

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**BRUNA LALLO DA SILVA**

**A INFLUÊNCIA DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS NAS**  
**PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO ZnO**

**ARARAQUARA - SP**

**2017**

**BRUNA LALLO DA SILVA**

**A INFLUÊNCIA DO TAMANHO DAS NANOPARTÍCULAS NAS  
PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO ZnO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Leila Aparecida Chiavacci Favorin

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rosemeire L. Rodrigues Pietro

**ARARAQUARA - SP**

2017

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**S586a** Silva, Bruna Lallo da  
A influência do tamanho das nanopartículas nas propriedades antimicrobianas do ZnO / Bruna Lallo da Silva. -- Araraquara, 2017.  
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Leila Aparecida Chiavacci Favorin.  
Coorientadora: Rosemeire L. Rodrigues Pietro.

1. Nanopartículas. 2. ZnO. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Escherichia coli*. 5. Concentração Inibitória Mínima. 6. Caracterização físico-química. I. Favorin, Leila Aparecida Chiavacci, orient. II. Pietro, Rosemeire L. Rodrigues, coorient. III. Título.

**CAPES: 40500005**

---

BRUNA LALLO DA SILVA

A influência do tamanho das nanopartículas nas propriedades antimicrobianas de ZnO

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestre (a) em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 11 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA



LEILA APARECIDA CHIAVACCI FAVORIN



SANDRA HELENA PULCINELLI



TAIS MARIA BAUAB

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os mestres que passaram pela minha vida, ensinando a nunca desistir, amar e respeitar a profissão escolhida.

*"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina."* (Cora Coralina).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por sua infinita misericórdia, em proporcionar-me sabedoria necessária e paz para a conclusão do presente trabalho, mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha família, especialmente meus pais, **Solange** e **Sérgio**, por me apoiarem em todas as decisões, com amor e carinho, pela preocupação e principalmente, por sempre acreditarem em mim, minha avó **Dolores**, que mesmo sem muitos estudos, sempre é aquela que mais me ensina o significado da palavra sabedoria e determinação, meu irmão **Rafael**, cunhada **Daiane** e meus sobrinhos **Eduardo** e **Lorenzo** pelo apoio e momentos de descontração.

Gostaria de agradecer especialmente ao meu tio **Washington** (in memoriam) por sempre me motivar, com palavras de reconhecimento, apoio e incentivo, nunca esquecerei.

Ao **André**, pelo companheirismo, afeto, paciência e por acreditar nos meus sonhos.

A minha orientadora Prof. Dra. **Leila Aparecida Chiavacci Favorin** pelo auxílio e disponibilidade, transmitindo conhecimentos, com paciência e dedicação. Pela amizade e confiança durante esse trabalho.

A minha coorientadora Prof. Dra. **Rosemeire Linhari Rodrigues Pietro**, por todo apoio e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos do laboratório de Ciências dos Materiais Aplicados à Farmácia- **CMAF**, por todos os ensinamentos, companheirismo e incentivo. Pelos momentos de descontração e afeto, **Aline**, **Bruna**, **Eloísa**, **João**, **Mariluci**, **Marina**, **Nathália** e **Neima**. Gostaria de agradecer especialmente o **Bruno Leonardo Caetano** pelas correções e ideias ao longo do mestrado. Agradeço também aos amigos que fiz durante essa trajetória, **Bruna Castilho**, **Mariana Satto**, **Jéssica Bernegossi**, **Alice Hadad** e **Rodolfo Fini**.

Aos meus amigos e amigas por sempre me acompanharem em todos os momentos, ajudando no que fosse possível, e principalmente, entendendo os momentos de ausência, nunca deixando de lado a mão estendida e pelos momentos de diversão. Amo vocês, **Amanda**, **Tamires**, **Elisa**, **Karine**, **Natália** e **Mariane**.

Ao **Instituto de Química da UNESP/Araraquara**, em especial aos professores **Celso V. Santilli**, **Sandra Helena Pulcinelli** e **Rodrigo Costa Marques** pelo espaço cedido no laboratório para a realização desse trabalho e permissão da utilização de equipamentos para caracterização dos materiais.

Ao **LNLS** pelas medidas de SAXS, Dr **Florian Meneau** pelo suporte durante as medidas.

Ao **laboratório de biotecnologia** por possibilitarem espaço para realização dos testes de atividade antimicrobiana. Ao **Rodrigo** e **Vanessa** pelos conhecimentos transmitidos.

Ao apoio financeiro da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**.

À **Seção de Pós-graduação** e toda **Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)**.

## LISTA DE ABREVIACÕES

**NP:** nanopartículas

**ZnO:** óxido de zinco

**GPTMS:** (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane

**LiOH:** hidróxido de lítio

**MET:** microscopia eletrônica de transmissão

**MEV:** microscopia eletrônica de varredura

**UV-Vis:** espectroscopia na região do ultravioleta visível

**SAXS:** espalhamento de raios X a baixo ângulo

**WAXS:** espalhamento de raios X a alto ângulo

**DRX:** difração de raios X

**EDS:** Espectroscopia de raios X por dispersão de energia

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**CIM:** concentração inibitória mínima

**CBM:** concentração biocida mínima

**ERO:** espécies reativas de oxigênio

**ZnO\_3h:** nanopartículas de ZnO sem modificador de superfície, sintetizadas em 3 horas com temperatura de 50°C

**ZnO\_24h:** nanopartículas de ZnO sem modificador de superfície, sintetizadas em 24 horas com temperatura de 50°C

**ZnO\_GPTMS\_3h:** nanopartículas de ZnO com modificador de superfície (GPTMS), sintetizadas em 3 horas com temperatura de 50°C

**ZnO\_GPTMS\_24h:** nanopartículas de ZnO com modificador de superfície (GPTMS), sintetizadas em 24 horas com temperatura de 50°C

**ZnO\_3h\_mufla:** ZnO\_3h submetido ao tratamento térmico na mufla

**ZnO\_24h\_mufla:** ZnO\_24h submetido ao trabalho térmico na mufla

**ZnO\_GPTMS\_3h\_mufla:** ZnO\_GPTMS\_3h submetido ao tratamento térmico na mufla

**ZnO\_GPTMS\_24h\_mufla:** ZnO\_GPTMS\_24h submetido ao tratamento térmico na mufla

**LPS:** lipopolissacarídeo

**PQ:** Pontos quânticos

**MTT:** 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide

**HaCat:** células cultivadas de queratinócitos humanos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Camada de contorno de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	25
<b>Figura 2.</b> Esquema de preparação do precursor.....	34
<b>Figura 3.</b> Conversão da rezasurina.....	43
<b>Figura 4.</b> Conversão do MTT.....	47
<b>Figura 5.</b> Curvas de SAXS de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas em diferentes razões de hidrólise $r = [\text{OH}^-] / [\text{Zn}^{2+}]$ .....	47
<b>Figura 6.</b> Curvas de SAXS de nanopartículas de ZnO, em água, modificadas com GPTMS. A1 e B1 mostram a região de Guinier para as amostras de razão de hidrólise 1.0 e 1.4, enquanto A2 e B2 mostram o fit do modelo de esfera.....	48
<b>Figura 7.</b> Curvas de SAXS de nanopartículas de ZnO, modificadas com GPTMS, submetidas a diferentes tempos de reação.....	49
<b>Figura 8.</b> Evolução das curvas de SAXS de NP de ZnO, sintetizadas à 50° por 180 minutos.....	51
<b>Figura 9.</b> Evolução temporal de $I(0)$ e $R_g$ .....	52
<b>Figura 10.</b> Potencial zeta de nanopartículas de ZnO modificadas com GPTMS em função do pH e pontos isoelétricos (PI).....	54
<b>Figura 11.</b> Curva de SAXS de Nanopartículas de ZnO, modificadas com GPTMS e dispersas em água, com pH 7.0.....	55
<b>Figura 12.</b> Espectro de absorção UV-vis da suspensão coloidal de nanopartículas de ZnO ( $r = [\text{OH}^-] / [\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ ), sintetizadas à 50°C em diferentes tempos de reação.....	56
<b>Figura 13.</b> Espectros de absorção UV-Vis das suspensões coloidais de nanopartículas de ZnO em etanol sintetizadas com razão de hidrólise $[\text{OH}^-] / [\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ , em ultrassom.....	57
<b>Figura 14.</b> Espectros de absorção UV-Vis das suspensões coloidais de nanopartículas de ZnO em etanol sintetizadas com razão de hidrólise $[\text{OH}^-] / [\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ , em ultrassom à 50°C por 3 horas, seguidas de 21 horas em banho à 50°C com agitação magnética (ZnO_24h) e armazenadas em freezer (A) e em temperatura ambiente (B).....	58

<b>Figura 15.</b> Espectros de absorção UV-Vis de dispersões de nanopartículas de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas com razão de hidrólise $[\text{OH}]/[\text{Zn}^{2+}]=1.0$ , em ultrassom à 50°C por 3 horas (ZnO_GPTMS_3h) e armazenadas à 5°C (A) e em temperatura ambiente (B).....	59
<b>Figura 16.</b> Espectros de absorção UV-Vis de dispersões de nanopartículas de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas com razão de hidrólise $[\text{OH}]/[\text{Zn}^{2+}]=1.0$ , em ultrassom à 50°C por 3 horas seguidas de 21 horas em agitador magnético (ZnO_GPTMS_24h) e armazenadas à 5°C (A) e em temperatura ambiente (B).....	60
<b>Figura 17.</b> Análise termogravimétrica (TG) e tratamento térmico na mufla de nanopartículas de ZnO sintetizadas em 3 (A) e 24 (B) horas.....	64
<b>Figura 18.</b> Difratomogramas de raios X das amostras ZnO_3h e ZnO_GPTMS_3h, comparado com ZnO aldrich.....	66
<b>Figura 19.</b> Difratomogramas de raios X .....	67
<b>Figura 20.</b> Espalhamento de raio-X a alto ângulo.....	69
<b>Figura 21.</b> Evolução do espalhamento de raio-X a alto ângulo de acordo com o aumento da temperatura.....	70
<b>Figura 22.</b> MET das amostras sem modificador ZnO_3h (A) e modificadas ZnO_GPTMS_3h (B), com histograma mostrando o tamanho médio das nanopartículas.....	72
<b>Figura 23.</b> Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução da amostra ZnO_3h (A) e ZnO_GPTMS_3h (B).....	73
<b>Figura 24.</b> Espectroscopia de raios X por dispersão de energia de nanopartícula de ZnO, modificada com GPTMS.....	74
<b>Figura 25.</b> Exemplo de testes de atividade antimicrobiana realizados CIM (esquerda) e MBC (direita).....	75
<b>Figura 26.</b> Microscopia eletrônica de transmissão. <i>S.aureus</i> .....	82
<b>Figura 27.</b> Ensaios de citotoxicidade em célula HaCat.....	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista de amostras utilizadas no trabalho.....	36
<b>Tabela 2.</b> Valores de $R_g$ e $R_{esfera}$ .....	50
<b>Tabela 3.</b> Raio das nanopartículas armazenadas em diferentes condições.....	62
<b>Tabela 4.</b> Tamanho médio dos cristalitos (D) obtidos a partir dos difratogramas de raios X.....	68
<b>Tabela 5.</b> Comparação dos tamanhos das NP de ZnO obtidos por diferentes técnicas.....	73
<b>Tabela 6.</b> CIM e CBM de NP de ZnO contra <i>S. aureus</i> .....	76
<b>Tabela 7.</b> CIM e CBM de NP de ZnO contra <i>E. coli</i> .....	77

## RESUMO

Os óxidos metálicos, como óxido de zinco (ZnO) são utilizados como agentes antimicrobianos inorgânicos frente à grande diversidade de microrganismos. Devido ao tamanho reduzido, as nanopartículas (NP) de ZnO são promissoras para combater infecções, uma vez que a diminuição do tamanho da partícula pode resultar em melhor atividade antimicrobiana, pois por terem tamanho menor, as NP podem com maior facilidade penetrarem na membrana ou induzir a maiores produções de espécies reativas de oxigênio (ERO). O objetivo desse trabalho foi desenvolver suspensões e pós de nanopartículas de ZnO com tamanho e superfície controladas, com a finalidade de avaliar a influência do tamanho e da modificação de superfície na atividade antimicrobiana do ZnO frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e levedura *Cândida albicans*. As NP de ZnO foram preparadas pelo processo sol-gel de acordo com a metodologia proposta por Spanhel e Anderson (1991) com modificação da razão de hidrólise para controle do tamanho das NP seguida da adição de (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS), como modificador de superfície. Os nanomateriais obtidos foram caracterizados por diferentes técnicas: difração de raios X (DRX); espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-vis), espalhamento de raios X à baixo ângulo (SAXS); espalhamento de raios X a alto ângulo (WAXS); análise termogravimétrica (TG); microscopia eletrônica de transmissão (MET); Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) e potencial zeta. Com a técnica de DRX comprovamos a obtenção de NP de ZnO na fase wurtzita sendo possível o cálculo do tamanho do cristalito para as diferentes amostras utilizadas no estudo. Com a técnica de UV-vis identificamos o comprimento de onda limite, dessa forma foi possível calcular o raio médio das NP que foi de 2,9 nm e 5,4 nm para as NP submetidas a 3 e 24 horas de reação, respectivamente. Ainda através desta técnica foi possível provar alta estabilidade das NP. A temperatura de 600 °C foi selecionada por TG com finalidade de tratar termicamente as NP de ZnO na ordem de 5 nm resultando no aumento do seu tamanho, dessa forma, DRX foi utilizado para calcular o tamanho das NP, que passou a ser na ordem de 30 nm. De acordo com SAXS foi possível obter informações de tamanho, estrutura e crescimento das NP de ZnO, sendo que apresentaram em geral tamanho na ordem de 5 nm. O potencial zeta mostrou estabilidade das NP de ZnO dispersas em água a pH alcalino. A MET mostrou partículas relativamente esféricas com tamanho predominante de 5 nm. Assim, as diferentes técnicas utilizadas para avaliar o tamanho das NP apresentaram grande concordância entre si. Os dados de EDS provaram que as NP de ZnO modificadas apresentam alto grau de pureza. A avaliação da atividade antimicrobiana das NP de ZnO foi realizada pelos métodos de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida mínima (CFM), frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* e Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) em *Staphylococcus aureus*. As NP de ZnO mostraram melhor atividade frente a *Staphylococcus aureus*. Foram comparados os diferentes tamanhos das NP de ZnO em relação ao seu efeito antibacteriano sendo que as NP de ZnO de 5 nm foram mais eficazes para combater o crescimento microbiano do que as NP de 30 nm. A formação de buracos na estrutura de contorno de *S.aureus* foi evidenciada com a técnica de MEV após contato das bactérias com NP de ZnO. Os testes de citotoxicidade mostraram que as NP de ZnO não ocasionaram perda da viabilidade celular em linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat), dessa forma o material desenvolvido apresentou grande potencial para uso como antimicrobiano.

**Palavras-chaves:** Nanopartículas. ZnO. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*. Concentração Inibitória Mínima. Caracterização físico-química.

## ABSTRACT

Metal oxides such as zinc oxide (ZnO) are used as inorganic antimicrobial agents against great diversity of microorganisms. Due the reduced size, ZnO nanoparticles (NP) are promising to combat infections, since the decrease in particle size may result in better antimicrobial activity, because of their smaller sizes, NP can more easily penetrate the membrane or induce a greater production of reactive oxygen species (ROS). The aim of this work was to develop suspensions and powders of ZnO nanoparticles with controlled size and surface, in order to evaluate the influence of size and surface modification on ZnO antimicrobial activity against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and yeast *Candida albicans*. The ZnO NP were prepared by the sol-gel process according to the methodology proposed by Spanhel and Anderson (1991) with hydrolysis ratio modification for NP size control followed by the addition of (3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane (GPTMS) as surface modifier. The nanomaterials obtained were characterized by different techniques: X-ray diffraction (XRD); Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis); small angle light scattering (SAXS); high angle light scattering (WAXS); thermogravimetric analysis (TG); Transmission electron microscopy (TEM); energy dispersive spectroscopy (EDS) and zeta potential. With the XRD technique, we verified the obtaining of ZnO NP in the wurtzite phase and it was possible to calculate the crystallite size for the different samples used in the study. With the UV-vis technique we identified the limit wavelength, so it was possible to calculate the mean radius of the NP that was of 2,9 nm and 5,4 nm for the NP submitted to 3 and 24 hours of reaction, respectively and through this technique it was possible to prove high NP stability. The temperature of 600 ° C was selected by TG with the purpose of thermally treating the ZnO NP size in order about of 5 nm resulting in the increase of its size, thus, XRD was used to calculate the size of NP, which became in the order of 30 nm. According to SAXS, it was possible to obtain information on size, structure and growth of ZnO NP, with size of 5 nm in general. The zeta potential showed stability of the ZnO NP dispersed in water at alkaline pH. The MET showed spherical particles with a predominant size of 5 nm. Thus, the different techniques used to evaluate the NP size presented great agreement among themselves. The EDS data proved that the modified ZnO NP are high purity. The antimicrobial activity was performed by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (CBM) and Minimum Fungicide Concentration (CFM) methods against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* and Scanning Electron Microscopy (SEM) in *Staphylococcus aureus*. The ZnO NP showed better activity against *Staphylococcus aureus*. The different sizes of ZnO NP were compared to their antibacterial effect, and the 5nm ZnO NP 30nm ZnO NP. The formation of holes in the contour structure of *S. aureus* was evidenced with SEM technique after contact of the bacteria with ZnO NP. Cytotoxicity tests showed that ZnO NP did not cause loss of cell viability in human keratinocyte cell line (HaCat), so the developed material presented great potential for use as an antimicrobial.

**Keywords:** Nanoparticles. ZnO. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*. Minimal Inhibitory Concentration. Physico-chemical characterization.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVOS .....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1. Síntese de nanopartículas de ZnO via sol-gel .....	18
3.2. Mecanismos de atividade antimicrobiana de NP de ZnO .....	21
3.3. A influência dos parâmetros físico-químicos de nanopartículas de óxido de zinco em relação à atividade antimicrobiana.....	27
3.4. Modificação de superfície das nanopartículas de ZnO .....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	31
4.1. Materiais e equipamentos.....	31
4.2. Síntese das NP de ZnO.....	33
4.2.1. Preparação do precursor de oxiacetato de zinco .....	33
4.2.2. Suspensão coloidal de nanopartículas de ZnO .....	34
4.2.3. Modificação da superfície de nanopartículas de ZnO.....	35
4.3. Métodos de caracterização das nanopartículas de ZnO .....	37
4.3.1. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) .....	37
4.3.2. Potencial zeta .....	38
4.3.3. Espectroscopia de absorção na região ultravioleta-visível (UV-Vis) .....	38
4.3.4. Análise Termogravimétrica.....	39
4.3.5. Difração de raios X .....	40
4.3.6. Espalhamento de raios X a alto ângulo (WAXS).....	40
4.3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	40
4.3.8. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).....	40
4.4. Ensaio de atividade antimicrobiana .....	41
4.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	41
4.4.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM).....	43
4.4.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) .....	44
4.4.4. Ensaio de citotoxicidade.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Caracterização físico-química .....	46
5.1.1. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS) .....	46
5.1.2. Estudo do crescimento de ZnO por SAXS .....	49
5.1.3. Potencial zeta .....	51

5.1.4 Espectroscopia na região UV-vis .....	55
5.1.5. Análise Termogravimétrica e tratamento térmico.....	63
5.1.6 Difração de raios X (DRX) .....	64
5.1.7. Espalhamento de Raio-X a alto ângulo (WAXS).....	68
5.1.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	70
5.1.8. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS).....	73
5.2. Avaliação do potencial antimicrobiano .....	74
5.2.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida e Fungicida mínima	74
5.2.2. Microscopia eletrônica de Varredura .....	81
5.2.3. Avaliação do potencial citotóxico das nanopartículas de ZnO.....	81
6. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS .....	84

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos comerciais é uma preocupação mundial. Por esse motivo, a resistência microbiana é abordada com o intuito de desenvolver novos sistemas capazes de combater infecções. O uso indevido de antibióticos resultou na seleção de cepas bacterianas resistentes (LEUNG et al., 2012) uma vez que as bactérias podem gerar respostas adaptativas por meio de mutações genéticas ou transferências horizontais de elementos de resistência de bactéria para bactéria (DEREWACZ et al., 2013). Da mesma forma, o uso prolongado e intenso de antifúngicos levou à diminuição da sensibilidade aos antifúngicos utilizados para combater infecções, bem como ao aumento de cepas resistentes (BADDIE; ALBORZI, 2011).

Em muitas infecções há a presença de cepas resistentes a praticamente todos os antibióticos utilizados para combatê-las. Por exemplo, bactéria *Staphylococcus aureus*, que comumente está presente em infecções pós cirúrgicas em tecidos moles e pneumonia (JESLINE et al., 2014), pode ser resistente até mesmo à Meticilina e outros betalactâmicos (RAI, 2013).

É crescente o aumento da virulência de bactérias comensais, principalmente a *Escherichia coli*, e como consequência, aumentou-se a fixação, invasão e persistência celular na mucosa intestinal (SARTOR, 2008). Nesse sentido, as bactérias intestinais podem acarretar inflamações intestinais crônicas (SWISINSKI et al., 2002).

Na maioria das vezes os fungos são encontrados como saprófitos e não acarretam danos à saúde humana, em contrapartida, algumas micoses oportunistas causam infecções em indivíduos com resistência imunológica baixa, como é o caso da *Candida albicans*, presente em vaginites e em infecções orais (FAKHROUEIAN et al., 2014). A candidíase sistêmica é uma infecção invasiva que acomete pacientes pós-cirúrgicos internados por tempo prolongado durante a neutropenia ou após realização de transplantes, podendo causar a morte em pacientes imunocomprometidos (BADDIE; ALBORZI, 2011).

Entre as alternativas para combater infecções, encontra-se o uso de agentes antimicrobianos inorgânicos, já que estes possuem algumas vantagens em relação aos antimicrobianos orgânicos, como menor toxicidade, longa durabilidade, menor resistência microbiana e boa seletividade (RANA et al., 2006; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2016).

