Para a *E. coli*, o melhor efeito de inibição de crescimento bacteriano foi com as nanopartículas de ZrO_2 com 10% de Ag, isso se deve ao sinergismo entre as espécies, pois as partículas se espalham sobre as

células através da membrana e a Ag se oxida e causa danos para as funções celulares, levando a morte das bactérias.

- Para as espécies *S. aureus* MSSA e MRSA, ZrO_2 apresentou-se eficiente, pois as nanopartículas possuem pequena dimensão e conseguem difundir-se sobre a parede celular, causando danos às bactérias. Nanopartículas associadas com Ag também foram eficientes, porém necessitam de maiores investigações para uma conclusão mais coerente.

A diferença de resultados entre a *E. coli* e a *S. aureus* se deve à diferença das paredes celulares das bactérias, Gram-negativa e Gram-positiva, respectivamente.

Estes resultados mostraram um excelente potencial tanto para ZrO_2 puro como para ZrO_2 com 10% Ag para o tratamento de resíduos biológicos e materiais de revestimento hospitalares, a fim de reduzir ou impedir a contaminação por *E. coli* e *S. aureus*.

Próximas etapas

Diante dos resultados e do potencial biocida do ZrO_2 , dentro deste contexto e para uma melhor compreensão do presente trabalho, pretende-se:

- 1- Aprofundar o estudo sobre os mecanismos de ação bactericida das nanopartículas de ZrO_2 com Ag.
- 2- Avaliar o efeito das nanopartículas na formação *in vitro* de biofilmes.

8. REFERÊNCIAS

- 1 LIMA, R.; AMEDEA, B.; DURÁN, N. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. **Applied Toxicology**, 2012.
- 2 ANDRADE, D. D., ANGERAMI, E. L., & PADOVANI, C. R. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Revista de saúde pública**, 163-169, 2000.
- 3 QUANG, Q. H.; NGUYEN, V. Q.; LE, A. T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. **Advances in natural sciences: nanoscience and nanotechnology**, 2012.
- 4 SPERLING, M. V. Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuais – Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 4 ed. Minas Gerais: ABES, 452 p. 2014.
- 5 PRADO, C. P. **Estudo Comparativo De Agentes Inibidores De Crescimento Bacteriano Utilizados Para Tratamento Dos Esgotos Domésticos**. Santos, 2015.
- 6 BRAGA, E. S. et al. Eutrophication and Bacterial Pollution Caused by Industrial and Domestic Wastes at the Baixada Santista Estuarine System Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 165-173. 2000.
- 7 PANDEY, S. et al. A comparative study of economical separation and aggregation properties of biologically capped and thiol functionalized gold nanoparticles: Selecting the eco-friendly trojan horses for biological applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 25 – 31. 2013.

- 8 LIN, C. ZHANG, C. LIN, J. Phase transformation and Photoluminescence properties of Nanocrystalline ZrO_2 powders prepared via the pechini-type sol – gel process. **J. Phys. Chem.**, 3300 – 3307. 2007.
- 9 WAN, B. SHU, X. CHEN, X. FENG, Q. Hydrothermal synthesis and phase stability of Pb satabilized ZrO_2 nanoparticles. **Solid State Sciences**, 73 – 78. 2014.
- 10 PUIGDOLLERS, A.; ILLAS, F.; PACCHIONI, G. Structure and Properties of Zirconia Nanoparticles from Density Functional Theory Calculations. **The Journal of Physical Chemistry C**, 4392-4402, 2016.
- 11 SAKTHIVEL, S. et al. Enhancement of photocatalytic activity by metal deposition: caracterization and photonic eficiente of Pt, Au and Pd deposited on TiO_2 catalyst. **Water Research**, 3001 – 3008. 2004.
- 12 KŐRÖSI, L. et al. Ultrasmall, Ligand-Free Ag Nanoparticles with High Antibacterial Activity Prepared by Pulsed Laser Ablation in Liquid. **Journal of Chemistry**, 2016.
- 13 COLLADO, L.; et al. Enhacement of hydrocarbon production via artificial photosynthesis due to synergetic effect of Ag supported on TiO_2 and ZnO. **Chemical Engineering Journal**, 128 – 135. 2013.
- 14 FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potenciais de aplicação em catálise. **Química Nova**, 32, 2009.
- 15 FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom. In: Annual Meeting of the Americam Physical Society, 20 dez 1959. California Institute of Technology