O óxido de zinco (ZnO) é utilizado em diferentes áreas para controlar o crescimento microbiano (FIROUZABADI et al., 2014) de grande diversidade de microrganismos, tais como: *Staphylococcus aureus* (RAGHUPATHI et al., 2011; RAI, 2013; MANOHARAN et al., 2015), *Escherichia coli* (IRELAND et al., 1993; LIU et al., 2009; LEUNG et al., 2012) e *Candida albicans* (JANAKI et al., 2015; PASQUET et al., 2015).

Embora o ZnO seja utilizado como agente antimicrobiano em produtos farmacêuticos e cosméticos, a diminuição do tamanho da partícula para ordem nanométrica pode causar mudanças em suas propriedades químicas, elétricas e óticas, o que torna capaz de promover novas aplicações (AHMAD; ZHU, 2011).

Os avanços em nanotecnologia permitiram obter partículas de distintas formas e tamanhos e com grande área de superfície em relação ao volume, possibilitando a interação com células microbianas, o que acarretou no desenvolvimento de novos agentes biocidas (DURAIRAJ et al., 2015 ). Dessa forma, o uso de NP pode ser uma alternativa para minimizar os casos de resistência microbiana e promover menor toxicidade (RAI, 2013). Além disso, quando o tamanho do ZnO é reduzido para nanoescala, sua atividade antimicrobiana pode ser aumentada (SIRELKHATIM et al.; 2015).

Entre as propriedades das NP de ZnO que podem influenciar no seu efeito antimicrobiano, destaca-se o tamanho da partícula. Dessa forma, alguns estudos abordaram esse tema como o desenvolvido por Raghupathi e colaboradores, (2011), mostrando que as partículas que apresentaram menor tamanho (12 nm) possuíram melhor atividade em relação às maiores. Pasquet e colaboradores (2014) também avaliaram a atividade antimicrobiana de NP de ZnO dependente do tamanho da partícula, sendo que os resultados também mostraram que a menor partícula de 14,7 nm foi mais efetiva para combater o crescimento microbiano do que as maiores. É importante ressaltar que nesses estudos não foram avaliados a atividade antimicrobiana de NP de ZnO menores de 10 nm.

Entre as formas de sintetizar NP de ZnO, o método sol-gel, desenvolvido por Spanhel e Anderson, 1991 é promissor, uma vez que permite o uso de temperaturas amenas e dá origem a pequenos cristalitos. No entanto, essa síntese, resulta em NP de ZnO instáveis em água, o que limita seu uso biológico. Nos últimos anos, como alternativa para melhorar a estabilidade e permitir a dispersão em meios aquosos das NP de ZnO, tem-se usado modificadores de superfície (GHASEMI et al., 2009; GULIA; KAKKAR, 2013). Vale ressaltar que há grande importância no uso dos modificadores de superfície em NP de ZnO

para a aplicação como agente antimicrobiano, uma vez que os testes de atividade antimicrobiana são realizados comumente em meios aquosos ou de cultura celular (SIRELKHATIM et al.; 2015).

Entre os modificadores de superfície utilizados, os organosilanos destacam-se, pois possuem baixa toxicidade e ligam-se de forma covalente à superfície hidroxilada das NP, criando uma barreira de proteção do núcleo contra a água, permitindo também a dispersão das NP de ZnO em meios aquosos. Jana e colaboradores, (2007) revestiram diferentes NP (Au, Ag, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, and ZnS-CdSe) com modificadores de superfície a base de silanos, obtendo resultados positivos quanto a estabilidade em água das NP produzidas. Aboulaich e colaboradores, (2012) realizaram a funcionalização de pontos quânticos (PQ) de ZnO com (poly)aminotrimethoxysilanos. Os resultados mostraram que os PQ desenvolvidos apresentaram boa biocompatibilidade, alto rendimento quântico e fotoluminescência em água, além disso, os PQ de ZnO revestidos com silanos tiveram boa estabilidade coloidal, mantendo suas propriedades óticas por 14 dias enquanto dispersos em água. (JANA et al., 2007; ABOULAICH et al., 2012).

Pesquisadores vem explorado o potencial de aplicar modificadores de superfície como os organosilanos em NP de ZnO para avaliar o efeito antimicrobiano, como abordado por Čepin e colaboradores, (2015), que avaliaram diferentes modificadores de superfície a base de silanos na atividade antibacteriana de NP de ZnO frente à *E.coli* e *S.aureus* mostrando resultados positivos em todos os modificadores testados. As NP de ZnO modificadas inibiram completamente o crescimento bacteriano na concentração de 0.125 g/L, apresentando inclusive melhoria na atividade antimicrobiana em relação às NP de ZnO sem modificação.

O uso do (3-Glycidioxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS) foi abordado em tese de doutorado do nosso grupo de pesquisa. Nesse trabalho, o GPTMS foi aplicado como modificador de superfície de PQ de ZnO com o intuito de aplica-los para o diagnóstico e vetorização de fármacos. Os resultados apresentados mostraram que a modificação de superfície pelo GPTMS permitiu a dispersão dos PQ de ZnO em água, melhorando a sua estabilidade e aumentando o rendimento fotoluminescente o que beneficia a utilização dos PQ de ZnO em diversas aplicações, como por exemplo, o uso destes como sondas biológicas (RISSI et al., 2017).

Para a finalidade na atividade antimicrobiana de NP de ZnO, o uso do GPTMS foi encontrado em um único trabalho, desenvolvido por Farouk e colaboradores, (2014), o qual

abordou a sua aplicação em tecidos com propriedade antimicrobiana para indústrias têxteis. Os resultados mostraram que as NP de ZnO com distribuição de tamanho de 30-60 nm possuíram melhor atividade antimicrobiana contra *E. coli* do que as NP de ZnO de tamanhos maiores.

O presente trabalho mostra alta relevância, pois obteve NP de ZnO de diferentes tamanhos, inclusive menores que 10 nm, com finalidade de estudar o efeito do tamanho e da modificação de superfície com GPTMS em relação à atividade antimicrobiana desse material. Além disso, a modificação de superfície é altamente importante para promover estabilidade em água das NP de ZnO. A influência do tamanho das NP de ZnO em suas propriedades antimicrobianas bem como o uso do GPTMS como modificador de superfície foi reportado previamente por pesquisadores (FAROUK et al., 2014), no entanto não há estudos que correlacionam o efeito antimicrobiano de NP de ZnO modificadas com GPTMS menores de 30 nm e embora haja trabalhos avaliando a influência do tamanho das NP de ZnO em sua atividade antimicrobiana, estudos que correlacionam esse aspecto para NP de ZnO menores de 10 nm são escassos.

## **2. OBJETIVOS**

O trabalho tem por objetivo desenvolver suspensões e pós de NP de ZnO, com diferentes tamanhos e superfície modificada por GPTMS e avaliar o efeito tanto do tamanho quanto da modificação da superfície das NP na atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

## **3. REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1. Síntese de nanopartículas de ZnO via sol-gel**

Brus e Efros em meados de 1980 haviam observado que nanocristais de semicondutores de diferentes tamanhos emitiam diferentes cores, propriedade oriunda do confinamento quântico (EFROS, 1982; BRUS, 1986). Para cristais de alguns nanômetros de tamanho, quando um fóton com energia superior à da banda proibida do semicondutor é absorvido, um par de elétrons-buraco (éxcitons) é formado, sendo que a combinação de um par elétron-buraco leva à emissão de um fóton com comprimento de onda determinado pelas dimensões da nanopartículas (HEYES, et al., 2007; ISNAENI, et al., 2011). Dentre estes semicondutores, o ZnO tem esta característica, além de que apresenta menor toxicidade

quando comparado a nanocristais a base de Cádmiio (XIONG, 2010), portanto, tornou-se promissor em aplicações biológicas.

Entre as formas de sintetizar NP de ZnO com confinamento quântico, o método sol-gel possui vantagens, uma vez que essa via pode ser conduzida à temperaturas amenas e ser usada em escala industrial (HIRATSUKA et al., 1995). Além disso, as condições de síntese podem ser controladas, o que possibilita o acompanhamento das etapas de formação e crescimento das partículas, o que permite controlar o seu tamanho (CAETANO et al., 2011).

O método sol-gel baseia-se no princípio de que a partir da agregação de partículas coloidais, ou até mesmo da polimerização dos precursores em solução, seja possível construir uma rede sólida. As reações químicas envolvidas nesse processo baseiam-se em hidrólise e condensação (HIRATSUKA et al., 1995; CAETANO, 2010). A etapa de hidrólise do precursor leva a formação de um grupo M-OH, onde M é um semimetal ou metal. A modificação do pH da solução aquosa, resulta em protonação de óxido-íons aniônicos ou desprotonação de aquo-ions catiônicos. A etapa que segue em ambos os casos é a condensação por oxolação ou olação (HIRATSUKA et al., 1995). A síntese sol-gel atingiu grandes proporções para a produção de nanopartículas de ZnO com Spanhel e Anderson em 1991. Essa rota de síntese, é capaz de produzir partículas de 2-6 nm e envolve basicamente três etapas. A primeira consiste na preparação de um precursor organometálico através da adição de acetato de zinco ao etanol absoluto, que é mantido sob refluxo à 80°C por 180 minutos, formando um produto higroscópico. A segunda etapa envolve a adição de uma base ou água ao precursor, promovendo a etapa de hidrólise, formando uma suspensão coloidal e por último, há a formação do sol por meio da concentração da suspensão coloidal.

A formação e crescimento de NP de ZnO a partir do método sol-gel vem sendo investigado desde do final do século XX. Alguns pesquisadores se destacaram nesse estudo e serão citados para melhor compreensão do processo sol-gel na síntese de NP de ZnO.

A cinética de formação de suspensões coloidais de NP de ZnO, catalisadas por hidróxido de lítio, foi estudada por espalhamento de raios X à baixo ângulo (SAXS) por Tokumoto e colaboradores, (1999). Os resultados mostraram que a formação de NP de ZnO é composta por dois estágios. i) até 30 minutos, há a formação contínua de aglomerados com cerca de 2 nm de diâmetro, que aumenta em quantidade com o decorrer da reação, enquanto o tamanho permanece constante. ii) durante a segunda fase, há a formação de partículas

coloidais primárias com raio de 6 e 10 nm, sendo que as partículas maiores são formadas através da agregação e coagulação das menores (TOKUMOTO et al., 1999).

Tokumoto e colaboradores em 2003 avaliaram a influência do catalisador, temperatura e razão de hidrólise na formação de NP de ZnO produzidas via sol-gel. Os pós de NP de ZnO foram caracterizados quanto a sua composição química por DRX, EXAFS e análise térmica (TG-DTA). Os resultados mostraram que os pós não lavados são compostos de ZnO com estrutura wurtzita, mas contém uma mistura de acetato de zinco e hidróxido acetato de zinco (Zn-HDS), mas suas quantidades podem ser controladas pelos parâmetros da síntese sol-gel. Por exemplo, pós com a maior quantidade de NP de ZnO foram obtidos a baixa temperatura sem catalisador ou utilizando catálise básica com LiOH. Os pós com maior quantidade da mistura de acetato Zn-HDS foram obtidos com catálise básica a 40°C ou por adição de água, sendo a formação Zn-HDS é resultante do mecanismo de dissolução e reprecipitação das NP. Conforme demonstrado nesse trabalho, a quantidade de nanopartícula formada diminui conforme aumenta a temperatura da reação, diminui a razão de hidrólise ou através da mudança da catálise básica para a ácida (TOKUMOTO et al., 2003). Vale ressaltar ainda que pequenas quantidades de água nas etapas de formação das NP pela via sol-gel resultam em agregação, precipitação e perda da luminescência (XIONG et al., 2010).

Ainda em 2003, Tokumoto e colaboradores, elucidaram a estrutura da conversão do acetato de zinco diidratado em um precursor de oxiacetato de zinco ( $Zn_4O(Ac)_6$ ), o qual é composto por um tetraedro, rodeado de 4  $Zn^{2+}$  que por sua vez é coordenado tetraédricamente por um oxigênio. Esta etapa de formação do precursor é um aspecto importante para o rendimento da reação, e por esse motivo, o controle da temperatura do refluxo deve ser cuidadosamente realizado, com a finalidade de evitar a formação de NP ZnO nessa etapa, pois a semelhança estrutural entre o  $(Zn_4O(Ac)_6)$  com a estrutura wurtzita do ZnO favorece a condensação dessa estrutura em ZnO. Com o controle desta etapa, a formação do precursor em ZnO se dá numa segunda etapa pela adição de uma base onde há substituição do acetato por grupos hidroxiláveis, seguidos por oxalação gerando assim nanopartículas de ZnO (TOKUMOTO et al., 2003).

Caetano e colaboradores 2011, estudaram a formação, crescimento e agregação de pontos quânticos de ZnO por medidas simultâneas in situ de UV-vis/SAXS e UV-vis/EXAFS. A base KOH foi utilizada para promover a etapa de hidrólise e condensação, enquanto a temperatura do processo foi mantida a 40°C. Os resultados mostraram que primeiramente

ocorre a nucleação e crescimento das partículas de ZnO, que é desencadeado com o consumo de oxiacetato de zinco. Em etapa intermediária há o crescimento compacto de agregados e processo de coalescência das partículas primárias. A etapa seguinte mostrou o crescimento fractal de agregados e por último, ocorre uma segunda etapa de nucleação e crescimento dos agregados fractais. O que mostra que após a etapa de nucleação, as partículas podem continuar a crescer por processos de coalescência ou agregação.

Essa revisão teve o intuito de conhecer características da síntese sol-gel, tendo em foco o acompanhamento dos processos de formação e crescimento das NP de ZnO. Dessa forma, é possível controlar o tamanho das partículas formadas, que é um dos aspectos considerados relevantes para a atividade antimicrobiana do ZnO (descrita nos próximos itens).

### **3.2. Mecanismos de atividade antimicrobiana de NP de ZnO**

A atividade antimicrobiana de NP de ZnO tem sido reportada em diversas pesquisas, no entanto o exato mecanismo de toxicidade em bactérias e fungos ainda não foi bem elucidado e permanece controverso. Por esses motivos, torna-se necessário uma revisão acerca dos mecanismos tratados na literatura, pois diferentes mecanismos são propostos, podendo acontecer simultaneamente e variar de acordo com os meios utilizados e os parâmetros físico-químicos das NP de ZnO (SIRELKHATIM et al., 2015).

Entre os mecanismos propostos encontram-se a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SAWAI et al., 1998; RAGHUPATHI et al., 2011; APPLEROT et al., 2012; GUO et al., 2015; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2016); a destruição da integridade celular pelo contato das NP de ZnO com a parede celular (BRAYNER et al., 2006; ZHANG, et al., 2007); a liberação de íons  $Zn^{2+}$  (BRUNNER et al., 2006; PASQUET et al., 2015) e internalização das NP de ZnO (BRAYNER, et al., 2006).

Um dos mecanismos mais atribuídos na literatura à atividade antimicrobiana de NP de óxidos metálicos é a produção de ERO, como ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radicais hidroxilas ( $HO_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SAWAI et al., 1998; GUO et al., 2015; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2016). Quando as NP de ZnO entram em contato com a água elas formam suspensões e produzem altos níveis de ERO (BRAYNER, et al., 2006), podendo causar destruição de componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos (SAWAI et al., 1998; APPLEROT et al., 2012; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2016).

Como um semicondutor, a estrutura eletrônica do ZnO consiste de uma banda de condução (CB) e uma banda de valência (BV). Uma radiação de fótons, com energia maior que o band gap, ou seja, maiores que 3.3 eV ( $h\nu$ ) é imediatamente absorvida, dessa forma, elétrons saem da BV e passam para a BC, o que inicia uma série de foto-reações (SEVEN et al., 2004). Buracos positivos ( $h^+$ ) são formados na BV, e por sua vez, há elétrons livres ( $e^-$ ) na BC. Esses pares de elétrons formados dão início a diversas reações. Os “buracos” separam as moléculas de água em  $OH^-$  e  $H^+$ . As moléculas de oxigênio dissolvidas reagem com o par de elétrons livres da banda de condução e são transformadas em ânions superóxidos  $O_2^-$  que reagem com  $H^+$  gerando radicais  $HO_2$  que após colidirem com os elétrons ( $e^-$ ) são transformados em radicais hidroxilas ( $HO_2^-$ ), que por sua vez podem reagir com íons hidrogênio e produzir peróxido de hidrogênio que podem penetrar a célula e matar os microrganismos (SAWAI et al., 1998; GUO et al., 2015; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2016)

Como o peptidoglicano, constituinte da camada de contorno de bactérias, é carregado negativamente, assim como os radicais hidroxilas e superóxidos, estes não podem penetrar a membrana, no entanto, o contato direto causa danos. Dessa forma, essas espécies podem ser encontradas fora da bactéria. Já o peróxido de hidrogênio é capaz de passar através da parede celular, internalizando na célula bacteriana, podendo desencadear a morte celular (ZANG, et al., 2007; PADMAVATHY; GUO, 2016).

Segundo alguns autores, devido às suas propriedades semicondutoras, o ZnO exibe alta eficiência fotocatalítica, e isso pode contribuir para a sua atividade antimicrobiana (GUO et al., 2015; SIRELKHATIM et al., 2015). Dessa forma, quando submetido à luz UV, o efeito antimicrobiano de NP de ZnO pode ser otimizado, uma vez que há aumento na condutividade, ativando as interações das partículas de ZnO com a célula bacteriana (SIRELKHATIM et al., 2015).

Raghupathi e colaboradores, (2011) atribuíram o aumento da atividade antibacteriana de NP de ZnO com o aumento da produção de ERO pelas NP quando submetidas à exposição de luz UV. Em contrapartida, alguns estudos demonstram que as ERO podem ser criadas mesmo sem exposição de luz (ADAMS, et al., 2006; HIROTA, et al., 2010).

Outro mecanismo foi proposto por Brayner e colaboradores (2006) que avaliaram os impactos toxicológicos de NP de ZnO contra *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que contato com as NP de ZnO, as células bacterianas foram danificadas, apresentando uma

desorganização na membrana com aumento da permeabilidade da membrana, portanto, houve um aumento da concentração de NP na membrana bem como sua internalização.

Como visto anteriormente, nem sempre a toxicidade de NP de ZnO é dependente de sua internalização na célula bacteriana. Nesse sentido, as NP de ZnO podem localmente causar mudanças no ambiente próximo a bactéria, produzir ERO, ou aumentar a solubilidade das NP de ZnO, o que pode induzir à danos celulares. (HEINLAAN et al., 2008; HAJIPOUR et al., 2012).

A toxicidade de NP de ZnO foi atribuída a liberação de íons  $Zn^{2+}$  pelas NP de ZnO podendo causar a diminuição do metabolismo de aminoácidos e perturbação do sistema enzimático. Li e colaboradores, (2011) avaliaram a toxicidade de NP de ZnO em *E. coli* através de correlações com a liberação de  $Zn^{2+}$  em diferentes meios. Os resultados mostraram que a diminuição de íons  $Zn^{2+}$  nos meios resultou em menor toxicidade.

Em contrapartida, Li e colaboradores, (2012) mensuraram a atividade antibacteriana de NP de ZnO de acordo com a produção de ERO e liberação de íons  $Zn^{2+}$  pelas suspensões de NP de ZnO. Os pesquisadores observaram que mesmo quando a concentração de  $Zn^{2+}$  foi de 1 mg/L não houve inibição em *E.coli*, no entanto, a taxa de crescimento de *E.coli* diminuiu com o aumento de ERO, o que mostrou que a liberação de íons  $Zn^{2+}$  teve um menor efeito na atividade antibacteriana (LI et al., 2012)

Baek e An, (2011), também obtiveram resultados contrários ao apresentado por Li e colaboradores, (2011) através de estudos em relação a liberação de íons livres por nanopartículas, incluindo NP ZnO. Para isso, nesse estudo foram utilizadas cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Foram usadas quantidades máximas de íons metálicos que poderiam ser liberados pelas nanopartículas. A uma concentração de 125 mg/mL de NP de ZnO, foram liberados 6,8 mg/mL de íons zinco, no entanto na avaliação da atividade dos íons livres, a inibição apresentou-se baixa (de 2 a 3% para todas as cepas testadas), mas as NP de ZnO apresentaram alta toxicidade para todas as cepas testadas. Dessa forma, os autores sugeriram que a atividade das NP pode estar relacionada com a toxicidade intrínseca da partícula metálica.

NP de ZnO possuem atividade antibacteriana em Gram-positiva e Gram-negativa e atividade antifúngica (KAIRYTE et al., 2013), no entanto, a intensidade do efeito depende da sensibilidade da bactéria (LEUNG et al., 2012). Um estudo realizado por Shinde e colaboradores, (2014) sobre a atividade antimicrobiana de microesferas de ZnO (ZnO-MS)

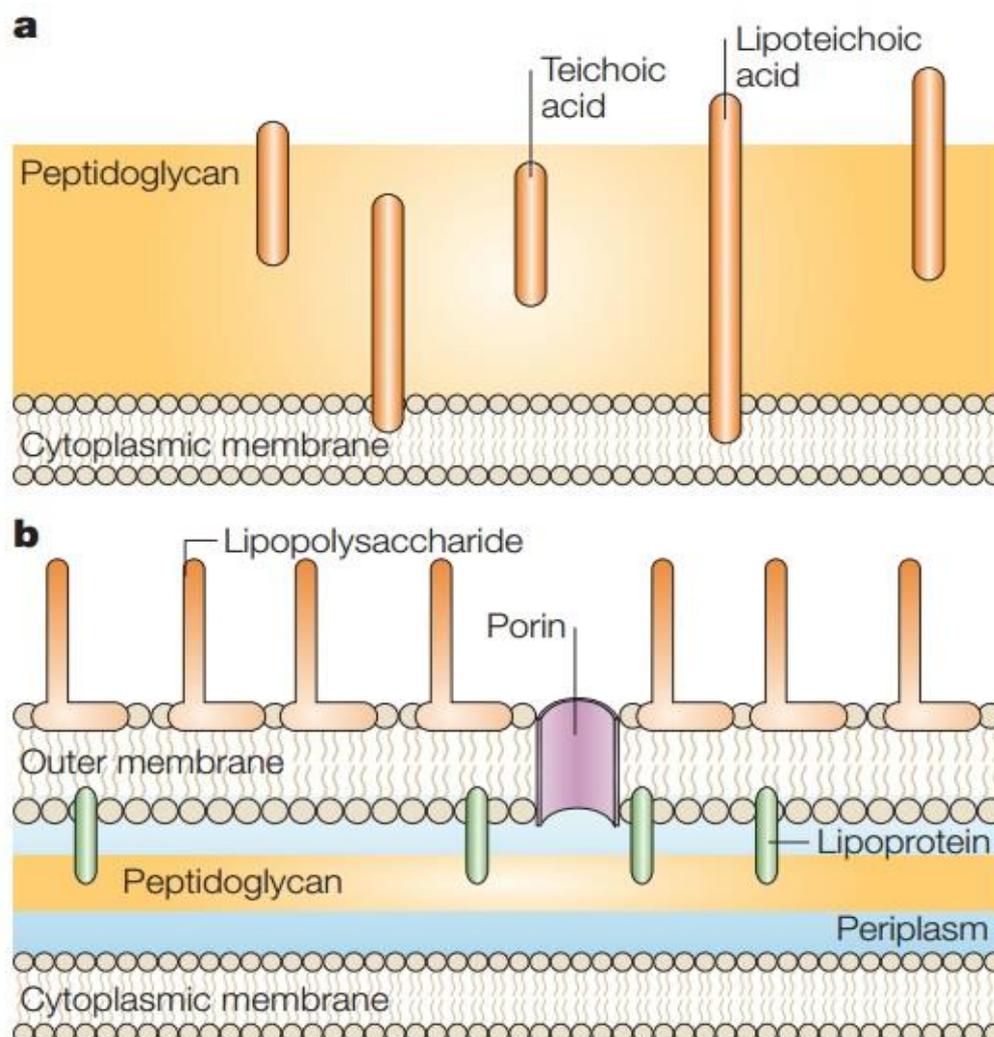
frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* sugeriu que a diferença na suscetibilidade às ZnO-MS das duas bactérias pode ser explicada pelo fato de possuírem diferenças em suas camadas de contorno.

A figura 1 mostra as camadas de contorno de bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b). A camada de contorno de bactérias Gram-positivas contém uma espessa camada de peptidoglicano a qual fornece uma barreira física, protegendo a célula do ambiente além de ser responsável por fixar polímeros como ácido teicóico e lipoteicóico e proteínas de superfície (SCOTT; BARNETT, 2006; LEUNG et al., 2012).

A camada de contorno de bactérias Gram-negativas possui organização complexa. Há uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa que contém lipopolissacarídeo. As lipoproteínas são responsáveis por ligarem a membrana externa à camada de peptidoglicano que está localizada entre o espaço periplasmático, formado entre a membrana externa e a membrana citoplasmática (CABEEN JACOBS-WAGNER, 2005; BRAYNER et al., 2006; HAJIPOUR et al., 2012).

O peptidoglicano é constituído de aminoácidos e hidratos de carbono de unidades repetidas, assim, as NP de ZnO podem interagir com os grupos ácido carboxílico e amino. No entanto, como a camada de peptidoglicano em Gram-negativas é menos espessa, torna-se mais fácil a ruptura da membrana celular de bactérias Gram-negativas em relação às Gram-positivas (SHINDE et al., 2014).

**Figura 1.** Camadas de contorno de bactérias Gram-positivas (a) e Gram-negativas (b), adaptada do artigo “Bacterial cell shape” (CABEEN; JACOB-WAGNER, 2005).



Dutta e colaboradores, (2010) sugerem outro mecanismo que envolve a membrana de bicamada lipídica de Gram-negativa porque pode ser mais sensível às ERO produzidas pelas NP de ZnO, uma vez que a camada de peptidoglicano de Gram-negativas é mais fina do que em Gram-positivas.

Por outro lado, a diferença entre os componentes presentes nas camadas de contorno de Gram-positivas e Gram-negativas foi destacada por Tayel e colaboradores, (2011). Os pesquisadores sugerem que Gram-positivas podem ser mais suscetíveis ao ataque de NP de ZnO que gram-negativas. Isso pode acontecer porque a camada de peptidoglicano em bactérias Gram-positivas pode promover o ataque de ZnO para dentro da célula, enquanto os

componentes da camada de contorno de Gram-negativas, como o lipopolissacarídeo (LPS) podem conter esse ataque.

Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de NP de ZnO são descritos na literatura. NP de ZnO podem entrar na célula por difusão e endocitose e uma vez no citoplasma, elas podem interferir na função da mitocôndria, promovendo a liberação de ERO e  $Zn^{2+}$ . Os íons liberados podem penetrar na membrana nuclear e reagir com o DNA e causar danos reparáveis ou levar à danos cromossômicos irreversíveis, induzindo a morte celular (SHOEB et al., 2013).

He e colaboradores, (2011) avaliaram o mecanismo de ação e a atividade antifúngica de NP de ZnO contra *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum*. As técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de Raman foram utilizadas para avaliar as mudanças morfológicas e composição celular de hifas após serem submetidas ao tratamento com NP de ZnO. Os resultados mostraram inibição dos fungos testados, no entanto, *P. expansum* foi mais sensível. MEV e Raman indicaram diferenças na atividade antifúngica. Para *B. cinera*, houve má formação das hifas, sugerindo inibição por afetar as funções celulares e causar aumento de ácido nucleico, derivado da resposta das hifas aos estresses oxidativos. Em contrapartida, NP de ZnO inibiram o desenvolvimento de conidióforos e conidia por *P. expansum*. A diferença de suscetibilidade pode ser causada devido a tolerância inerente de cada fungo ou então pelo crescimento morfológico, uma vez que *P. expansum* sofre mais exposição às NP de ZnO por crescer de forma mais densa na superfície do ágar.

Lipovsky e colaboradores, (2011) estudaram a atividade antifúngica de NP ZnO mediadas por ERO contra *Candida albicans*. A histidina foi utilizada na pesquisa, pois ela atua na remoção de radicais oxigênio e portanto, foi adicionada nas culturas de *C. albicans* com finalidade de avaliar o efeito inibitório de NP ZnO mediado por ERO. Os resultados mostraram que 5 nM de histidina inibiu o efeito antifúngico. Os autores sugeriram que a liberação de ERO em meio aquoso pode ser responsável pela morte celular. Além disso, em contato com a luz visível, as NP de ZnO aumentam a taxa de morte celular. O efeito antifúngico foi maior com a diminuição do tamanho da partícula e proporcional à concentração de NP usadas.

Outro trabalho, desenvolvido por Shoeb e colaboradores (2013) também avaliou a atividade anti-cândida dependente da liberação de ERO pelas NP ZnO. As espécies reativas foram mensuradas utilizando diacetato de diclorofluoresceína o qual interage com ERO,

formando um composto fluorescente proporcional à concentração de ERO. Os resultados mostraram alta atividade de NP ZnO dose-dependente. A concentração mínima inibitória foi de  $29.7\mu\text{g ml}^{-1}$ . A produção de ERO foi proporcional à quantidade de NP utilizadas, portanto, os autores concluíram que a atividade anti-cândida de NP de ZnO está ligada à produção de ERO.

Janaki, e colaboradores, (2015) estudaram a síntese, caracterização e atividade antimicrobiana de NP de ZnO frente à vários microrganismos, entre eles *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. A investigação mostrou halos de inibição em várias concentrações de NP de ZnO. A inibição aumenta conforme maiores concentrações de NP são utilizadas assim como demonstrado por Liu et al. (2009) em que evidenciou o aumento da atividade antibacteriana de NP de ZnO contra *E. coli* proporcional ao aumento da concentração de NP de óxido de zinco incorporadas, até chegar à completa inibição quando atingiu a concentração de  $12\text{mmol L}^{-1}$ .

### **3.3. A influência dos parâmetros físico-químicos de nanopartículas de óxido de zinco em relação à atividade antimicrobiana**

O controle do tamanho e da morfologia das NP de ZnO é um dos fatores mais importantes para a síntese dessas NP, assim deve-se respeitar os parâmetros reacionais a fim de controlar as propriedades do material final (SHINDE et al., 2014). Portanto, as diferenças morfológicas de NP de ZnO atraem atenção, pois a toxicidade de NP de ZnO pode ser alterada dependendo de sua morfologia. Nesse sentido, alguns estudos tem discutido o impacto da morfologia de NP de ZnO na atividade antimicrobiana (STANKOVIC et al., 2013; TALEBIAN et al., 2013).

Stanković e colaboradores, (2013) estudaram a influência da forma de NP de ZnO, sintetizadas utilizando o método hidrotermal através do uso de diferentes tipos de agentes estabilizantes, na atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S.aureus*. A forma e tamanho das NP de ZnO foram investigados por MEV-FEG, mostrando diferentes estruturas: i) prismas hexagonais com comprimento de  $1\mu\text{m}$  e diâmetro de  $100\text{nm}$ , usando polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante; ii) elipsoides de comprimento de  $500\text{-}600\text{nm}$  e diâmetro de  $100\text{nm}$ , utilizando o ácido poliglutamínico (PGA) como agente estabilizante; iii) esféricas uniformes de diâmetro de  $100\text{nm}$ , utilizando álcool polivinílico (PVA). O método de contagem de colônias foi utilizado para os testes antibacterianos. Diferentes concentrações de

NP de ZnO foram utilizadas (1, 2 e 5 mM) e tempo de exposição (30 segundos, 5 e 10 minutos).

Melhores atividades antimicrobianas foram observadas para as partículas esféricas sintetizadas utilizando PVA, que apresentaram menor tamanho e, conseqüentemente, maior área de superfície. Os pesquisadores observaram que a morfologia tem diferente influência para *S. aureus* e *E.coli* porque os pós preparados com PVP e PGA tiveram diferença na área de superfície maior que 100% e exibiram o mesmo nível de atividade para *E.coli*, enquanto para *S.aureus*, a dependência funcional é mais relacionada com as medidas de área de superfície. Isso pode acontecer porque as células de *E.coli* são mais alongadas e, portanto, entram em contato com maior número de partículas esféricas, o que pode ser outra explicação do porque as partículas elipsoides obtidas com PGA tiveram similares atividades daquelas obtidas com PVP (STANKOVIC et al., 2013).

Raghupathi e colaboradores, (2011) estudaram o efeito do tamanho das partículas de ZnO na atividade antibacteriana. Os resultados mostraram que a viabilidade da célula diminuiu significativamente com a diminuição do tamanho das partículas (de 212nm para 12nm). Quando a partícula apresentou tamanho maior que 100 nm a inibição de *S. aureus* sensíveis à metilicina não foi total, nesse caso, as NP de ZnO tiveram função bacteriostática, entretanto, as partículas menores que 12 nm não apenas inibiram o crescimento, mas também mataram a bactéria *S. aureus*.

Um estudo desenvolvido por Pasquet e colaboradores, (2014) comparou a sensibilidade de *Candida albicans*; *Aspergillus brasiliensis*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* frente a NP de ZnO com objetivo de estabelecer correlações entre os parâmetros estruturais do óxido de zinco e a atividade antimicrobiana. Três amostras de NP de ZnO foram caracterizadas em relação ao tamanho do cristal, área de superfície, porosidade e partículas agregadas em meio aquoso e caldo Muller Hinton. A atividade antimicrobiana foi avaliada por medidas de disco difusão e CIM das NP para cada microrganismo testado.

Os resultados apresentados por Pasquet e colaboradores, (2014) mostraram que a atividade antimicrobiana foi dependente da área de superfície, mas não de forma específica, O efeito fotocatalítico foi mais dependente da cristalinidade do que da área específica. O tamanho do aglomerado não foi um parâmetro relevante, pois tamanhos menores foram obtidos e resultaram em menores atividades para as cepas testadas, no entanto a formação de

aglomerado deve ser evitada', para minimizar a sedimentação e manter a homogeneidade da suspensão. Dessa forma, concluíram que alta atividade antimicrobiana requer pequeno tamanho do cristalito, poros grandes e alta porosidade (medida do tamanho do poro e volume total de poros).

Padmavathy e Vijayaraghavan, (2008) sintetizaram NP de ZnO em diferentes rotas e correlacionaram o tamanho das partículas obtidas com sua atividade antimicrobiana. Testes de disco-difusão foram utilizados para correlacionar a zona de inibição com a habilidade do agente antimicrobiano romper a célula. O tamanho da zona de inibição aumentou com a diminuição do tamanho da partícula o que pode ser correlacionado com a capacidade das partículas de romperem a membrana da bactéria. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração biocida mínima (CBM) foram mensuradas. Em menores concentrações que 1 mM de nanopartículas, nenhuma atividade antibacteriana foi observada para nenhuma amostra testada, em 1 mM as NP tiveram atividade bacteriostática, e de 5-100 mM a atividade foi bactericida. As partículas obtidas continham tamanho de 12 nm, 45 nm e 2 µm. Os pesquisadores observaram que tanto em baixas concentrações, quanto em altas, as suspensões de partículas com tamanho de 12 nm foi mais eficiente que as outras partículas.

Uma pesquisa realizada por Dutta e colaboradores, (2010) teve por objetivo avaliar as mudanças das vacâncias de oxigênio, o efeito do tamanho, dopantes e modificações na ancoragem de ZnO sobre as propriedades antibacterianas de NP de ZnO. Os resultados apresentados evidenciaram que um dos fatores mais importantes, responsáveis por regular o mecanismo de toxicidade, são as diferenças nas vacâncias de oxigênio, com a alteração das propriedades de ZnO, bem como o tamanho da partícula, uma vez que partículas menores apresentaram grande área de superfície em relação ao volume e, portanto, podem penetrar para dentro da célula bacteriana. Além disso, o aumento das vacâncias de oxigênio é responsável por carregar positivamente as NP de ZnO, possibilitando interação destas com a camada de contorno da bactéria, que possui carga negativa (DUTTA et al., 2010).

### **3.4. Modificação de superfície das nanopartículas de ZnO**

Embora os usos de NP de ZnO sejam diversos, a instabilidade em água limita o uso biológico, uma vez que as biomoléculas como DNA, peptídeos e proteínas estão presentes em meios aquosos. Dessa forma, a modificação de superfícies de NP de ZnO é realizada com a finalidade de melhorar a dispersão em biomoléculas. Por estes motivos, diferentes estratégias

tem sido exploradas na tentativa de modificar a superfície de NP de ZnO e torna-las estáveis em água (GHASEMI et al., 2009). A instabilidade em água também esta relacionada a perda da luminescência e à agregação dos pontos quânticos (GULIA; KAKKAR, 2013).

Pesquisas mostram que entre as alternativas utilizadas para estabilizar NP de ZnO está a modificação de superfície através do uso de organossilanos, pois suas moléculas ligam-se de forma covalente a superfície hidroxilada das NP, tornando-as estáveis em água por criar uma proteção do núcleo com a água (JANA et al., 2007; ABOULAICH et al., 2012).

As propriedades de superfície dos nanomateriais alteram suas interações com as células, o que pode interferir no efeito antimicrobiano de NP de ZnO (LEUNG et al., 2012). Os mecanismos de toxicidade de como a produção de  $Zn^{2+}$  e as interações de NP de ZnO com a membrana são afetados pelos revestimentos de superfície, pois, provavelmente, as características de superfície auxiliam as interações das NP com a parede celular de bactérias e fungos (FAKHROUEIAN et al., 2014). Diferentes atividades antimicrobianas são encontradas nas amostras de NP de ZnO, que aumenta com o aumento da quantidade de ZnO (FAROUK et al., 2014).

Leung e colaboradores, (2012) estudaram a atividade antimicrobiana de NP de ZnO com superfície modificada. A pesquisa teve por objetivo avaliar a atividade antibacteriana de nanopartículas, modificadas com diferentes silanos: i) dodecyltrichlorosilane, ii) (3-aminopropyl) trimethoxysilane e iii) 3-(methacryloyloxy) propyltrimethoxysilane em bactérias gram-positivas *Bacillus atrophaeus* e *Enterococcus faecium* e gram-negativas *E.coli*. De acordo com os resultados apresentados, diferentes modificadores de superfície podem alterar a atividade antibacteriana do ZnO, uma vez que alteram a produção de  $Zn^{2+}$  e espécies reativas de oxigênio, no entanto, maiores quantidades de  $Zn^{2+}$  não está relacionado com o aumento da atividade, uma vez que uma das amostras contendo o modificador (3-aminopropyl) trimethoxysilane exibiu menor produção de  $Zn^{2+}$  e ao mesmo tempo melhor atividade. As bactérias morrem com ou sem o modificador por envolver danos à membrana celular. Revestimentos de superfície a base de silanos, contendo grupamento amino podem causar danos à estrutura celular deformando-a, ou seja, mesmo sem o ZnO, eles podem possuir atividade antibacteriana por causarem mudanças na permeabilidade da membrana e por esse motivo, vazamento de conteúdos celulares.

Moussodia e colaboradores, (2010) realizaram modificação de PQ de ZnO, pela ligação covalente de poli(amido amina) (PAMAM), que possui natureza ramificada e grupos

multivalentes disponíveis para ligação e alta afinidade em água, assim, manteve-se a característica luminescente. Por esse motivo, pontos quânticos de ZnO obtidos foram utilizados para obter imagens de *Staphylococcus aureus* através de microscopia confocal.

Um estudo realizado por Arakha e colaboradores, (2015) mostrou modificações em NP de ZnO resultando em dois tipos de superfície com potenciais opostos e estabeleceu uma correlação com o potencial zeta das células bacterianas, a carga de superfície das NP e o efeito antibacteriano. Os resultados mostraram que partículas carregadas positivamente apresentaram maior atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em comparação às carregadas negativamente, já que estas estabelecem força de repulsão com a superfície bacteriana que também possui cargas negativas.

A modificação de superfície em NP de ZnO, contendo o (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS), foi realizada por trabalho desenvolvido por Farouk et al., (2014), acerca da atividade de NP de ZnO como agente antibacteriano, aplicado em indústrias têxteis. Para essa finalidade, foram realizados testes de disco-difusão, com a observação do diâmetro da zona de inibição proporcional à atividade de NP de ZnO modificadas com GPTMS. O teste foi realizado contra *M. luteus* e *E.coli*. Os resultados mostraram que as amostras de algodão contendo ZnO modificado com GPTMS, após 5 horas de tratamento, reduziram a contaminação de *E. coli* em 98,8% e de *M. luteus* em 97,3%. O polímero sozinho não teve inibição, por isso pode-se concluir que o material têxtil desenvolvido teve atividade antibacteriana promissora.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais e equipamentos

#### *Materiais*

- Acetato de zinco diidratado ( $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ ) – Qhemis, 99-102,5%;
- Hidróxido de Lítio monoidratado - Vetec Química Fina, 98%;
- Álcool Etílico absoluto PA – Synth, 99,5%;
- (3- Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS), Sigma;
- Heptano – Synth, 99%;

- Ágar Mueller Hinton- - Acumedia;
- Meio RPMI1640 – Sigma-Aldrich;
- Ágar Sabouraud- Acumedia;
- Ampicilina- Medley genéricos;
- Anfotericina B- Sigma-Aldrich;
- Fluoconazol;
- Dimetilsulfóxido- Labsynth;
- Resazurina- Sigma-Aldrich.

### *Equipamentos*

- Lavadora ultrassônica Digital SoniClean 2- Seers Medical;
- Centrífuga- Solab Centrífuga SL-700;
- Estufa à vácuo- Microtube;
- Espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis;
- Microscópio Eletrônico de Transmissão- PHILIPS; modelo CM 200 SUPER TWIN;
- Difração de Raios X- SIMENS modelo D5000, DIFFRAC PLUS XRD Commee;
- SDT 600 Simultaneous DTA/TG da TA Instruments;
- Detector Pilatus 300K- Dectris;
- Forno Linkan- DSC600;
- Detector Pilatus 100K- Dectris;
- Phmetro; PG2000, da Gehaka;
- Balança digital Ohaus;
- Agitador de tubos – Vision KMC 1300V
- Autoclave vertical – Fabbe 103;
- Bico de Bunsen
- Câmara de fluxo laminar – Veco
- Câmara de Neubauer - Boeco
- Estufa de incubação bacteriológica– Fanem 315 SE
- Micropipetas e multicanais com volume ajustável de 5 a 50  $\mu\text{L}$ , 40 a 200  $\mu\text{L}$ , 200 a 1000  $\mu\text{L}$ - High tech lab
- Ponteiras descartáveis para volume de 5 a 200  $\mu\text{L}$  e 200 a 1000  $\mu\text{L}$

- Sistema de purificação de água Milli Q – Millipore
- Placas de 96 poços- TPP 92096 e Costar ;
- Placas de Petri;
- Palito de dente esterilizado;
- Ponteiras descartáveis para volume de 5 a 200  $\mu\text{L}$  e 200 a 1000  $\mu\text{L}$ ;
- Vidrarias em geral.

## **4.2. Síntese das NP de ZnO**

### **4.2.1. Preparação do precursor de oxiacetato de zinco**

As NP de ZnO foram originadas a partir de um precursor, sintetizado através de uma solução contendo etanol absoluto e acetato de zinco  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ ), mantida sob refluxo durante 2 horas a  $80^\circ\text{C}$ . Foi acoplado ao sistema de destilação um balão com gás nitrogênio com a finalidade de evitar o contato da solução precursora com a umidade do ambiente. Após passadas 2 horas, houve a adição de 500 mL de etanol absoluto, resultado em uma solução contendo  $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$  de acetato de zinco  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . A solução precursora foi resfriada à temperatura ambiente e armazenada no freezer à temperatura de  $-10^\circ\text{C}$ .