- (Caltech). **Eng Sci. California: Caltech**, fev 1960. Acesso em 05 de julho de 2015.
- 16 DREXLER, E.; PETERSON, C., Unbounding the Future: the Nanotechnology Revolution, **William Morrow and Company, Inc.**, New York, 1991.
- 17 EIGLER, M.; SCHWEIZER, E. K. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. **Nature**, 344, 524 – 526. 1990.
- 18 MADHUMITHA, G; ROOPAN, S. M. Devastated Crops: Multifunctional Efficacy for the Production of Nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, 1-12. 2013.
- 19 BEHRA, R. et al. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. **J. R. Soc. Interface**, 10, 2013.
- 20 SHARMA, V. K.; YNGARD, R. A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, 145, 83–96. 2009.
- 21 RICCARDI, C. S.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A.C. Engineered nanomaterials: nanotoxicology issues, nanosafety and regulatory affairs. **Cultura Acadêmica**. 2015.
- 22 KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, 3. 95 – 101, 2007.
- 23 MU, H. et al. Potent Antibacterial Nanoparticles against Biofilm and Intracellular Bacteria. **Scientific reports**, 6, 2016.

- 24 KANDASAMY, S. K.; PALANISAMY, M. Optical and structural study of Ag/ZrO₂/SiO₂ planar waveguide structure. **Conference on Electrical, Electronics and Computer Science**, 978 -1. 2012.
- 25 BALDINOZZI, G.; SIMEONE, D.; GOSSET, D.; DUTHEIL, M. Neutron diffraction study of the size – induced tetragonal to monoclinic phase transition in zirconia nanocrystals. **Physical Review Letters**, 90, 21, 2003.
- 26 GARCIA, E. T.; BARRANCO, A. P.; RAMOS, C. V.; FUENTES, G. A. Thermal and structural characterization of the ZrO_{2-x}(OH)_{2x} to ZrO₂ transition. **Materials Research Society**, 16, 8, 2001.
- 27 PICONI, C.; MACCAURO, G. Zirconia as a ceramic biomaterial. **Biomaterials**, 20, 1-25. 1999.
- 28 DAGUANO, J. K. M. F.; TEIXEIRA, L. H. P.; SANTOS C.; KOIZUMI M. H.; ELIAS, C. N. O Compósito ZrO₂-Al₂O₃ para Aplicação como Implante Odontológico. **Revista Matéria**, 11, 4, 455 – 462. 2006.
- 29 BRAILSFORD, A.D.; YUSSOUFF, M.; LOGOTHETIS, E.M. A first-principles model of the zirconia oxygen sensor. **Sensors and Actuators**, 44, 321–326. 1997.
- 30 KURANAGA, C.; RIBEIRO, F. S.; FILGUEIRA, M. Sintering of rare earth-doped zirconia under 5 GPa pressure. **Cerâmica**, 51, 163-167. 2005.
- 31 BELLI, R.; SCHERRER, S.; REICH, S.; PETSCHERT, A.; LOHBAUER, U. In vivo shell-like fractures of veneered-ZrO₂ fixed dental prostheses. **Case Studies in Engineering Failure Analysis**, 2, 91–99. 2014.