**Figura 2.** Esquema de preparação do precursor



#### 4.2.2. Suspensão coloidal de nanopartículas de ZnO

A etapa de condensação e hidrólise foi realizada para a obtenção das nanopartículas de ZnO a partir da adição de hidróxido de lítio (LiOH) à solução precursora. A quantidade de LiOH variou para dar origem à diferentes razões de hidrólise  $r = [\text{OH}^+]/[\text{Zn}^{2+}]$  com a finalidade de avaliar as mudanças de tamanho das NP sintetizadas em diferentes razões de hidrólise. Após a adição de LiOH ao precursor, as amostras foram submetidas ao banho de ultrassom (Lavadora Ultra- Sônica Digital SoniClean 2 – Seers Medical) a temperatura de 50°C em diferentes tempos. Ao final da reação (interrompida em 3 e 24 horas de síntese por meio da refrigeração a -5°C), obteve-se suspensões coloidais de nanopartículas de ZnO. Através da adição do heptano à suspensão de NP de ZnO, na proporção NP: heptano de 4:1 foi possível obter um precipitado, o qual foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm e seco em estufa à vácuo à temperatura ambiente.

#### 4.2.3. Modificação da superfície de nanopartículas de ZnO

A modificação de superfície de nanopartículas de ZnO foi realizada através da ligação com (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GPTMS) com a superfície das nanopartículas de ZnO com o intuito de torna-las estáveis em água e assim possibilitar aplicações biológicas. Para isso, foi adicionado a 10 mL de suspensão de ZnO, 0,1 M de GPTMS e 0,2 M de LiOH, promovendo assim uma nova etapa de hidrólise e condensação. A reação ocorreu em banho de ultrassom à temperatura ambiente durante 30 minutos. Ao final da reação pode-se observar a formação de um precipitado branco, que foi separado através de centrifugação por 10 minutos a 4000 rpm e seco em estufa à vácuo à temperatura ambiente. A tabela 1 representa os diferentes tipos de amostras que foram estudadas durante o trabalho e suas condições de síntese.

**Tabela 1.** Amostras utilizadas no trabalho

<i>Amostra</i>	<i>Descrição</i>
$r = 1.4$	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.4$ sintetizada em 24 horas à 50°C e modificada com GPTMS
$r = 6.0$	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 6.0$ sintetizada em 3 horas à 50°C e modificada com GPTMS
<i>ZnO_GPTMS_3h</i>	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ sintetizada em 3 horas à 50°C e modificada com GPTMS
<i>ZnO_3h</i>	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ sintetizada em 3 horas à 50°C com ausência de GPTMS
<i>ZnO_GPTMS_24h</i>	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ sintetizada em 24 horas à 50°C e modificada com GPTMS
<i>ZnO_24h</i>	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ sintetizada em 24 horas à 50°C com ausência de GPTMS
<i>ZnO_GPTMS_3h_mufla</i>	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ sintetizada em 3 horas à 50°C e modificada com GPTMS, seguida por tratamento térmico na mufla por 5 horas a 600°C
<i>ZnO_3h_mufla</i>	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ sintetizada em 3 horas à 50°C com ausência de GPTMS, seguida por tratamento térmico na mufla por 5 horas a 600°C
<i>ZnO_GPTMS_24h_mufla</i>	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ sintetizada em 24 horas à 50°C e modificada com GPTMS, seguida por tratamento térmico na mufla por 5 horas a 600°C
<i>ZnO_24h_mufla</i>	$r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ sintetizada em 24 horas à 50°C com ausência de GPTMS, seguida por tratamento térmico na mufla por 5 horas a 600°C

### 4.3. Métodos de caracterização das nanopartículas de ZnO

#### 4.3.1. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

SAXS é um método analítico utilizado para determinar a estrutura de sistemas nanoparticulados de materiais sólidos, líquidos contendo sólidos, entre outros. O tamanho das partículas ou das estruturas que podem ser mensurados por SAXS é na ordem de 1 a 100 nm, dessa forma, pode-se obter informações de tamanho, a forma e a quantidade dos objetos espalhadores, tais como: moléculas biológicas dispersas em um meio líquido, polímeros, micelas e NP em um meio homogêneo (SCHANABLEGGER; SINGH, 2013).

A técnica de SAXS também permite explorar informações sobre a distribuição espacial de partículas no meio, além de fornecer detalhes sobre suas interações no caso de sistemas anisotrópicos. A estrutura e as interações com o sistema podem ser investigadas por análises da variação da intensidade de raios X espalhados em função do ângulo de espalhamento  $\theta$  (MANAIA, 2016).

Os perfis das curvas de SAXS para sistemas diluídos de partículas podem fornecer maiores informações sobre os parâmetros das NP, tais como: tamanho, forma e presença de agregados. Através de um plot log da intensidade de  $q$  versus  $q^2$  das curvas de SAXS pode-se observar uma região linear a baixos valores de  $q$ , chamada de região de Guinier, a qual fornece o raio de giro ( $R_g$ ) dos objetos espalhadores que é correspondente ao raio da partícula individual e/ou agregados. Essa região é válida no intervalo ( $0 < q < 1/R_g$ ), (GUINIER; FOURNET, 1955; CAETANO et al., 2011; MANAIA, 2016).

As medidas de SAXS das nanopartículas de ZnO com e sem modificação pelo GPTMS foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS-Brasil), na linha SAXS1. Esta linha é equipada com um monocromador ( $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$ ) e um detector vertical localizado cerca de 0,9m da amostra e um analisador multicanal para registrar a intensidade do espalhamento  $I(q)$ , em função do vetor de espalhamento,  $q$ . Com essa técnica foi possível acompanhar o crescimento e o tamanho das NP de ZnO.

Para estudos de crescimento, o precursor foi previamente preparado seguindo os processos descritos na metodologia. Uma solução etanólica de LiOH foi preparada a 0,1 M. Tanto a solução de LiOH quanto o precursor foram colocados em um capilar em volume necessário para resultar em  $r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$  e posteriormente esse capilar foi adicionado ao forno Linkan, que permitiu o controle da temperatura em  $50^\circ\text{C}$  por 180 minutos.

Vale ressaltar que os dados de SAXS foram normalizados levando em conta o tempo de aquisição e transmissão de cada amostra, sendo que a intensidade dispersa dos porta amostras e os solventes utilizados como etanol e água foram subtraídos da intensidade total. A análise dos dados foi realizada utilizando o pacote de software SASFIT. (KOHLBRECHER; BRESSLER, 2014).

#### **4.3.2. Potencial zeta**

O potencial zeta das dispersões de nanopartículas de ZnO em água foi medido com o equipamento ZetaSizer Nano ZS Zen3600 (Malvern Instruments) através da titulação ácido-base. Duas concentrações das NP de ZnO foram utilizadas, sendo 5mg/ml e 0,5mg/mL. As medidas foram feitas em triplicata e o pH foi ajustado com soluções de HCl (0,1 M) e NaOH (0,1 M), dentro do intervalo de pH 3-11.

#### **4.3.3. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)**

Os espectros de absorção no UV-Vis das suspensões de ZnO e da dispersão de ZnO GPTMS em água foram coletados usando o Espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis utilizando a sonda de imersão com probe de caminho ótico de 2 mm. A faixa de comprimento de onda variou de 200 a 500 nm, sendo o tempo médio de leitura de 0,2 s e o intervalo de dados de 1nm. O etanol foi utilizado para realizar a medida de linha de base dos experimentos para as suspensões coloidais de ZnO enquanto a água mili-Q foi utilizada como linha de base para as amostras dispersas em água. O teste de estabilidade da suspensão de NP de ZnO e das dispersões de NP de ZnO em água também foram realizados a partir dos espectros de absorção no UV-vis.

A determinação do tamanho médio das NP de ZnO pode ser calculada a partir do comprimento de onda limite ( $\lambda_c$ ), por meio do método proposto por Nidelijkovic, determinado através da intersecção da tangente ao pico excitônico até o limiar do comprimento de onda (NEDELIJKOVIC et al., 1993). A partir do  $\lambda_c$ , com a equação I proposta por (BRUS, 1986) foi possível calcular o tamanho médio das NP já que o comprimento de onda limite está relacionado com a banda proibida ( $E_g = h c / \lambda_c$ ), onde  $h$  é a constante de Planck e  $c$  é a velocidade da luz, encontrando o valor de  $E_g$  é possível obter o raio da partícula.

$$E_{g(QD)} = E_{bulk} + \frac{h^2}{8R^2} \left( \frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.786e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r R^2}$$

(Equação 1.)

Onde:

$E_g$  = gap de energia da partícula;

$E_g^{bulk}$  = gap de energia da partícula semicondutora;

$h = h/2\pi$ , sendo  $h$  constante de Plank, assumindo valor de  $6,62 \times 10^{-34}$  J·s

$R$  = raio da partícula;

$e$  = carga do elétron =  $1,603 \times 10^{-19}$  C;

$\epsilon_0$  = permissividade do espaço livre =  $8,854 \times 10^{-14}$  F;

$\epsilon$  = permissividade relativa = 3,7;

$m_0$  = massa do elétron livre =  $9,110 \times 10^{-31}$  kg;

$m_e^*$  = massa efetiva do elétron = 0,24;

$m_h^*$  = massa efetiva do buraco = 0,45

#### 4.3.4. Análise Termogravimétrica

O equipamento utilizado para obtenção dos termogramas foi o SDT 600 Simultaneous DTA/TG da TA Instruments, do Grupo de Físico Química de Materiais (GFQM) do Instituto de Química (IQ) UNESP Araraquara. As amostras foram acondicionadas em cadinhos de alumina de 90 $\mu$ L e aquecidas com uma taxa de 10 ° C/min sob fluxo de nitrogênio de 50mL/min. As medidas foram monitoradas entre 25 e 1000°C. Após a análise termogravimétrica utilizou-se uma Mufla Bravac Contemp TCM77 para tratar os pós termicamente. Os cadinhos de porcelana foram tratados previamente através de aquecimento gradual na mufla e armazenados no dessecador para evitar contato com umidade. As amostras foram adicionadas nos cadinhos tratados e aquecidas de 25°C a 600°C por 5 horas.

#### 4.3.5. Difração de raios X

Os raios X difratados por um material cristalino a ângulos específicos obedecem a lei de Bragg:  $2d \sin \theta = n\lambda$ , onde  $d$  é a distância interplanar;  $n$  é um número inteiro,  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios X e  $\theta$  é o ângulo de espalhamento (DONG; BOYD, 2011).

É possível calcular o tamanho do cristalito ( $D$ ) para cada direção cristalográfica através da fórmula de Scherrer:

$$D = K \cdot \lambda / \beta \cdot \cos \Theta \quad (\text{Equação II})$$

Onde,  $K$  é o fator de forma, e para o ZnO assume o valor de 0,89;  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios X utilizado no experimento;  $\beta$  é a largura meia altura, em radianos e  $\Theta$  corresponde ao ângulo de difração de Bragg (SCHERRER et al., 1995).

Para a realização da difratometria de raios X das amostras em pó foi utilizado o difratômetro de raios X, marca SIEMENS, modelo D5000 do GFQM-IQ- UNESP Araraquara. Os parâmetros utilizados foram  $2\theta = 5 - 70^\circ$ ; passo  $0,01^\circ$ ; tempo = 1 segundo.

#### 4.3.6. Espalhamento de raios X a alto ângulo (WAXS)

As medidas de WAXS foram realizadas no Laboratório nacional de luz síncrotron na linha SAXS1 através do acoplamento de um detector Pilatus 100 da Dectris, usado para aquisição das imagens de WAXS.

#### 4.3.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O equipamento utilizado para realizar as micrografias foi o Microscópio Eletrônico de Transmissão PHILIPS, modelo CM 200; SUPER TWIN. As amostras de NP de ZnO diluídas foram devidamente gotejadas em grades de carbono, sendo possível também observar imagens de alta resolução.

#### 4.3.8. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS)

Através de um detector acoplado à câmara de vácuo do microscópio eletrônico de transmissão foi possível utilizar a técnica de EDS para fornecer uma análise elementar das amostras.

#### 4.4. Avaliação do potencial antimicrobiano

##### 4.4.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A metodologia para determinação da CIM indica a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um microrganismo. Para as cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi utilizado a metodologia segundo a Norma M7-A10 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2016) adaptada, usando microplacas de 96 poços e meio Mueller Hinton. Para determinação da CIM das cepas de levedura *Candida albicans* (ATCC 90028) foi utilizada metodologia segundo a Norma M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de 2008 adaptada, usando microplacas de 96 poços e meio RPMI sem glicose (CLSI, 2008).

A ampicilina foi usada como antimicrobiano para as cepas bacterianas e para as cepas de leveduras foram utilizados a anfotericina B e o fluoconazol. Para a determinação da CIM, as amostras de NP de ZnO suspensas foram obtidas a partir de uma diluição (50,0mg/mL em DMSO) com finalidade de resultar em uma suspensão final com concentração de 5 mg/mL de NP de ZnO dispersas em água. O uso do DMSO foi apenas para as amostras que não continham GPTMS e necessitavam serem dispersas em água para possibilitar a realização do teste. A determinação da concentração das NP de ZnO a 5 mg/mL foi realizada através de um levantamento bibliográfico, em que foi possível encontrar uma pesquisa, desenvolvida por Arakha e colaboradores, 2015, que acessou a atividade antimicrobiana de NP de ZnO por meio da determinação da CIM, utilizando uma suspensão estoque de NP de ZnO com concentração de 5 mg/mL.

Os testes foram realizados em câmara de fluxo laminar com presença de chama. O inóculo bacteriano foi obtido segundo a turvação na escala 0,5 de McFarland utilizando o meio caldo Mueller Hinton, enquanto a concentração do inóculo de leveduras foi obtida segundo a contagem na Câmara de Neubauer, visando  $2 \times 10^4$  UFC/mL células/mL, utilizando solução salina 0,9%.

Nas placas foram realizados os controles positivo para a determinação do crescimento microbiano e negativo para a confirmação da esterilidade do meio. O controle positivo de fármaco visou a confirmação da inibição pelo fármaco de referência, enquanto o controle negativo do DMSO foi realizado com objetivo de eliminar a interferência do solvente na

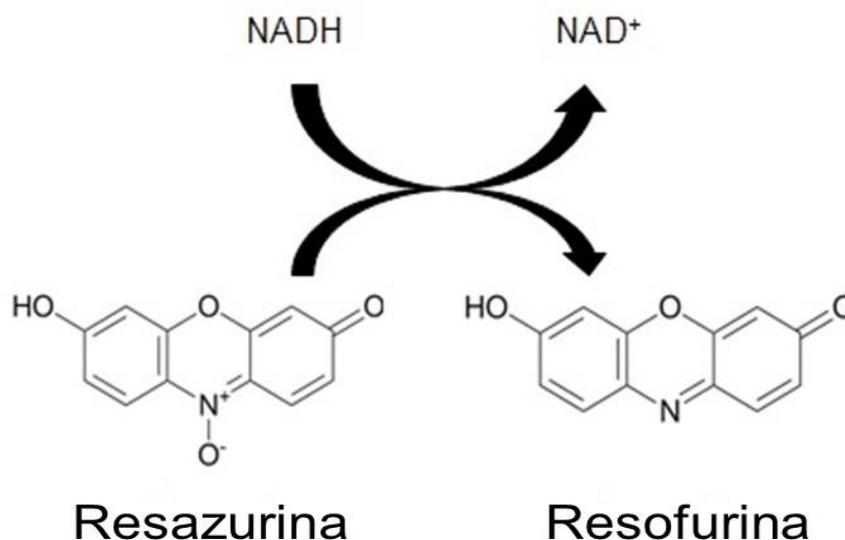
inibição dos microrganismos, além disso as amostras também passaram por controle de esterilidade.

Foram adicionados 100 µL de meio na microplaca de 96 poços e a seguir 100 µL de amostra na concentração inicial e de controle da amostra. Também foi adicionada amostra de controle do fármaco. Após foi realizada a diluição seriada, na qual as amostras e os controles dos fármacos nos poços iniciais foram transferidos para os poços seguintes, sempre homogeneizando e transferindo 100 µL para o próximo poço, sendo descartado 100 µL no último poço. Após a diluição seriada, adicionou-se o inóculo. Para isso, foi utilizado a escala 0,5 MC Farland previamente preparada e armazenada na geladeira para ajuste do inóculo bacteriano. O caldo Mueller Hinton de crescimento foi agitado e aproximadamente 100 a 200 µL desse caldo foi adicionado à salina contida no tubo para comparação até apresentar a mesma turbidez da escala 0,5 Mc Farland. A suspensão devidamente ajustada foi diluída 1:100 em meio Mueller Hinton e devidamente homogeneizada. Aplicou-se 100 µL dessa diluição em cada poço da placa, exceto nos controles da amostra e de esterilidade do meio.

A concentração do inóculo para *Candida albicans* foi de  $2 \times 10^4$  células/mL e para o preparo do inóculo de levedura, foi utilizado o caldo Sabouraud de repique (100 a 200 µL), que foi passado para salina e da salina para a câmara de Neubauer para a realização da contagem. Após a homogeneização foram aplicados 100 µL em cada poço da placa, exceto nos controles da amostra e esterilidade do meio. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa microbiológica para as bactérias e para as leveduras durante 24 horas na temperatura de 35,5°C com agitação de 100 rpm.

A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela adição de 30 µL de uma solução aquosa de resazurina após a incubação de 37°C por 1 hora. A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que é utilizado para avaliar viabilidade celular (PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO, 2005). A conversão da resazurina pela desidrogenase em produto reduzido, a resorufina (figura 3) pode ser acompanhado pela mudança de cor azul, que absorve em 610 nm, para a cor rosa da resorufina, que absorve em 580 nm (BROUWER, 1991).

**Figura 3.** Conversão da Resazurina, adaptada do artigo “Cell Viability Assays” (RISS et al., 2016).



A presença da cor azul representa ausência de crescimento enquanto a cor rosa é interpretada como presença de crescimento microbiano. Foi determinada como concentração inibitória mínima a menor concentração que inibiu o crescimento microbiano. Após o período de incubação, a leitura visual das placas foi realizada e, em seguida foram retiradas amostras para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM).

#### **4.4.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) e fungicida mínima (CFM)**

Após a leitura visual da placa de 96 poços, uma placa de Petri com ágar Mueller Hinton e Sabouraud previamente preparada foi utilizada para inóculo. Foi impresso um guia representativo dos poços da placa de 96 poços e colado na placa de petri. Palitos estéreis foram embebecidos em cada poço da placa e aplicado ao ágar no quadrado correspondente ao respectivo poço do guia. As placas foram incubadas na temperatura de 37°C para as bactérias e levedura.

#### 4.4.3. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi realizada para acessar informações sobre as mudanças morfológicas em *S. aureus* após ser submetido ao tratamento com as NP de ZnO. Para isso, imagens foram obtidas da bactéria sem e com NP de ZnO. Para a realização do teste, foi necessário preparar as amostras seguindo o mesmo protocolo de tratamento descrito no item anterior, sendo que etapas adicionais foram necessárias. O protocolo foi obtido segundo Arahka e colaboradores, (2015) com algumas modificações. As bactérias foram preparadas e colocadas em contato com as NP de ZnO, incubadas por 24 horas, após esse período, o meio de tratamento foi removido e lavado 3 vezes com tampão fosfato pH 7.2, seguido pela adição de glutaraldeído a 2% (usado como agente fixador) e incubação overnight a 4°C. A solução de fixação foi removida e iniciou-se uma bateria de desidratação em etanol com concentração crescente 50% (1h e 30 min a -20°C), 70% (1h e 30 min a -20°C), 85% (1h a 4°C) 95% (overnight a 4°C), 95% (1h a 4°C), 100% (1h a 4°C), 100% (overnight a 4°C) e 100% por 1 hora a temperatura ambiente. Após a última bateria de etanol, foi centrifugado e suspenso novamente cada pelet em 50 µL de etanol 100%. Em uma placa de 6 poços, foi colocado uma lamínula sobre um papel de filtro, sendo que os 50 µL do pelet suspenso em etanol foi adicionado no centro da lamínula. O etanol foi evaporado em estufa a 37°C e transferido para o dessecador à vácuo com sílica. As amostras foram metalizadas com filme de ouro durante 20 segundos. O microscópio utilizado foi modelo TopconSM- 300 com detector de elétrons secundários com voltagem de aceleração de elétrons de 10Kv.

#### 4.4.4. Ensaio de citotoxicidade

Para a realização do teste de citotoxicidade em HaCat foi utilizada as NP de ZnO modificadas com GPTMS e dispersas em água nas concentrações de 60, 30, 15, 7.5 3.75 e 1.875 µg/mL. As células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina a 1% (100 U / mL) e estreptomicina (100 µg/ mL), mantidas num recipiente umidificado a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Quando a monocamada celular apresentou confluência de 80-90% nas garrafas de cultivo, após a terceira passagem, elas foram tripsinizadas, centrifugadas a 1500 rpm por 3 minutos e semeadas na placa de 96 poços. A tripsina foi neutralizada utilizando o meio de cultura soro fetal bovino.

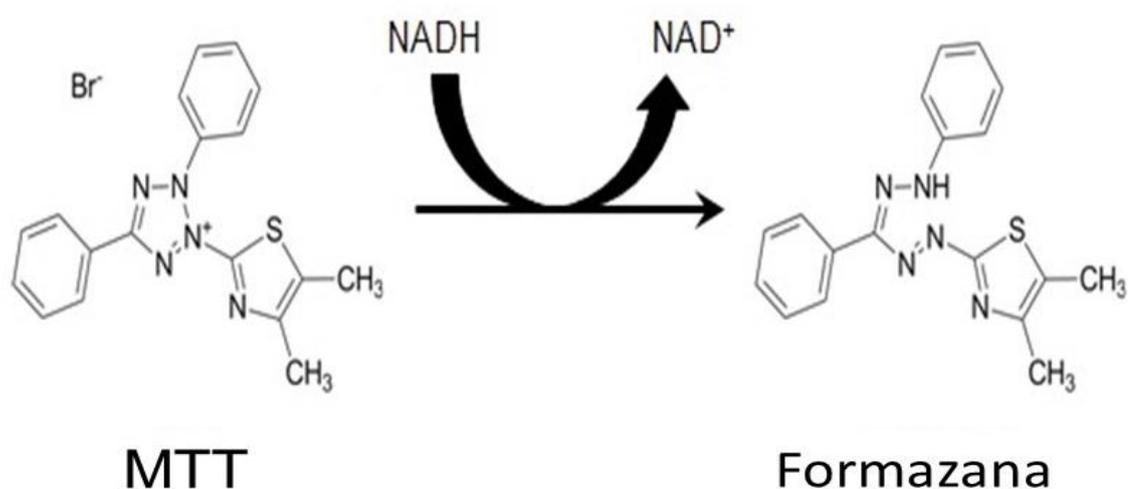
Para o ensaio 2,5x10<sup>4</sup> células por poço foram semeadas em placa de cultura celular com 96 poços em um volume total de 100 µL por poço. As placas foram incubadas por 24

horas para adesão completa das células às placas de 96 poços. Posteriormente as células foram tratadas com 100  $\mu$ L de controle positivo (dimetilsulfóxido a 10%), controle negativo (meio de cultura sem soro fetal bovino) e diferentes concentrações da solução mãe contendo as NP de ZnO, durante 24 horas. Em seguida, as placas foram lavadas para a remoção do meio de cultura e foi adicionado 100  $\mu$ L do corante 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (1 mg/mL em PBS) em cada poço e as células foram incubadas a 37°C.

Nesse método, pela atividade de uma enzima presente na mitocôndria (desidrogenase mitocondrial), as células vivas são capazes de reduzir o MTT, dando origem a formação de cristais de formazana (figura 4) de coloração violeta, sendo que a coloração é proporcional à presença de células viáveis. Dessa forma, através da quantificação dos cristais de formazana (solubilizado em isopropanol), por espectroscopia no UV-vis (540 nm) pode-se quantificar a porcentagem de células vivas.

Foram realizados três experimentos independentes e as concentrações testadas em triplicada. O protocolo foi seguido segundo Zheng e colaboradores, 2004, sendo que a porcentagem de células mortas foi calculada segundo o controle negativo de cada experimento e em seguida foi determinada a porcentagem de células vivas.

**Figura 4.** Conversão do MTT. Figura adaptada do artigo “Cell Viability Assays” (RISS et al., 2016)



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização físico-química

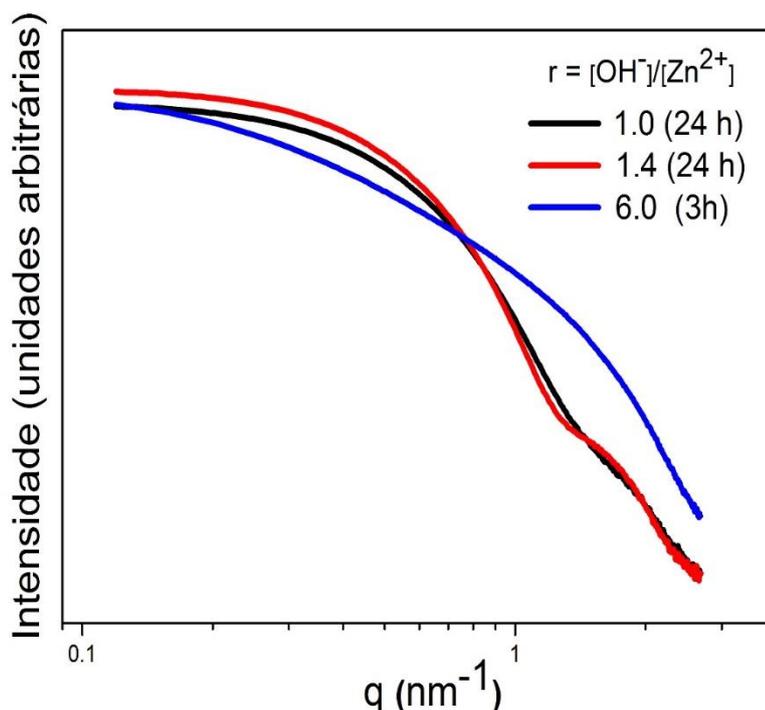
#### 5.1.1. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

Entre os parâmetros que podem influenciar o tamanho das NP de ZnO formadas encontram-se a alteração da razão de hidrólise  $r = ([\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}])$ , a temperatura de síntese e o tempo de reação (TOKUMOTO et al., 2003; ASOK et al., 2012). Dessa forma, como o intuito da pesquisa foi avaliar a relação da atividade antimicrobiana das NP de ZnO dependente do seu tamanho, inicialmente foram sintetizadas amostras de NP de ZnO em diferentes razões de hidrólise e tempo de reação com a finalidade de avaliar a mudança do tamanho das nanopartículas que são dependentes desses parâmetros.

Para isso, medidas de SAXS foram realizadas para as dispersões de NP de ZnO em água das amostras de razão de hidrólise  $r = ([\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}])$  de 1.0; 1.4 e 6.0, modificadas com GPTMS. A figura 5 mostra a um plot log-log da intensidade de espalhamento  $I(q)$  versus o vetor de espalhamento ( $q$ ) das curvas de SAXS de NP de ZnO, sintetizadas com diferentes razões de hidrólise  $r = 1.0; 1.4$  e 6.0, modificadas com GPTMS e dispersas em água. Os perfis das curvas de SAXS para amostras de  $r = 1.0$  e 1.4 apresentaram-se relativamente semelhantes, entretanto a amostra de  $r = 6.0$  não apresentou o mesmo padrão na curva em relação às demais amostras.

Observa-se que para as amostras com  $r = 1.0$  e 1.4 há presença de um patamar bem definido em baixas regiões de  $q$ , correspondente à região de Guinier, característico de sistemas diluídos de partículas. No entanto, para a razão de hidrólise 6.0 foi possível observar apenas uma tendência a formação de um patamar em regiões de  $q$  pequeno. Essa característica mostra que provavelmente para as NP de ZnO sintetizadas nessa razão de hidrólise, seria necessário realizar medidas de SAXS em menores regiões de  $q$ , com a finalidade de observar a região de Guinier. Isso revela também que as amostras obtidas com razão de hidrólise 6.0 possuem partículas ou agregados de maior tamanho.

**Figura 5.** Curvas de SAXS de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas em diferentes razões de hidrólise  $r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}]$ .



As análises de dados de SAXS foram realizadas utilizando o pacote de software SASFIT. A partir da região de Guinier é possível aplicar um modelo matemático que possibilita o cálculo do raio de giro ( $R_g$ ) dos objetos espalhadores, o qual pode ser calculado de acordo com a *equação III*. As curvas de SAXS também foram ajustadas por um fator de forma de esferas homogêneas utilizando distribuição de raio LogNor. Dessa forma, pode-se obter o raio da esfera ( $R_{\text{esfera}}$ ).

$$I(q) = I(0) \exp(-R_g^2 q^2/3) \quad (\text{Equação III})$$

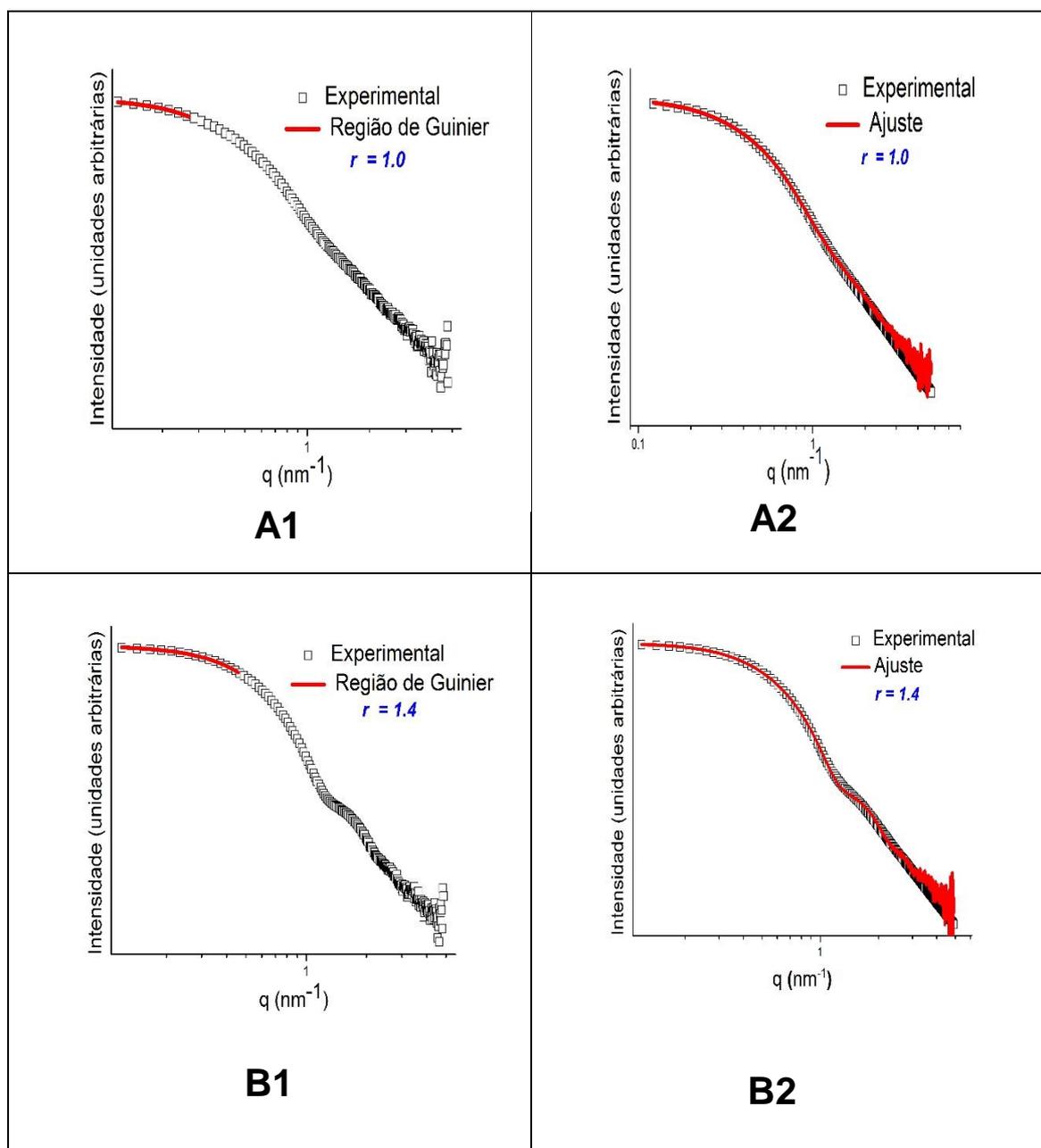
Onde,  $I(0)$  é a intensidade de espalhamento dada pela relação entre a densidade eletrônica dada entre as fases ( $p_0 - pm$ ), número ( $N$ ) e volume médio ( $V_0$ ) das partículas, conforme mostrado na equação IV.

$$I(0) = N (p_0 - pm)^2 V_0^2 \quad (\text{Equação IV})$$

Para fins de ilustração da região de Guinier e do ajuste do modelo de esfera, a figura 6 traz novamente o plot log-log da intensidade de espalhamento versus o vetor de espalhamento das curvas de SAXS de NP de ZnO modificadas com GPTMS e dispersas em água, para as

amostras representadas na figura 5 as quais apresentaram platô na região de Guinier. Sendo que na figura em vermelho A1 e B1, correspondem à região de Guinier para  $r = 1.0$  e  $1.4$ , respectivamente e A2 e B2 mostra o ajuste do modelo de esfera para  $r = 1.0$  e  $1.4$ , respectivamente, o qual foi calculado seguindo os parâmetros anteriormente descritos.

**Figura 6.** Curvas de SAXS de nanopartículas de ZnO, em água, modificadas com GPTMS. A1 e B1 mostram a região de Guinier para as amostras de razão de hidrólise 1.0 e 1.4, enquanto A2 e B2 mostram o fit do modelo de esfera.



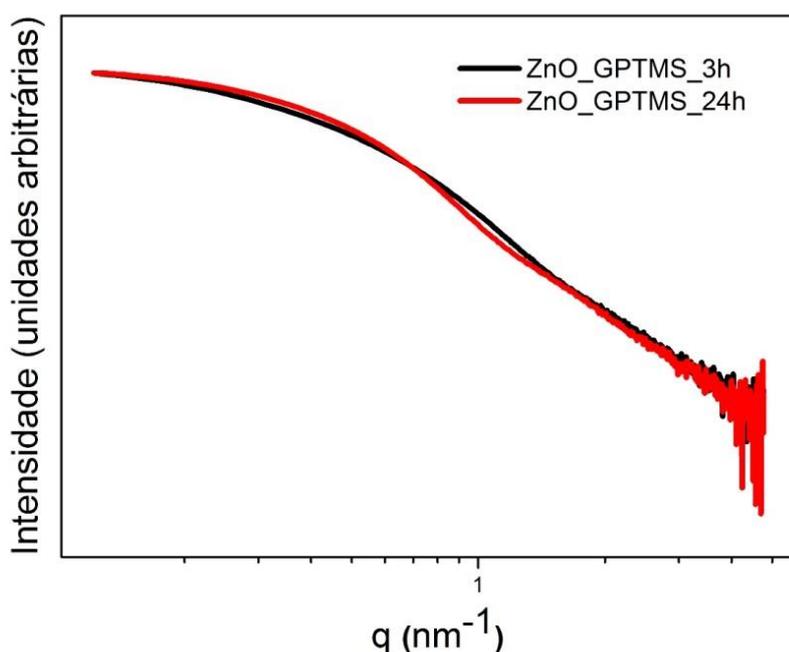
Entre as amostras testadas, houve a necessidade de selecionar uma razão de hidrólise para trabalhar com a alteração de somente um parâmetro e dessa forma prosseguir a

caracterização. Nesse sentido, a amostra selecionada foi a de razão de hidrólise 1.0, uma vez que utiliza menor número de reagente para a síntese, tomando-a mais econômica.

O parâmetro escolhido para avaliar a mudança de tamanho das NP foi o tempo de reação. Assim, denominou-se ZnO\_GPTMS\_3h e ZnO\_GPTMS\_24h para as NP de ZnO sintetizadas em 3 e 24 horas, respectivamente. Para esse fim, é necessário avaliar qual foi tamanho das NP de ZnO quando submetido a 3 e 24 horas de reação.

A figura 7 mostra o plot log-log da intensidade de espalhamento versus o vetor de espalhamento das curvas de SAXS de NP de ZnO sintetizadas em 3 e 24 horas, modificadas com GPTMS e dispersas em água. Pode-se observar um perfil das curvas de SAXS muito parecidos independente do tempo de reação, isso porque as curvas encontram-se quase que sobrepostas, dessa forma espera-se que tenham tamanhos parecidos. Os valores do  $R_g$  e  $R_{esfera}$  estão representados na tabela 2. Conforme observado, não há mudança significativa do tamanho das NP com a alteração do tempo de reação. Isso é evidenciado na figura 7, pois nota-se que as curvas para 3 e 24 horas de reação apresentaram padrão muito semelhante. Uma possível explicação para isso pode ser atribuída ao LiOH que pode fornecer uma camada de passivação na superfície do ZnO, inibindo o seu crescimento (VISWANATHA et al., 2007; CAETANO et al., 2011).

**Figura 7.** Curvas de SAXS de nanopartículas de ZnO, modificadas com GPTMS, submetidas a diferentes tempos de reação.



**Tabela 2.** Valores de  $R_g$  e  $R_{esfera}$  encontrados para amostras de NP de ZnO sintetizadas em diferentes razões de hidrólise  $r = ([OH^-]/[Zn^{2+}])$  de 1.0; 1.4 e tempo de reação.

Amostra	Descrição	$R_g$	$R_{esfera}$
ZnO_GPTMS_3h	$r = [OH^-]/[Zn^{2+}] = 1.0$ (3 horas de reação/modificada com GPTMS)	5,2 nm	4,7 nm
ZnO_GPTMS_24h	$r = [OH^-]/[Zn^{2+}] = 1.0$ (24 horas de reação/modificada com GPTMS)	5,5 nm	4,5 nm
$r = 1.4$	$r = [OH^-]/[Zn^{2+}] = 1.4$ (24 horas de reação/modificada com GPTMS)	3,7 nm	3,5 nm

### 5.1.2. Estudo do crescimento de ZnO por SAXS

Como a síntese sol-gel permitir o controle e acompanhamento das etapas de formação e crescimento das partículas (CAETANO et al., 2011) e a radiação síncronon torna capaz de realizar medidas de SAXS in situ, fornecendo dados de acompanhamento reacional, novas medidas de SAXS foram realizadas para fornecer dados acerca da evolução do tamanho das NP de ZnO ao longo da reação.

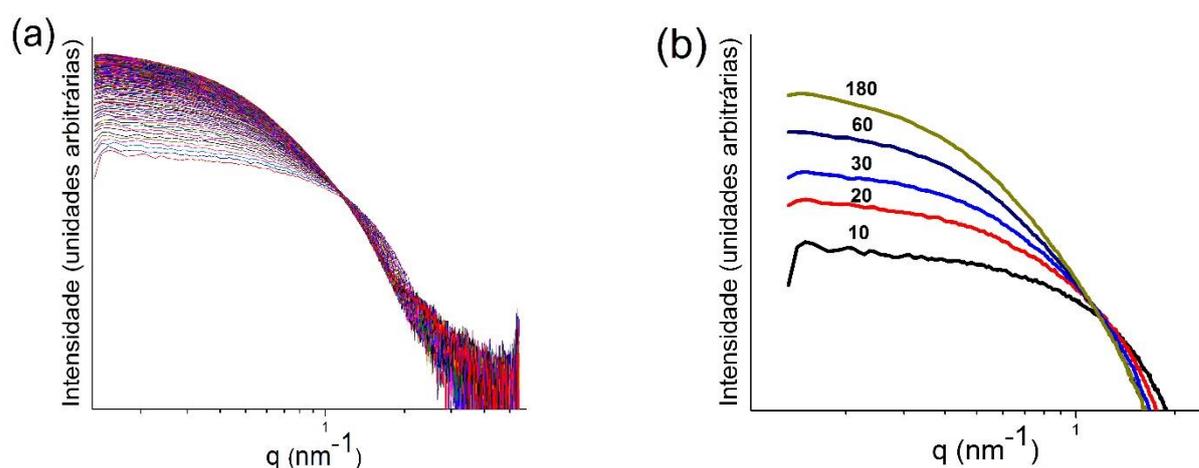
A importância de realizar esse estudo, deve-se ao fato de que um dos objetivos principais do trabalho é avaliar a atividade antimicrobiana dependente do tamanho das NP de ZnO, logo, conhecer os mecanismos pelos quais as NP aumentam de tamanho torna-se relevante.

Deve-se ressaltar que os perfis das curvas de SAXS de NP sintetizadas em 3 e 24 horas com  $r = 1.0$  foram muito parecidos, não apresentaram diferenças significativas em relação aos tamanhos das NP formadas. Dessa forma, o acompanhamento reacional foi realizado durante 3 horas, seguindo o procedimento anteriormente descrito na metodologia. Além disso, é importante ressaltar que as NP de ZnO analisadas encontram-se sem a presença do GPTMS, pois a modificação de superfície é uma etapa realizada após a síntese da suspensão coloidal de NP de ZnO, portanto a amostra acompanhada será denominada ZnO\_3h.

A figura 8 (a) representa um plot log-log das curvas de SAXS correspondentes a formação de NP de ZnO em função do tempo (180 minutos) a 50°C com  $r = 1.0$ . Para melhor visualização, algumas curvas foram selecionadas e são mostradas na figura 5 (b). As curvas apresentaram características de sistemas diluídos de partículas, dessa forma, em baixos

valores de  $q$  há a presença de um patamar correspondente à região de Guinier, onde a intensidade de espalhamento pode ser acompanhada pela *equação III* (GUINIER e FOURNET, 1955). Há claramente mudança no padrão das curvas de acordo com o tempo de reação, sendo demonstrada através do deslocamento da região de Guinier para valores menores de  $q$  de acordo com o aumento do tempo de reação, evidenciando o aumento do tamanho das NP formadas.

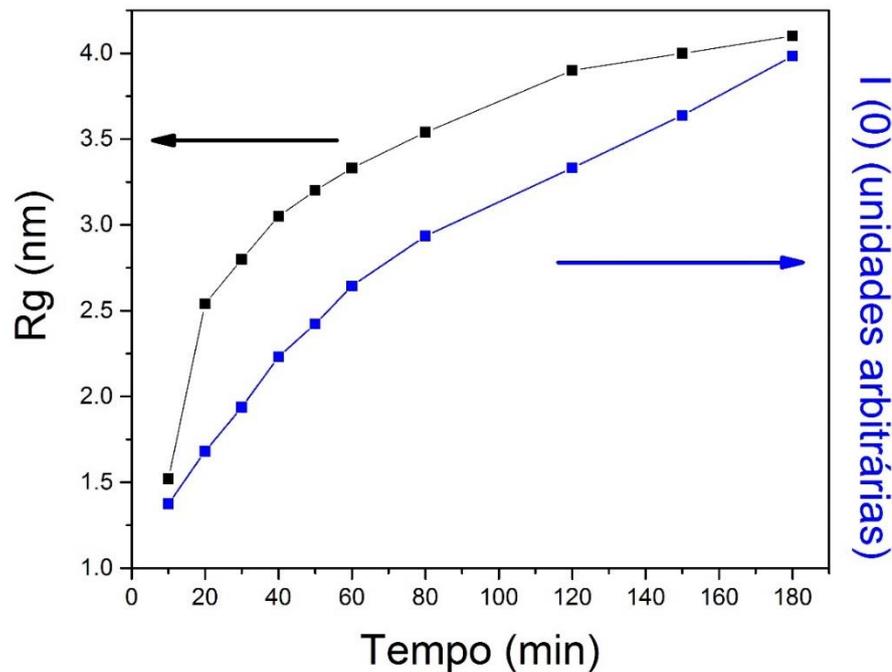
**Figura 8.** Evolução das curvas de SAXS de NP de ZnO, sintetizadas à 50° por 180 minutos



A Figura 9 apresenta a evolução temporal de  $I(0)$  e  $R_g$ . Observa-se um aumento de  $I(0)$  durante toda a reação.  $I(0)$  está relacionado com o número e tamanho das partículas, conforme mostra a *equação III* e *IV*. O  $R_g$  aumentou durante toda a síntese, indicando que as nanopartículas individuais aumentam de tamanho ou agregam, formando estruturas maiores, no entanto, esse aumento mostrou-se mais pronunciado no tempo de 10 a 20 minutos da reação, passando de 1,50 nm para 2,55 nm. Após esse período, as NP de ZnO continuam a crescer de forma mais lenta, por exemplo: em 120 minutos o  $R_g$  foi de 3,9 nm, enquanto em 180 minutos de 4,1 nm.