- 32 NANBA, T. et al. Morphology of active species of Ag/ZrO₂ for low-temperature soot oxidation by oxygen. **Catal. Sci. Technol.**, 2, 1961–1966. 2012.
- 33 Chen, X. et al. Supported silver nanoparticles as photocatalysts under ultraviolet and visible light irradiation. **Green Chem.**, 12, 414–419. 2010.
- 34 ASHARANI, P. V.; MUN, G. L. K.; HANDE, M. P.; VALIYAVEETIL, V. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **Acsnano**, 3, 279–290. 2009.
- 35 WEI, L. et al. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, 20, 2015.
- 36 PILLAI, Z. S.; KAMAT, P. V. What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? **J. Phys. Chem.**, 108, 945-951. 2004.
- 37 GARCIA, J. C. et al. Structural, electronic, and optical properties of ZrO₂ from ab initio calculations. **Materials Science**, 1, 2006.
- 38 PARK, H. G.; KIM, H. J.; KIM, M. S.; LEE, I. H.; SEO, D. S. Electro-optical characteristics of ZrO₂ nanoparticle doped liquid crystal on ion-beam irradiated polyimide layer. **J Nanosci Nanotechnol**, 5587-91. 2012.
- 39 KEUKELEERE, K. et al. Fast and Tunable Synthesis of ZrO₂ Nanocrystals: Mechanistic Insights into Precursor Dependence. **Inorg. Chem.**, 54, 3469 – 3476. 2015.
- 40 SCHELLING, P. K.; PHILLPOT, S. R.; WOLF, D. Mechanism of the Cubic-to-Tetragonal Phase Transition in Zirconia and Ytria-Stabilized Zirconia by Molecular-Dynamics Simulation. **J. Am. Ceram. Soc.**, 84, 1609–19. 2001.

- 41 GALLINO, F.; VALENTIN, C. D.; PACCHIONI, G. Band gap engineering of bulk ZrO_2 by Ti doping. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, 13, 17667-17675. 2011.
- 42 GIONCO, C. et al. Paramagnetic Defects in Polycrystalline Zirconia: An EPR and DFT Study. **Chem. Mater.**, 25, 2243–2253. 2013.
- 43 KARUNAKARAN, C.; SENTHILVELAN, S. Photocatalysis with ZrO_2 : Oxidation of aniline. **Journal of Molecular Catalysis A Chemical**, 233, (1):1-8, 2005.
- 44 BRAILSFORD, A.D.; YUSSOUFF, M.; LOGOTHETIS, E. M. A first-principles model of the zirconia oxygen sensor. **Sensors and Actuators**, 44, 321–326. 1997.
- 45 JONES, S. A.; BOWLER, P.G.; WALKER, M.; PARSONS, D. Controlling wound bioburden with a novel silver-containing hydrofiber dressing. **Wound Repair Regen**, 12,3, 288- 94. 2004.
- 46 CATAURO, M.; RAUCCI, M. G.; DE GAETANO, F. D.; MAROTTA, A. Antibacterial and bioactive silver-containing $Na_2O - CaO - 2SiO_2$ glass prepared by sol-gel method. **J Mater Sci Mater Med**, 15, 7,831-7. 2004.
- 47 CRABTREE, J. H.; BURCHETTE R. J.; SIDDIQI, R. A.; HUEN, I. T.; HANDOTT, L. L.; FISHMAN, A. The efficacy of silver-ion implanted catheters in reducing peritoneal dialysis-related infections. **Perit Dial Int**, 23, 368- 74. 2003.
- 48 ZHAO, G.; STEVENS, S. E. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. **Biometals**, 11, 27-32. 1998.

- 49 SONDI, I.; SONDI, B. S. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**, 275, 177–182. 2004.
- 50 MORONES, R. J. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, 16. 2005.
- 51 KIM, J. K. et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on Candida albicans. **Biometals**, 22, 235-242. 2009.
- 52 PRADEEP, T. Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. **Thin Solid Films**, 517, 6441– 6478. 2009.
- 53 ZHANG, J. et al. Preparation and Characterization of Novel Polyethersulfone Hybrid Ultrafiltration Membranes Bending with Modified Halloysite Nanotubes Loaded with Silver Nanoparticles. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 51, 3081–3090. 2012.
- 54 NOGUEIRA, P. F. M.; PAINO, I. M. M.; ZUCOLOTTO, V. Nanosilver: Propriedades, Aplicações e Impactos na Saúde Pública e Meio Ambiente. **Vigilância Sanitária em Debate**, 1(4): 59-71. 2013.
- 55 BYRAPPA, K.; YOSHIMURA, M. Handbook of hydrothermal technology. New York. **Noyes Publications**, 2001.
- 56 KATAOKA, F. P. “Estudo da eficiência fotocatalítica em função da morfologia de nanoestruturas de TiO₂ sintetizadas pelo método hidrotérmico”. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais). Universidade Estadual Paulista, Bauru, 2011.

- 57 CHENG, H.M. et al. Hydrothermal preparation of uniform nanosize rutile and anatase particles. **Chemical Materials**,7, 663,1995.
- 58 SHERRY, L. J. et al. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Triangular Nanoprisms. **Nano Letters**, 6, 2060 – 2065. 2006.
- 59 ASLAN, K.; LAKOWICZ, J. R.; GEDDES, C. D. Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. **Elsevier**, 9, 538–544. 2005.
- 60 MOORES, A.; GOETTMANN, F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to theory and applications. **New J. Chem.**, 30, 1121–1132, 2006.
- 61 JENSEN, T. R.; MALINSKY, M. D. Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. **J. Phys. Chem**, 104, 10549-10556. 2000.
- 62 TERYTYUK, G. et al. Gold nanorods with a hematoporphyrin-loaded silica shell for dual-modality photodynamic and photothermal treatment of tumors in vivo. **Nano Research**, 7(3): 325–337. 2014.
- 63 WANG, S. et al. Plasmonic Copper Sulfide Nanocrystals Exhibiting Near-Infrared Photothermal and Photodynamic Therapeutic Effects. **American Chemical Society**, 9, 1788 – 1800. 2015.

- 64 ZHANG, S. et al. Non-noble metal copper nanoparticles-decorated TiO₂ nanotube arrays with plasmon-enhanced photocatalytic hydrogen evolution under visible light. **Elsevier**, 40, 303 – 310. 2015.
- 65 HU, W. et al. Formation of copper nanoparticles on poly(thymine) through surface-initiated enzymatic polymerization and its application for DNA detection. **Analyst**, 140, 5678. 2015.
- 66 LOKESH, K. S. et al. Porphyrin macrocycle-stabilized gold and silver nanoparticles and their application in catalysis of hydrogen peroxide. **Dyes and Pigments**, 120, 155 – 160. 2015.
- 67 CHEN, Z. et. al. Application of triangular silver nanoplates for colorimetric detection of H₂O₂. **Sensors and Actuators B**, 220, 314–317. 2015.
- 68 TSUBOI, A.; NAKAMURA, K.; KOBAYASHI, N. Chromatic control of multicolor electrochromic device with localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles by voltage-step method. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, 2015.
- 69 ZHANG, Y. et al. Surface plasmon enhanced energy transfer between gold nanorods and fluorophores: application to endocytosis study and RNA detection. **Faraday Discuss.**, 178, 383. 2015,
- 70 LIU, Q. et. al. A Sensitive Silver Nanorod/Reduced Graphene Oxide SERS Analytical Platform and Its Application to Quantitative Analysis of Iodide in Solution. **Plasmonics**, 10, 285–295. 2015.

- 71 SILVA, A. G. M. et al. The Fault in Their Shapes: Investigating the Surface-Plasmon Resonance-Mediated Catalytic Activities of Silver Quasi-Spheres, Cubes, Triangular Prisms, and Wires. **Langmuir**, 31, 10272–10278. 2015.
- 72 MOCK, J. J.; BARBIC, M.; SMITH, D. R.; SCHULTZ, D. A.; SCHULTZ, S. Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles. **The Journal of Chemical Physics**, 116, 6755. 2002.
- 73 LEE, K. C. et. al. Size effect of Ag nanoparticles on surface plasmon resonance. **Surface & Coatings Technology**, 202, 5339–5342. 2008.
- 74 SHERRY, L. F.; CHANG, S. H.; SCHATZ, G. C.; DUYNE, P. V. R. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Single Silver Nanocubes. **Nano Letters**, 5, 2034-2038. 2005.
- 75 LIEBSCH, A. Surface-plasmon dispersion and size dependence of Mie resonance: Silver versus simple metals. **The American Physical Society**, 48 (15). 1993.
- 76 AMENDOLA, V.; BAKR, O. M.; STELLACCI, F. A. Study of the Surface Plasmon Resonance of Silver Nanoparticles by the Discrete Dipole Approximation Method: Effect of Shape, Size, Structure, and Assembly. **Plasmonics**, 5, 85 – 97. 2010.
- 77 MUNECHIKA, K.; SMITH, J. M.; CHEN, Y.; GINGER, D. S. Plasmon Line Widths of Single Silver Nanoprisms as a Function of Particle Size and Plasmon Peak Position. **J. Phys. Chem**, 111, 18906-18911. 2007.