Durante todo o acompanhamento houve um aumento de  $I(0)$  acompanhado com o aumento do  $R_g$ . Esse resultado indica que as NP de ZnO aumentam conforme o processo de nucleação ocorre, pois provavelmente há um equilíbrio entre as partículas formadas e o precursor, favorecendo o processo de nucleação e crescimento (CAETANO et al., 2011).

**Figura 9.** Evolução temporal de  $I(0)$  e  $R_g$ .



### 5.1.3. Potencial zeta

O próximo passo foi avaliar a estabilidade coloidal das NP de ZnO modificadas pelo GPTMS em função do pH, para isso foram utilizadas medidas de potencial zeta dependente do pH.

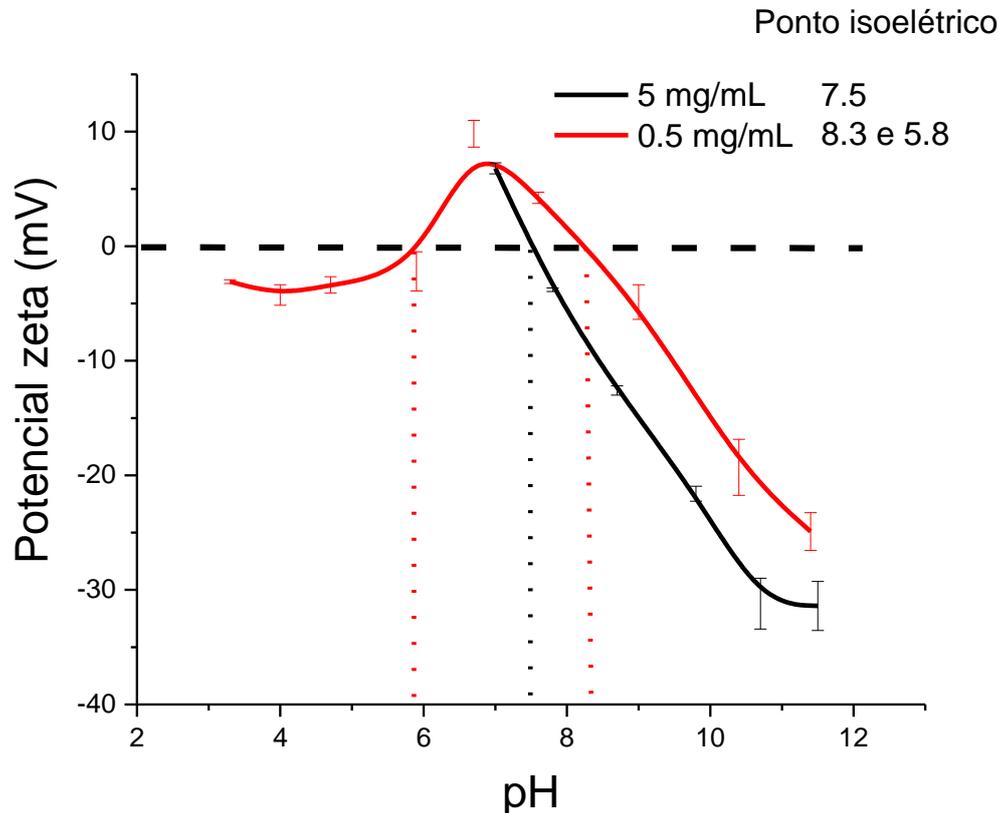
O potencial zeta consiste na diferença entre o potencial elétrico na superfície de cisalhamento da partícula e o potencial elétrico da solução, que pode ser determinado pela avaliação da velocidade da espécie carregada que se move em direção ao eletrodo, na presença de um campo elétrico externo (LIN et al., 2014).

A medida de potencial zeta fornece dados sobre a estabilidade das NP, pois através do estado eletrônico da superfície das NP é possível determinar a instabilidade resultante de espécies não carregadas, ou carregadas de maneira fraca (BRAR e VERMA, 2011). Dessa forma, a partir da soma das forças de repulsão e atração entre cada nanopartícula da dispersão há como determinar a estabilidade sendo que a instabilidade resulta em agregação, floculação ou coagulação. De forma geral, valores de potencial zeta inferiores à -30 mV ou superior à +30 mV está relacionado à alta estabilidade, enquanto as regiões intermediárias a esses valores indicam condições instáveis, pois a presença de forças repulsivas dominantes é importante para manter sistemas monodispersos (MANAIA et al., 2012; LIN et al., 2014)

A figura 10 mostra o comportamento do potencial zeta com a variação de pH para NP de ZnO modificadas com GPTMS (ZnO\_GPTMS\_24h), com concentração de 5 mg/mL e 0.5 mg/mL, e seus respectivos pontos isoelétricos (PI). A varredura do potencial zeta para as NP concentradas foi realizada de pH 11.0 até pH 7.0, isso porque não foi possível diminuir o pH para valores menores de 7.0. Uma explicação para esse fato pode ser devido à suspensão de NP de ZnO a partir de pH 7.0 ficarem muito turvas pois há alta concentração de NP, dificultando assim o espalhamento de luz. Por esse motivo, também foram realizadas medidas em amostra diluída, podendo assim acompanhar o potencial zeta em maior variação de pH.

Conforme observado, as NP de ZnO a concentração de 5 mg/mL apresenta PI em pH 7.5 enquanto para as NP com concentração de 0.5 mg/mL foram encontrados dois valores de PI, situados em pH 8.3 e 5.8. O valor de potencial zeta encontrado para pH 11 foi de aproximadamente -32 mV, indicando estabilidade das NP de ZnO a esse pH, resultando em altas forças de repulsão entre as NP o que minimiza a formação de agregados, resultando em uma dispersão transparente. Vale ressaltar que após as NP de ZnO serem modificadas e dispersas em água, o pH resultante é de 11, ou seja, a rota utilizada para a modificação de superfície nesse trabalho resultou em NP de ZnO estáveis a pH alcalino. No entanto, conforme há a diminuição do pH, há aumento do potencial zeta, até que atinja valores próximos ao zero, devido ao aumento das forças de atração, assim, próximo do PI a aglomeração das NP tende a aumentar, pois a presença de forças repulsivas dominantes é essencial para a formação de um sistema monodisperso. Após o pH 7.0 o potencial começa a ficar positivo (+10 mV), no entanto para pH próximo ao 6.0 os valores de potenciais voltam a cair, atingindo o segundo PI.

**Figura 10.** Potencial zeta de nanopartículas de ZnO modificadas com GPTMS em função do pH e pontos isoelétricos (PI).

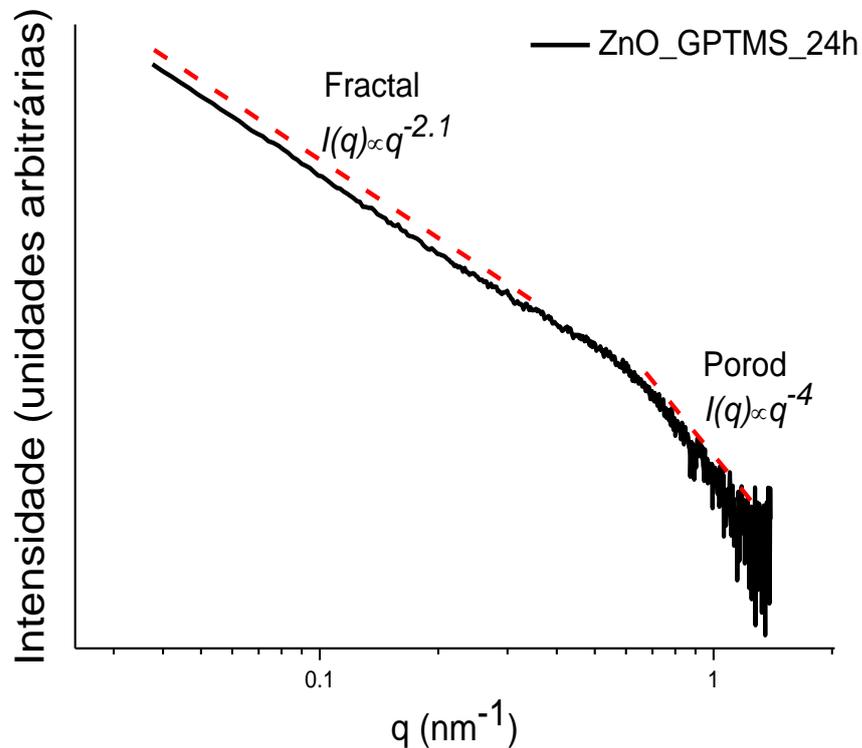


Para visualização da formação de agregados recorreremos novamente à técnica de SAXS. A amostra ZnO\_GPTMS\_24h foi utilizada para esse estudo, que após ser dispersa em água resultou em pH 11, sendo que este foi corrigido com ácido acético até pH 7.0. A figura 11 mostra um plot log-log da intensidade de espalhamento versus o vetor de espalhamento  $q$  da curva de SAXS de NP de ZnO modificadas com GPTMS e dispersas em água a pH 7.0. Nota-se que a curva tem característica de sistema agregado de partículas, diferente de quando estava a pH 11 em que possuía curva característica de sistema monodisperso (ver figura 7).

Em valores de  $q$  pequeno houve o desaparecimento do patamar correspondente à região de Guinier, sendo possível observar nessa região um decaimento linear  $I(q) \propto q^{-\alpha}$ , em que o valor de  $\alpha$  foi de 2.1, o que evidencia a formação de agregado fractal, que possui dimensões fractais características de estruturas formadas pela agregação cluster-cluster limitada pela reação (MANAIA, 2016; CAETANO et al., 2011). Em altos valores de  $q$ , é possível observar um segundo regime linear, que obedece a lei de Porod, possuindo um

decaimento linear de -4, o que indica a formação de NP com superfície lisa e bem definida (CAETANO et al., 2011).

**Figura 11.** Curva de SAXS de Nanopartículas de ZnO, modificadas com GPTMS e dispersas em água, com pH 7.0.



#### 5.1.4 Espectroscopia na região do UV-vis

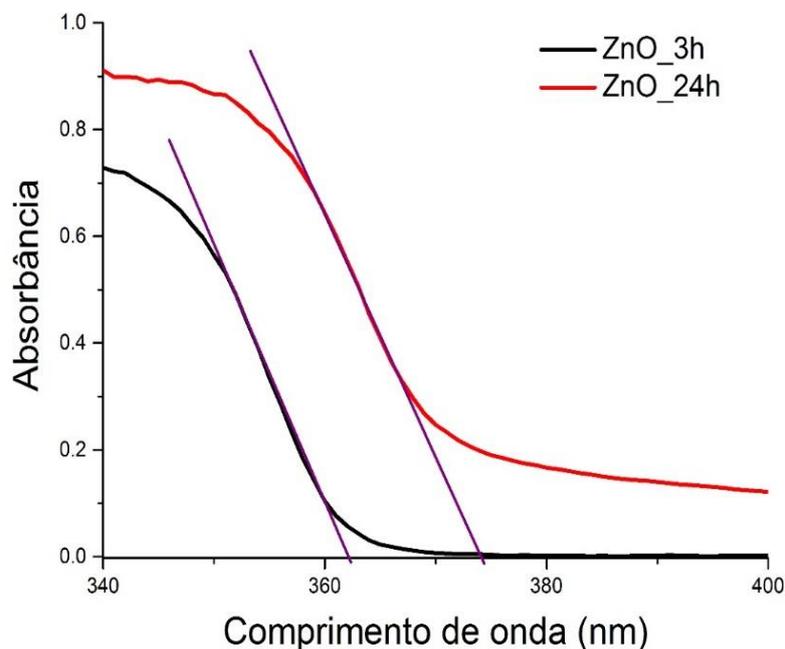
As NP de ZnO sintetizadas neste trabalho apresentam características luminescentes dependente do tamanho, podendo ser chamadas de pontos quânticos (PQ). Os PQ de ZnO são capazes de absorver a radiação na região do UV-vis, e dessa forma, com a técnica de espectroscopia na região do UV-vis é possível determinar o comprimento de onda relacionado ao pico excitônico do ZnO para posteriormente calcular o tamanho das NP.

A figura 12 mostra os espectros de absorção UV-vis da suspensão coloidal de nanopartículas de ZnO ( $r = [\text{OH}]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ ), sintetizadas à 50°C em diferentes tempos de reação de 3 e 24 (ZnO\_3h e ZnO\_24h). Foi possível através do espectro de absorção da suspensão coloidal identificar o pico excitônico bem definido do ZnO, sendo que houve deslocamento do comprimento de onda próximo a 370 nm para ZnO\_24h, evidenciando aumento do tamanho da partícula (Briois et al., 2006) dependente do tempo de reação. O

tamanho das NP de ZnO foi determinado a partir do espectro de absorção UV-vis utilizando o modelo de massa de massa efetiva proposto por Brus (1983) através da determinação do  $\lambda_c$  de 364 nm e 374 nm para ZnO\_3h e ZnO\_24h, respectivamente. Assim, aplicando esses valores na equação 1, o raio das NP formadas que foi de 2,9 nm e 5,3 nm para ZnO\_3h e ZnO\_24h, respectivamente.

Como notado, o tamanho da amostra ZnO\_3h calculado através do espectro UV é menor do que o calculado por SAXS, isso porque o raio calculado através da fórmula de Brus considera apenas o raio individual do ponto quântico de ZnO, enquanto o Rg obtido por Guinier pode corresponder ao raio das NP individuais ou dos agregados.

**Figura 12.** Espectro de absorção UV-vis da suspensão coloidal de nanopartículas de ZnO ( $r = [\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}] = 1.0$ ), sintetizadas à 50°C em diferentes tempos de reação.

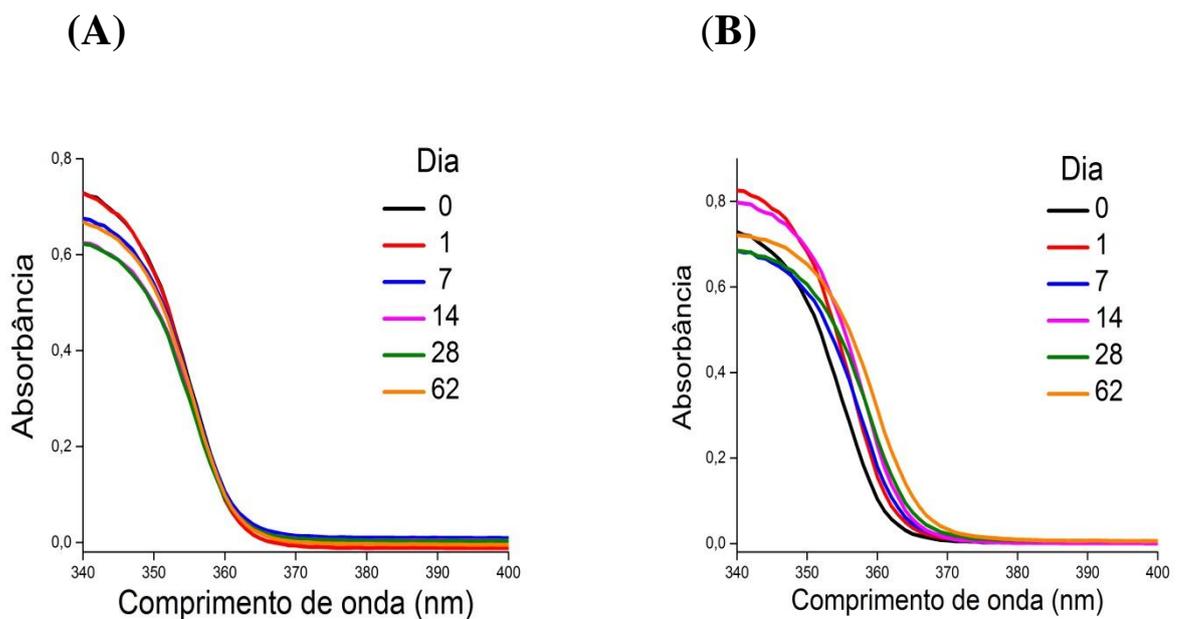


### Estabilidade das nanopartículas de ZnO

Através da espectroscopia na região no UV-vis, também foi possível avaliar a estabilidade das NP a partir do deslocamento do comprimento de onda. Para esse fim, foram usados dois tipos de amostras: suspensão de NP em etanol, armazenada à temperatura de -5°C e à temperatura ambiente e dispersões de NP de ZnO em água modificadas com GPTMS armazenadas a temperatura de 5°C e à temperatura ambiente.

A figura 13 mostra os espectros de absorção UV-vis de suspensões coloidais de NP de ZnO sintetizadas em 3 horas (ZnO\_3h) e armazenadas à  $-5^{\circ}\text{C}$  (A) e a temperatura ambiente (B) por 62 dias. A maior estabilidade foi encontrada para as NP armazenadas a  $-5^{\circ}\text{C}$ , uma vez que não houve deslocamento do comprimento de onda, no entanto, quando armazenadas em temperatura ambiente (B), há deslocamentos para maiores comprimentos de onda, evidenciando menor estabilidade em relação à amostra armazenada a  $-5^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 13.** Espectros de absorção no UV-Vis das suspensões coloidais de nanopartículas de ZnO em etanol sintetizadas com razão de hidrólise  $[\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}]=1.0$ , em ultrassom à  $50^{\circ}\text{C}$  por 3 horas (ZnO\_3h) e armazenadas a  $-5^{\circ}\text{C}$  (A) e a temperatura ambiente (B).

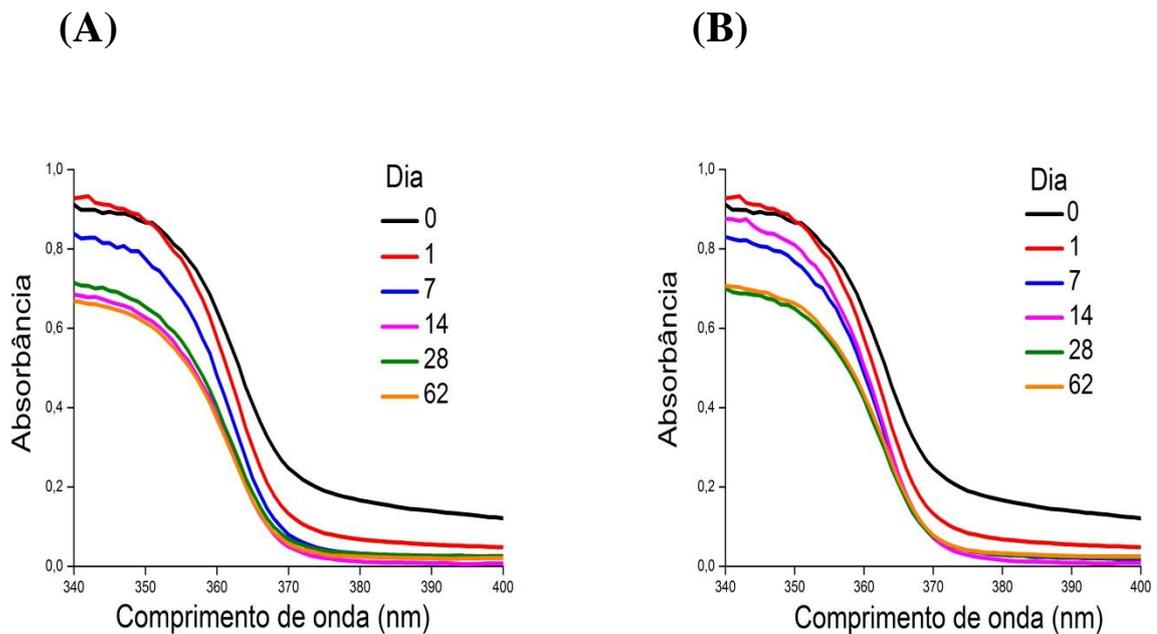


A figura 14 mostra os espectros de absorção no UV-vis para as suspensões coloidais de NP de ZnO sintetizadas em 24 horas (ZnO\_24h) e armazenadas à  $-5^{\circ}\text{C}$  (A) e temperatura ambiente (B). Os resultados mostraram que a amostra sintetizada em 24 horas teve um padrão diferente da sintetizada em 3 horas. Nota-se que para maior tempo de reação, 14 dias foram necessários para o comprimento de onda manter-se estável quando armazenadas a  $-5^{\circ}\text{C}$  (A) e após esse período, não houve deslocamentos do comprimento de onda. Além disso, conforme aumentou o tempo de armazenamento, deslocamentos para menores comprimentos de onda foram encontrados, evidenciando diminuição do tamanho das NP de ZnO formadas.

No caso das nanopartículas armazenadas em temperatura ambiente (B) também foram necessários 14 dias para o espectro de absorção UV-vis manter-se em um único comprimento de onda, o qual antes desse período deslocou-se para menores comprimentos de onda, como

no caso da armazenada a  $-5^{\circ}\text{C}$ . Esse processo de deslocamento para menores comprimentos de onda pode ocorrer, provavelmente porque em 24 horas de reação, a suspensão coloidal de NP de ZnO apresentou um aspecto levemente turvo, e após um certo período de armazenamento, tornou-se mais translúcida.

**Figura 14.** Espectros de absorção UV-Vis das suspensões coloidais de nanopartículas de ZnO em etanol sintetizadas com razão de hidrólise  $[\text{OH}]/[\text{Zn}^{2+}]=1.0$ , em ultrassom à  $50^{\circ}\text{C}$  por 3 horas, seguidas de 21 horas em banho à  $50^{\circ}\text{C}$  com agitação magnética (ZnO\_24h) e armazenadas a  $-5^{\circ}\text{C}$  (A) e a temperatura ambiente (B).