- 78 KINNAN, M. K.; CHUMANOV, G. Plasmon Coupling in Two-Dimensional Arrays of Silver Nanoparticles: II. Effect of the Particle Size and Interparticle Distance. **J. Phys. Chem**, 114, 7496–7501. 2010.
- 79 MAILLARD, M.; HUANG, P.; BRUS, L. Silver Nanodisk Growth by Surface Plasmon Enhanced Photoreduction of Adsorbed [Ag⁺]. **Nano Letters**, 11, 1611-1615. 2003.
- 80 CALLEGARI, A.; TONTI, D.; CHERGUI, M. Photochemically Grown Silver Nanoparticles with Wavelength-Controlled Size and Shape. **Nano Letters**, 11, 1565-1568. 2003.
- 81 RYCENGA, M. et. al. Controlling the Synthesis and Assembly of Silver Nanostructures for Plasmonic Applications. **Chem. Rev.**, 111, 3669 – 3712. 2011.
- 82 CALLISTER, W. D. Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma introdução. 7^a Ed. Rio de Janeiro: **LTC**, 2008.
- 83 MOURÃO, H. A. J. L. Novas rotas para a síntese hidrotérmica de nanoestruturas de óxido de titânio. Tese (Doutorado em Ciências área de Físico-Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- 84 RÓZ, A. L.; LEITE, F. L.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA, O. N. Nanociência e nanotecnologia: princípios e aplicações. 1^a Ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2015.

- 85 MOURÃO, H. A. J. L.; MENDONÇA, V. R. Nanoestruturas em fotocatalise: uma revisão sobre estratégias de síntese de fotocatalisadores em escala nanométrica. **Química Nova**, 32, 2181 – 2190. 2009.
- 86 PADOVINI, D. S. S.; PONTES, D. S. L.; DALMASCHIO, J.; PONTES, F. M. L.; LONGO, E. Facile synthesis and characterization of ZrO₂ nanoparticles prepared by the AOP/hydrothermal route. **RSC Adv.**, 4, 38484. 2014.
- 87 CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of Escherichia coli phylogenetic group. **Appl Environ Microbiol**, 66(10):4555-8. 2000.
- 88 Banco de imagens. Disponível em <<http://fciencias.com>>.
- 89 Kaper, J.B.; Nataro, J. P. Pathogenic Escherichia coli. **Nat. Rev. Microbiol.** 2:123-140. 2004.
- 90 ADAMS, M. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem stress. **Maryland: American Fisheries Society Bethesda**, 2002.
- 91 BERNARD, L. et al. Comparative analysis and validation of different assays for glycopeptide susceptibility among methicillin-resistant S. aureus strains. **J Microbiol Meth**, v. 57, p. 231-9, 2004.
- 92 ANDRIOLO, A. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar**. São Paulo: Editora Manole, 2005.
- 93 MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