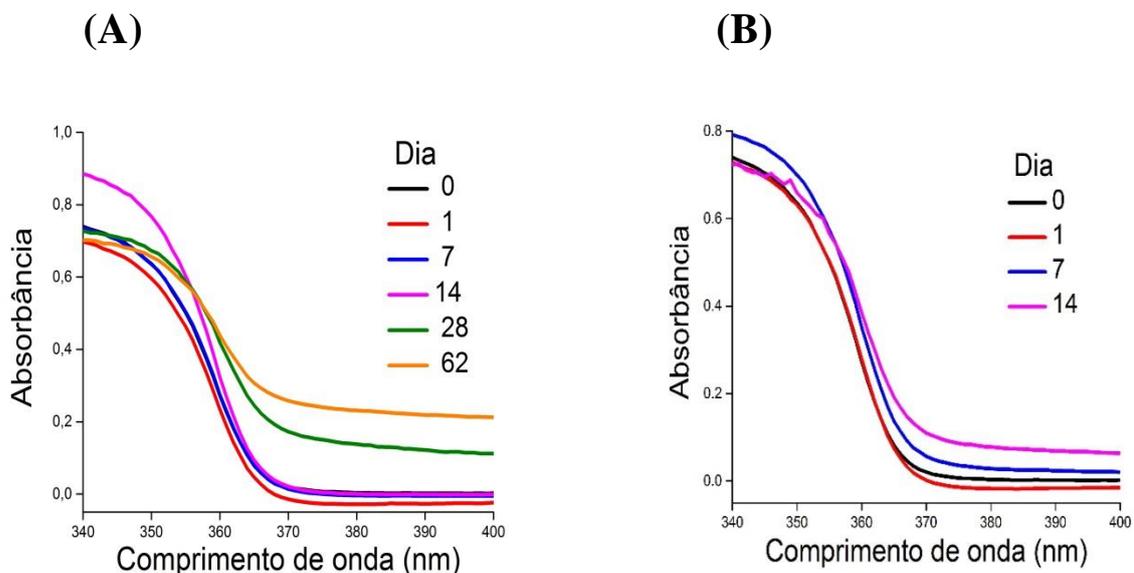


Ainda em relação à técnica de espectroscopia na região do UV-vis, realizamos um estudo acerca da estabilidade de NP de ZnO modificadas com GPTMS e dispersas em água, com concentração de 5 mg/mL. O período de acompanhamento dos espectros foi estipulado em 62 dias para as dispersões de NP em água armazenadas a  $5^{\circ}\text{C}$ . No caso do armazenamento a temperatura ambiente, acompanhamos a evolução do comprimento de onda até o período que encontramos o pico excitônico do ZnO. Isso porque para as NP de ZnO dispersas em água e armazenadas em temperatura ambiente o pico excitônico do ZnO não foi encontrado por 62 dias.

A figura 15 mostra o estudo de estabilidade da amostra ZnO\_GPTMS\_3h. Foi possível observar que após 28 dias de armazenamento a  $5^{\circ}\text{C}$  (A), os espectros de absorção UV-vis para as nanopartículas de ZnO sintetizadas em 3 horas e modificadas com GPTMS deslocaram-se

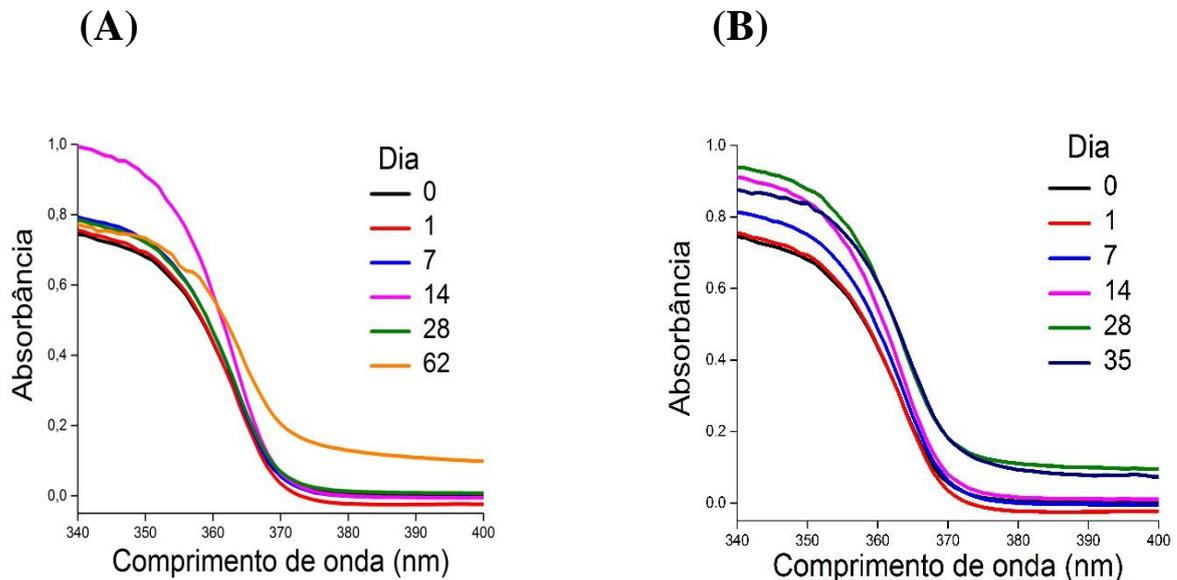
para maiores comprimentos de onda, no entanto o deslocamento não foi muito significativo, além disso, maiores tempos de armazenamento diminuíram a absorbância. No caso do armazenamento em temperatura ambiente (**B**), o pico excitônico do ZnO foi encontrado até 14 dias e após esse período, a dispersão de nanopartículas as quais antes eram transparentes, deram origem a precipitados brancos, indicando que as partículas não possuem mais escala nanométrica, e não foi possível observar o pico excitônico do ZnO, além disso, houve perda da característica luminescente das nanopartículas.

**Figura 15.** Espectros de absorção UV-Vis de dispersões de nanopartículas de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas com razão de hidrólise  $[\text{OH}]/[\text{Zn}^{2+}]=1.0$ , em ultrassom à 50°C por 3 horas (ZnO\_GPTMS\_3h) e armazenadas à 5°C (**A**) e em temperatura ambiente (**B**).



A figura 16 mostra os ensaios de estabilidade da amostra ZnO\_GPTMS\_24h. Para o armazenamento a 5°C (**A**), o pico excitônico do ZnO foi observado durante 62 dias para as dispersões de nanopartículas de ZnO sintetizadas em 24 horas e modificadas com GPTMS. Durante 28 dias, não houveram deslocamentos do comprimento de onda, mostrando que, nesse período de tempo, as NP de ZnO permaneceram estáveis, no entanto, ao final de 62 dias, há pequena diminuição da absorbância seguido pela presença de ruídos e pequeno deslocamento para maiores comprimentos de onda. No caso do armazenamento em temperatura ambiente (**B**), foi possível observar o pico excitônico do ZnO em até 35 dias de estocagem e após esse período, um precipitado branco foi formado seguido pela perda da luminescência das NP de ZnO.

**Figura 16.** Espectros de absorção UV-Vis de dispersões de nanopartículas de ZnO em água, modificadas com GPTMS, sintetizadas com razão de hidrólise  $[\text{OH}]/[\text{Zn}^{2+}]=1.0$ , em ultrassom à 50°C por 3 horas seguidas de 21 horas em agitador magnético (ZnO\_GPTMS\_24h) e armazenadas a 5°C (A) e em temperatura ambiente (B).



De acordo com os dados apresentados pela espectroscopia na região do UV-vis, pode-se dizer que o tempo de reação influenciou na estabilidade das nanopartículas de forma diferente para as suspensões coloidais e para as NP de ZnO modificadas com GPTMS e dispersas em água.

As NP de ZnO modificadas com GPTMS e armazenadas a 5°C são estáveis por 62 dias, sendo que nos primeiros 14 dias de armazenamento não há deslocamentos no comprimento de onda. O armazenamento em temperatura ambiente resultou em alta estabilidade por 14 dias, sem deslocamento do comprimento de onda, sendo que após esse período, não foi encontrado o pico excitônico do ZnO para a amostra ZnO\_GPTMS\_3h, enquanto ZnO\_GPTMS\_24h o pico foi encontrado até 35 dias.

A temperatura influencia diretamente a estabilidade das nanopartículas modificadas, uma vez que para ZnO\_GPTMS\_3h houve redução do tempo de estabilidade em cerca de quatro vezes quando armazenadas em temperatura ambiente (62 dias a 5°C e 14 dias em temperatura ambiente), enquanto para ZnO\_GPTMS\_24h o tempo em que manteve-se estável

mesmo em temperatura ambiente foi cerca de duas vezes menor que para o armazenamento a 5°C (62 dias a 5°C e 35 a temperatura ambiente).

Vale ressaltar que para as NP de ZnO modificadas com GPTMS e armazenadas em à 5°C e temperatura ambiente, por um período de 14 dias, não houve deslocamentos significativos do comprimento de onda. Esse resultado corrobora com o apresentado por (RISSI, 2016) e pode ser explicado pela capacidade dos modificadores de superfície protegerem as NP, diminuindo sua agregação (LI et al., 2005).

O deslocamento do pico excitônico do ZnO (figura 13-16) permitiu o cálculo do raio das NP em diferentes tempos e condições de armazenamento. Dessa forma, aplicando a *equação 1* foi possível determinar raio das NP para a amostra armazenada em diferentes tempos e temperaturas, conforme mostrado na tabela 3.

Em síntese, pode-se concluir que as NP de ZnO modificadas com GPTMS após serem dispersas em água apresentam excelente estabilidade quando armazenadas em geladeira, podendo ser utilizadas por dois meses sem que ocorra alterações significativas quanto ao tamanho das NP formadas. Além disso, quando armazenada a temperatura ambiente, as NP continuam estáveis por um período mínimo de 14 dias, que se estendeu para 35 de acordo com o aumento do tempo da síntese sol-gel. Esses resultados mostram a importância do armazenamento correto além de fornecer informações sobre quanto tempo pode utilizar as nanopartículas modificadas com GPTMS e dispersas em água na aplicação microbiológica.

**Tabela 3.** Raio das NP armazenadas em diferentes condições

<b>Amostra</b>	<b>Temperatura de armazenamento</b>	<b>Tempo de armazenamento (dias)</b>	<b>Raio (nm)</b>
<b>ZnO_3h</b>	-5°C	0	2,8
		62	2,8
	Ambiente	0	2,8
		62	3,5
<b>ZnO_GPTMS_3h</b>	5°C	0	3,1
		62	4,1
	Ambiente	0	3,1
		14	3,3
<b>ZnO_24h</b>	-5°C	0	5,3
		62	3,5
	Ambiente	0	5,3
		62	3,5
<b>ZnO_GPTMS_24h</b>	5°C	0	4,0
		62	5,3
	Ambiente	0	4,0
		35	4,5

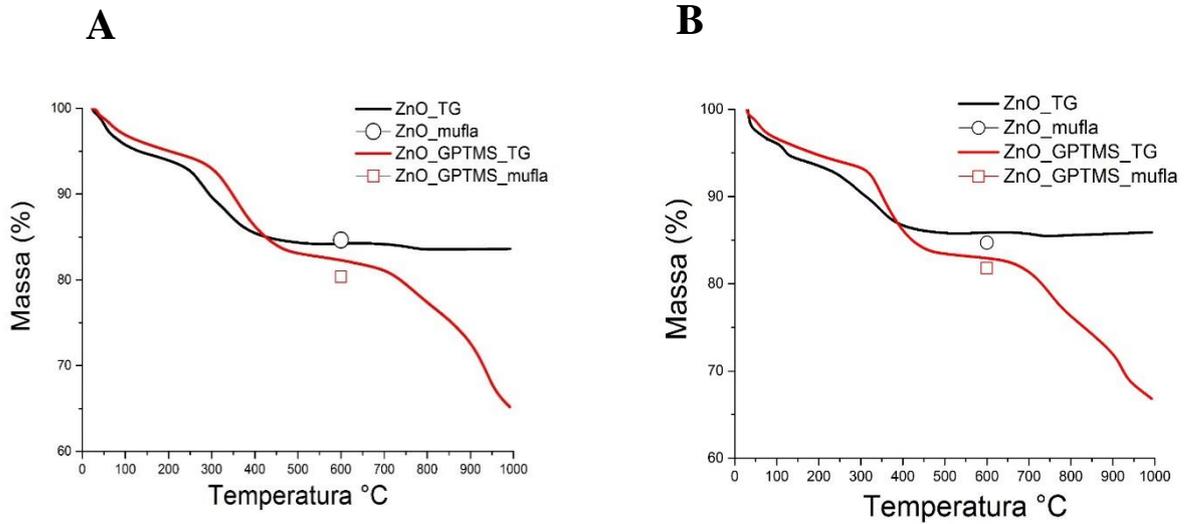
### 5.1.5. Análise Termogravimétrica e tratamento térmico

Conforme observado nas técnicas de espectroscopia na região do ultravioleta-visível e de SAXS, o tempo de reação não acarretou diferenças significativas em relação ao tamanho das NP formadas. Nesse sentido, tornou-se necessário aplicar uma nova estratégia para sintetizar NP de tamanhos maiores e assim correlacionar os diferentes tamanhos obtidos com a atividade antimicrobiana das NP de ZnO. A estratégia selecionada foi aumentar o tamanho da partícula através do tratamento térmico. Para isso, foi de extrema importância selecionar a temperatura ideal para realizar o tratamento térmico. Para essa finalidade, a análise termogravimétrica (TG) foi realizada, possibilitando então verificar o comportamento das NP de ZnO de acordo com o aumento da temperatura.

A figura 17 mostra a análise termogravimétrica e a perda de massa dependente da temperatura de NP de ZnO sem e com a superfície modificada pelo GTPMS. Os dados de TG mostram dois eventos importantes para as NP com e sem GPTMS. O primeiro consiste em uma perda de massa até 100°C, que pode ser oriunda da perda de resíduos de solvente, como etanol e água, que ainda pode estar presente na amostra. O segundo evento consiste na perda a partir de 200°C até 400°C, podendo indicar a decomposição de resíduos de compostos orgânicos (RAOUFI; RAOUFI, 2009), como por exemplo a perda do grupamento acetato. As amostras sem modificador estabilizam sua perda de massa na temperatura de 400°C, enquanto as que contem GPTMS tem um terceiro evento importante, correspondente a perda acentuada de massa a partir de 700°C, que pode ser oriunda da presença do grupo silano do modificador de superfície, o qual pode ser degradado à elevadas temperaturas (LI et al., 2005).

A temperatura selecionada para realizar o tratamento térmico foi 600°C, dessa forma, após submeter as amostras a essa temperatura, foi verificada a perda de massa. Os resultados estão representados na figura 17 em forma de círculo preto (sem modificador) e quadrado vermelho (modificadas). Assim, pode-se observar que em 600°C houve porcentagem de perda de massa muito semelhante da observada no TG, principalmente para as amostras sem modificador, sendo que houve uma pequena diferença em relação à análise termogravimétrica, principalmente para as amostras contendo GPTMS, no entanto não é considerada muito significativa, por exemplo, para ZnO\_GPTMS\_3h (A) essa diferença foi de 1,69%, dessa forma, a perda de massa das amostras submetidas ao tratamento térmico apresentou grande concordância com os dados apresentados no TG.

**Figura 17.** Análise termogravimétrica (TG) e tratamento térmico na mufla de nanopartículas de ZnO sintetizadas em 3 (A) e 24 (B) horas.



### 5.1.6 Difração de raios X (DRX)

A difração de raios X foi realizada com intuito de identificar a fase do ZnO formada, pois é possível através dessa técnica caracterizar os planos atômicos em um material cristalino. A figura 18 traz os difratogramas de raios X de NP de ZnO. Com intuito de exemplificar, foram selecionadas duas amostras, com e sem modificador de superfície para compara-las com um ZnO comercial, denominado ZnO aldrich, que possui grau de pureza de 99,9, além disso, os picos correspondentes da estrutura wurtzita estão indicados em forma de barras verdes. Pode-se observar que os picos do ZnO\_3h e ZnO\_GPTMS\_3h apresentaram-se de forma alargada em relação ao ZnO aldrich, indicando que os cristalitos presentes são pequenos, resultado este já descrito na literatura e condizente com os apresentados nas técnicas de UV-vis e SAXS.

Os picos mostrados no DRX correspondem a fase hexagonal do ZnO com estrutura de wurtzita, a qual apresenta picos correspondentes aos planos difratores (100), (002), (101), (102), (110), (103) e (112), situados em  $2\theta = 31,80; 34,47; 36,29; 47,60; 56,54; 62,94$  e  $67,96$  e está indexada em JPDS file 36-1451 (SPANHEL; ANDERSON, 1991; JANAKI et al., 2015).

Para o cálculo do tamanho do cristalito foi utilizado o plano (101), no entanto, outros planos foram comparados como (100) (002) e (110). Os difratogramas obtidos são mostrados na figura 19 e o resultado do tamanho dos cristalitos para os quatro planos calculados estão apresentados na tabela 4. Não foram encontrados os mesmos valores de tamanho de cristalito para os quatro planos calculados, correspondentes à estrutura wurtzita, no entanto, o plano (101) foi selecionado, pois representa melhor o ZnO na fase wurtzita por ser a orientação cristalográfica principal para essa fase. Vale ressaltar que quando os picos do DRX não são muito estreitos pode induzir a erros no cálculo do tamanho do cristalito, e por esse motivo, a técnica de WAXS também foi utilizada para o cálculo do tamanho do cristalito.

A figura 19 mostra os difratogramas de raios X das amostras antes e após o tratamento na mufla. De modo geral, pode-se observar que as amostras sem presença de modificador de superfície, representadas na figura 19 A e C, após sofrerem tratamento térmico a 600°C por 5 horas apresentaram estreitamento dos picos. Esse resultado é indicativo de aumento do tamanho da partícula, assim, através da equação de Scherrer (equação II) foi possível verificar o diâmetro do cristalito (D) que para ZnO\_3h foi de 5,27 nm e para ZnO\_3h\_mufla o valor encontrado foi de 33,93 nm. Para ZnO\_24h e ZnO\_24h\_mufla o valor de D foi de 6,79 e 38,25 nm, respectivamente.

Conforme observado na figura 19 B, a amostra ZnO\_GPTMS\_3h\_mufla, apresenta picos mais estreitos em relação ao ZnO\_GPTMS\_3h, o que indica que houve aumento do tamanho do cristalito com aumento da cristalinidade, no entanto esse estreitamento é menos pronunciado em relação a essa amostra sem a presença do modificador (figura 19 A), evidenciando tamanho de cristalito menor para a amostra modificada, de 4,5 nm e 21,20 nm, para ZnO\_GPTMS\_3h e ZnO\_GPTMS\_3h\_mufla, respectivamente.

A amostra ZnO\_GPTMS\_24h não seguiu o mesmo padrão, uma vez que o tratamento térmico não acarretou mudanças significativas no tamanho do cristalito (figura 19-D). Os valores de D encontrados para ZnO\_GPTMS\_24h e ZnO\_GPTMS\_24h\_mufla foram 5,32 e 6,47 nm, respectivamente.

A presença do GPTMS resultou no aparecimento de picos mais intensos do que em relação ao ZnO sem modificador. Além disso, o modificador de superfície parece fornecer certa resistência ao aumento do tamanho da partícula devido ao aumento da temperatura, uma vez que as amostras puras após tratamento térmico apresentaram tamanho do cristalito bem maior em relação às modificadas pelo GPTMS. As amostras tratadas termicamente, exceto

ZnO\_GPTMS\_24h\_mufla, apresentaram novos picos bem definidos, correspondentes aos planos difratores (200) e (201) também da estrutura wurtzita.