- 94 SILVA, J. C. "Nanopartículas de prata: biossíntese, investigação das atividades antibacteriana, antifúngica e citotoxicidade". Dissertação (Metabolismo e Biologia Celular). Unicamp-Campinas, SP, 2014.
- 95 GUO, G.Y.; CHEN, Y.L. A nearly pure monoclinic nanocrystalline zirconia. *J. Solid State Chem.* v. 178, p. 1675-1683, 2005.
- 96 M. S. KALISZEWSKI, A. H. HEUER. Alcohol interaction with zirconia powder, **J. Am. Ceram. Soc.** 72, 6, 1504-1509, 1990.
- 97 WALSH, T. R.; ROBIN, A. H. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Ann Rev Microbiol**, v. 56, p. 657-75, 2005.
- 98 RANJAN SAHU, H; RANGA RAO, Characterization of combustion synthesized zirconia powder by UV-Vis, IR and other techniques. **Bulletin of Materials Sciences**, 23, 349-354, 2000.
- 99 SCHEITHAUER, M.; GRASSELLI, R.; KNÖZINGER, H. Genesis and Structure of WO_x/ZrO_2 Solid Acid Catalysts, **Langmuir**, 14, 3019-3029, 1998.
- 100 SCZANCOSKI, J. C. et al. Synthesis, growth process and photoluminescence properties of $SrWO_4$ powders. **Journal of colloid and interface science**, v. 330, n. 1, p. 227-236, 2009.
- 101 TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia. Staphylococcus aureus**. São Paulo: Atheneu, p. 175-82. 2005.
- 102 DONNEL, M.C.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(1), 147-179, 1999.

- 103 MORONES, J.R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, 2005.
- 104 PAL, S.; TAK, Y. K. & SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Applied and environmental microbiology**, 73(6), 1712-1720, 2007.
- 105 WONG, K. K. Y.; LIU, X. Silver Nanoparticles – The Real “Silver Bullet” in Clinical medicine? **Med. Chem. Commun**, v.1, p.125-131. 2010.
- 106 MIRZAJANI, F. et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Research in microbiology**, v. 162, n. 5, 542-549, 2011.
- 107 LÓ, S. M. S. et al. Foto-antibióticos - a luz na fotoinativação de microorganismos. **Rev. Virtual Quim.** 2015, 7,390-402.
- 108 HANDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochem Photobiol.** 1992, 55(1), 145-157.
- 109 CALZAVARA, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: Photochemistry and photobiology. **J. Eur. Acad, Dermatol. Venereol.** 2007, 21(3), 24-29.
- 110 PLAETZER, K.; et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers Med. Sci.** 2009, 24(2), 259-268.

- 111 CASSIDY, C. M.; et al. Drug Delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. **J. Photochem Photobiol B**. 2009, 94, 71-80.
- 112 WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol -2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of Escherichia coli cells. **Journal of Microbiological Methods**. 2010, 82, 330-333.
- 113 HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; Crouch, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6^a ed. Bookman, Porto Alegre, 2009. 2.
- 114 IONASHIRO, M. **Giolito**: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimétrica Exploratória Diferencial. São Paulo; Vésper Editora, 2^a Edição, 18p. 2014.
- 115 QIN, D.; CHEN, H. The influence of alcohol additives on the crystallization of ZrO₂ under hydrothermal conditions. **J. Mater. Sci.** v.41, p. 7059-7063, 2006.
- 116 SAHU, H. R., RAO, G. R. Characterization Of Combustion Synthesized Zirconia Powder By UV-Vis, IR And Other Techniques. **Mater. Sci.**, 2000, 23, 349.
- 117 RAVIKUMAR, S.; GOKULAKRISHNAN, R. The inhibitory effect of metal oxide nanoparticles against poultry pathogens. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 4, n. 2, p. 157-9, 2012.
- 118 DOSKOCZ, N. and ZALESKA-RADZIWIŁŁ, M. "Effects of zirconium oxide nanoparticles on bacterial growth."

- 119 THAKARE, V. G. et al. Evaluation of biological activities of nanocrystalline tetragonal zirconia synthesized via sol-gel method. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 6, p. 125-131, 2016.
- 120 AGUILAR, C. A. H. et al. Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticles for Bacterial Inhibition: Synthesis and Characterization of Doped and Undoped ONPs with Ag/Au NPs. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6002-6021, 2015.
- 121 TAMBOLI, D. P.; LEE, D. S. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. **Journal of hazardous materials**, v. 260, p. 878-884, 2013.
- 122 GUZMAN, M.; DILLE, J.; GODET, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 37-45, 2012.