**Figura 18.** Difrátogramas de raios X das amostras ZnO\_3h e ZnO\_GPTMS\_3h, comparado com ZnO aldrich.

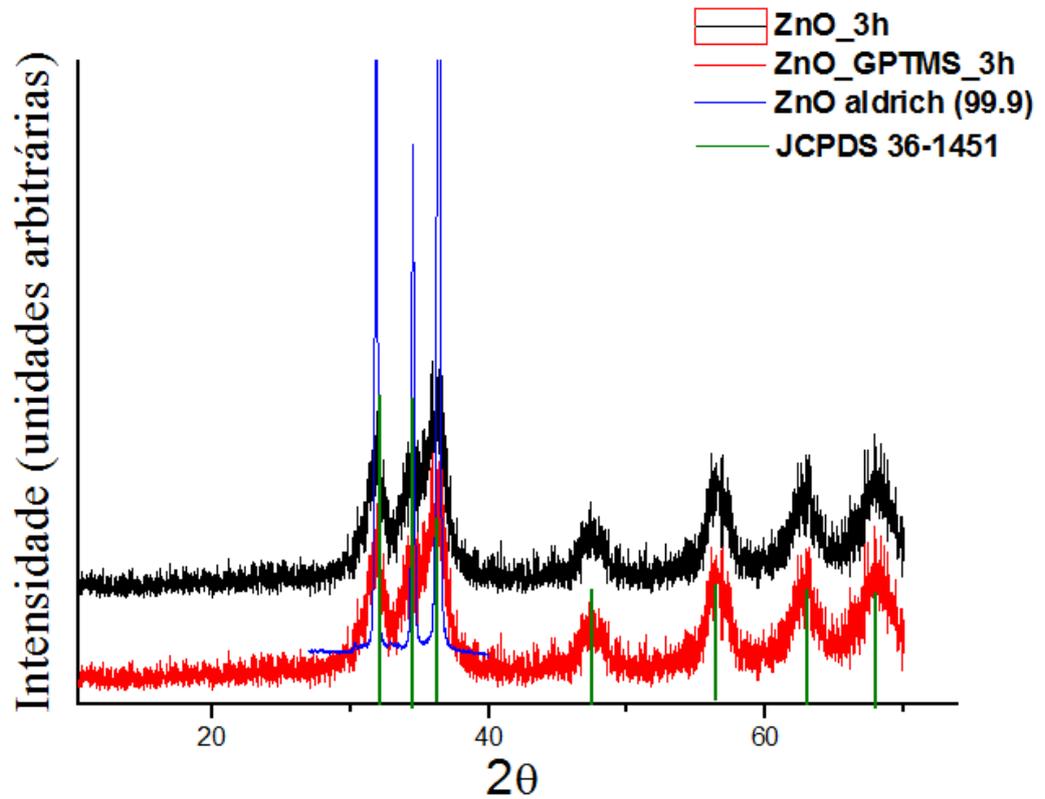
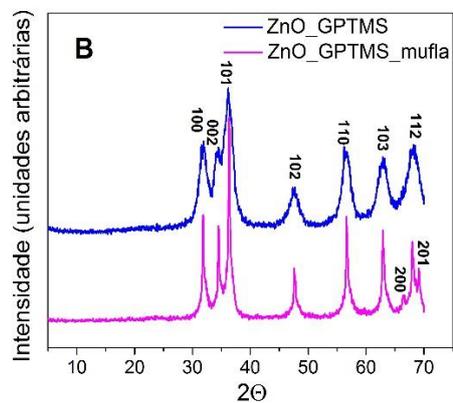
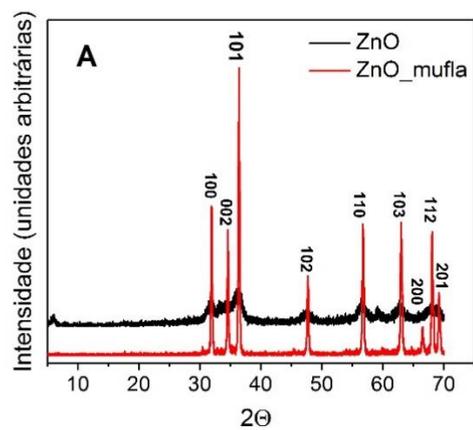
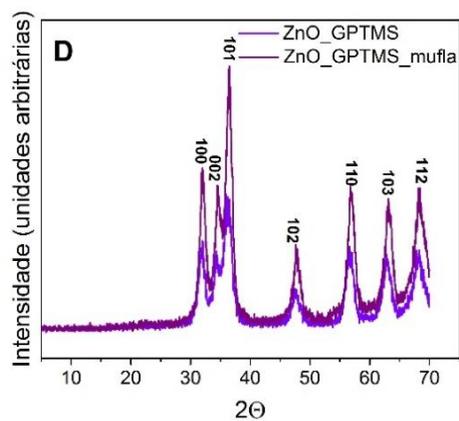
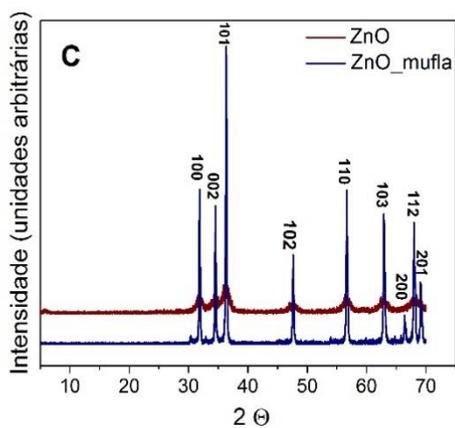


Figura 19. Difratomogramas de raios X

3h



24h



**Tabela 4.** Tamanho médio dos cristalitos (D) obtidos a partir dos difratogramas de raio-X.

<b>Amostras</b>	<b>(100)</b>	<b>(002)</b>	<b>(101)</b>	<b>(110)</b>
<i>ZnO_3h</i>	5,27	5,27	5,27	6,53
<i>ZnO_GPTMS_3h</i>	4,90	6,17	4,50	5,21
<i>ZnO_24h</i>	7,59	3,37	6,79	6,36
<i>ZnO_GPTMS_24h</i>	6,44	6,15	5,32	5,80
<i>ZnO_3h_mufla</i>	33,93	33,93	33,93	27,00
<i>ZnO_GPTMS_3h_mufla</i>	21,07	20,89	21,20	21,33
<i>ZnO_24h_mufla</i>	39,42	38,50	38,25	31,20
<i>ZnO_GPTMS_24h_mufla</i>	4,71	5,99	6,74	6,44

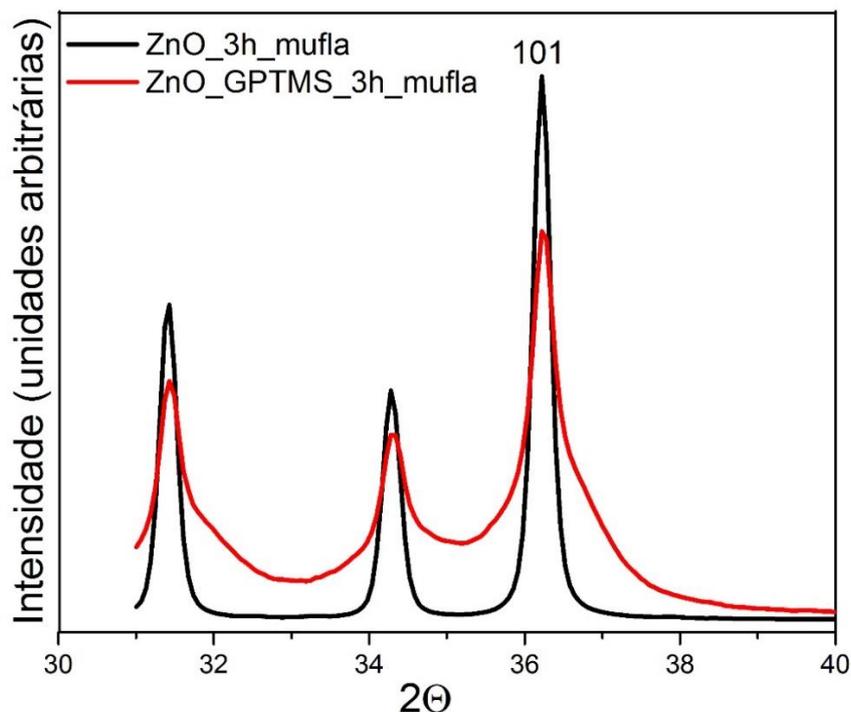
### 5.1.7. Espalhamento de raios X a alto ângulo (WAXS)

Medidas de espalhamento de raios X à alto ângulo (WAXS), permitiram avaliar o tamanho do cristalito (D) através da equação de Scherrer. Entre as vantagens de utilizar o WAXS encontra-se a alta resolução dos picos encontrados devido à radiação de luz

síncronon. A figura 20 corresponde ao espalhamento das amostras sintetizadas em 3 horas com e sem GPTMS e tratadas termicamente. Pode-se observar a presença dos picos correspondentes aos planos difratores (100), (002) e (101), situados em  $2\theta = 31,80$ ;  $34,47$  e  $36,29$ , respectivamente. Os tamanhos dos cristalitos foram calculados utilizando a equação de Scherrer. Para a amostra ZnO\_3h\_mufla e ZnO\_GPTMS\_3h\_mufla os valores de D foram de 30,15 nm e 16 nm, respectivamente, mostrando que o tamanho dos cristalitos encontrados por WAXS são na mesma ordem de grandeza dos encontrados por DRX.

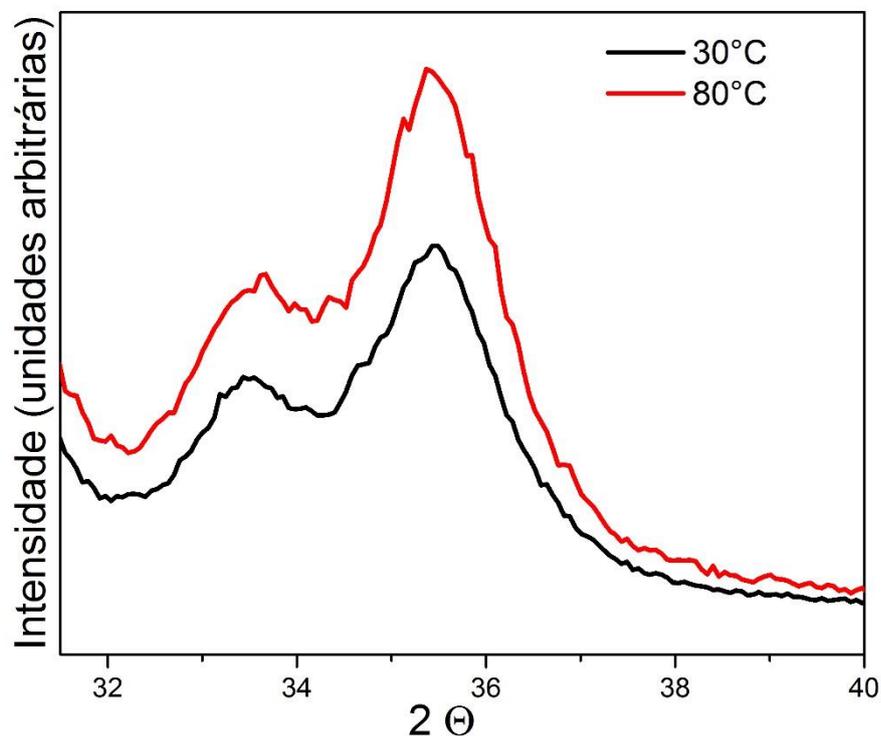
Esses resultados mostram, mais uma vez, que as nanopartículas de ZnO não modificadas e modificadas com GPTMS, quando submetidas ao tratamento térmico apresentam diferentes taxas de crescimento de partículas. Provavelmente o GPTMS protege a superfície da partícula, diminuindo assim, o crescimento da nanopartícula, resultado esse condizente com os encontrados nas técnicas de DRX.

**Figura 20.** Espalhamento de raios X a alto ângulo



A figura 21 mostra a evolução dos picos de ZnO\_GPTMS\_3h, quando submetido ao aumento de temperatura de 30° para 80°. Pode-se observar um aumento da intensidade com o aumento da temperatura, no entanto, em relação ao estreitamento dos picos, não houve mudanças visuais significativas evidenciando que até a temperatura de 80°C não há aumento da partícula. Dessa forma, foi aplicado a equação de Scherrer para o espalhamento da amostra ZnO\_GPTMS\_3h a 30°C e 80°C e o tamanho do cristalito encontrado para as duas temperaturas foi de 4,3 nm, o que sugere alta estabilidade do pó modificado por GPTMS mesmo quando submetido à elevada temperatura.

**Figura 21.** Evolução do espalhamento de raios X a alto ângulo de acordo com o aumento da temperatura.



#### 5.1.6. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A figura 22 corresponde às micrografias de NP de ZnO sintetizadas em 3 horas de reação com e sem superfície modificada. Os resultados mostram que as NP apresentam morfologia esférica com ou sem a presença do GPTMS, no entanto, com a ausência do GPTMS, as partículas encontram-se mais aglomeradas. A contagem do tamanho de 200 partículas foi efetuada para realizar a distribuição de tamanho. Para a amostra

ZnO\_GPTMS\_3h (B) a maior parte das nanopartículas encontram-se no tamanho de 5 nm, enquanto para a amostra ZnO\_3h (A) a maior parte das nanopartículas (mais de 75%) encontram-se na ordem de 4 a 5 nm, sendo que a contagem predominante está na ordem de 4 nm.

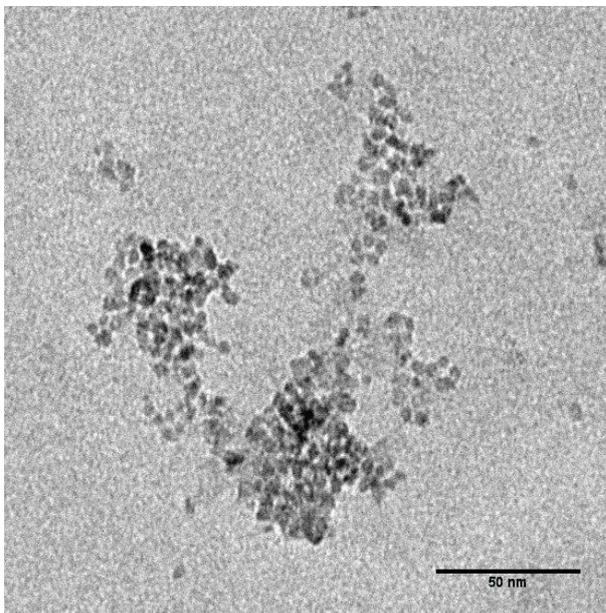
Provavelmente, essa diferença do perfil de distribuição para a amostra sem modificador está no fato de encontrar-se muito aglomerada, dificultando a contagem. No entanto, segundo a técnica de SAXS, o tamanho da amostra ZnO\_3h, encontra-se na ordem de 4,1 nm, ou seja, os dados obtidos por microscopia são concordantes com os obtidos por SAXS.

A microscopia e o SAXS são duas técnicas que podem ser comparadas uma vez que na microscopia uma pequena parte da amostra é ampliada e investigada, enquanto com a técnica de espalhamento, o volume total da amostra iluminada é investigado e como consequência, os valores médios de tamanho dos objetos sob todas as orientações podem ser obtidos, dessa forma, essas técnicas são essenciais e complementares.

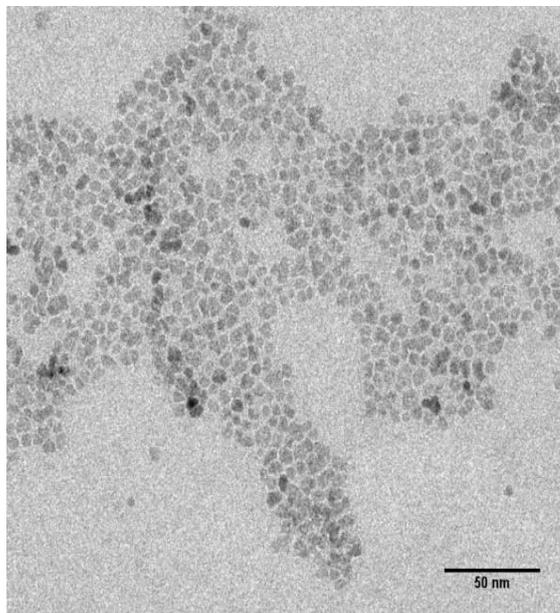
A estrutura das nanopartículas de ZnO também foi estudada através da microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução. A figura 23 representa as micrografias das amostras ZnO\_3h (A) e ZnO\_GPTMS\_3h (B), sendo possível observar partículas com morfologia esféricas de tamanho 4,1 e 5,4 nm para as amostras sem e com modificador, respectivamente. As amostras são cristalinas e há como notar o espaçamento interplanar de 0,26 nm correspondente ao plano (002) da estrutura de wurtizita. A tabela 5 mostra as diferentes técnicas utilizadas para avaliar o tamanho das NP produzidas, mostrando que tiveram grande concordância entre si.

**Figura 22.** MET das amostras sem modificador ZnO\_3h (A) e modificadas ZnO\_GPTMS\_3h (B), com histograma mostrando o tamanho médio das nanopartículas.

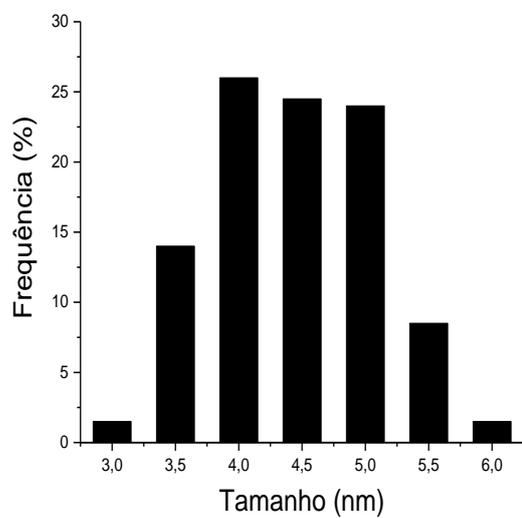
**(A)**



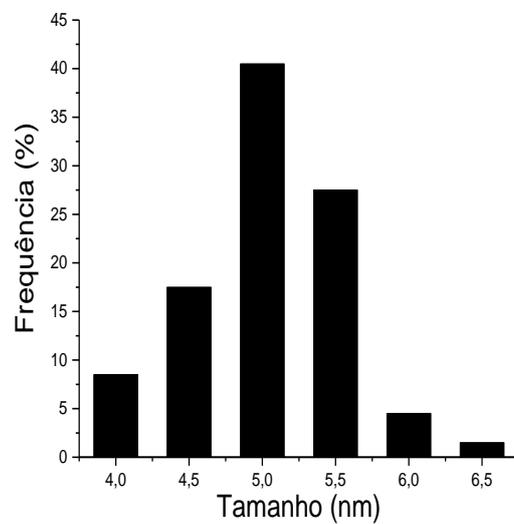
**(B)**



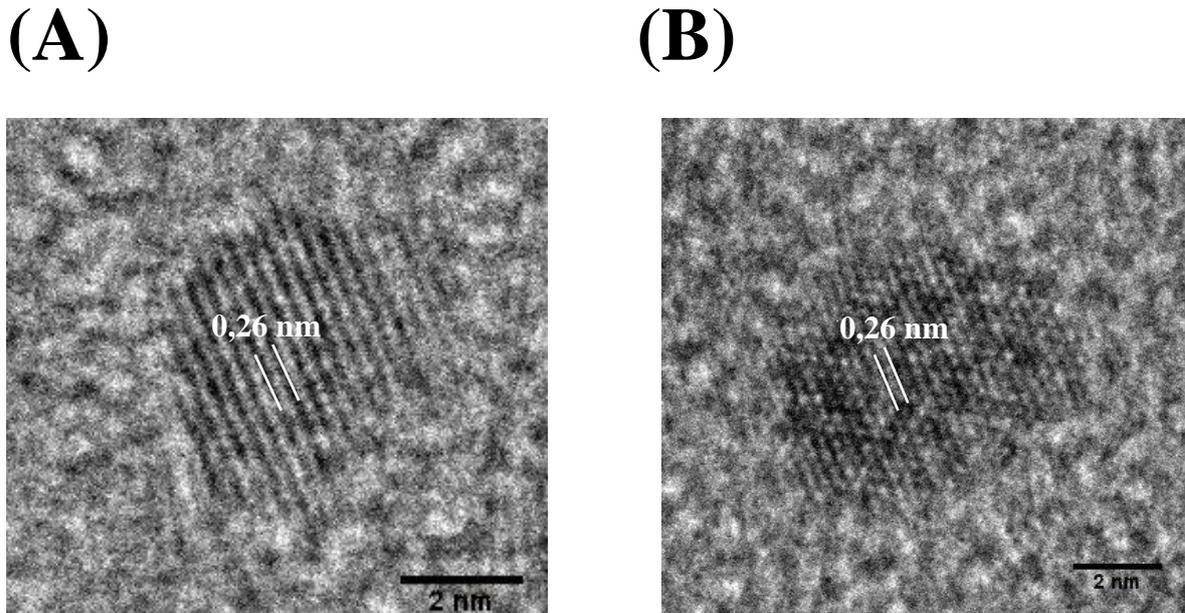
**(A1)**



**(B1)**



**Figura 23.** Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução da amostra ZnO\_3h (A) e ZnO\_GPTMS\_3h (B).



**Tabela 5.** Comparação dos tamanhos das NP de ZnO obtidos por diferentes técnicas.

Amostra	UV-Vis	SAXS	DRX	MET
ZnO_3h	2,9	4,1	5,3	4,0
ZnO_GPTMS_3h	3,1	5,2	4,5	5,0

### 5.1.8. Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS)

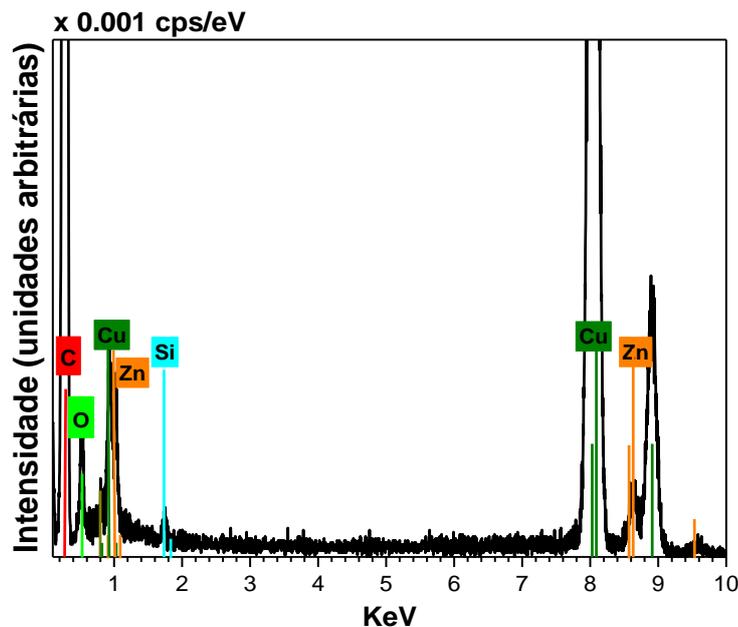
A técnica de EDS fornece uma análise elementar, pois uma vez que o feixe de elétrons é incidido, os elétrons e íons mais externos mudam de nível energético, no entanto ao retornarem, há a liberação de energia que poderá ser mensurada através do detector. Os elétrons de cada átomo possuem energias distintas, possibilitando dessa forma determinar quais são os elementos químicos presentes na amostra.

A figura 24 representa os dados de EDS obtidos concomitantemente com a MET da amostra ZnO\_GPTMS\_3h. Os resultados apresentaram concordância com os reportados por

Duan e colaboradores, (2006), que encontraram picos correspondentes ao carbono, oxigênio e zinco. Em contrapartida, em nossa amostra também foram encontrados picos correspondentes ao silício e cobre.

A presença de picos correspondentes ao cobre ocorre, pois, a grade onde a amostra é gotejada é constituída de cobre. A presença de silício e carbono é indicativa da modificação de superfície, já que são elementos constituintes da molécula de GPTMS.

**Figura 24.** Espectroscopia de raios X por dispersão de energia de nanopartícula de ZnO, modificada com GPTMS.



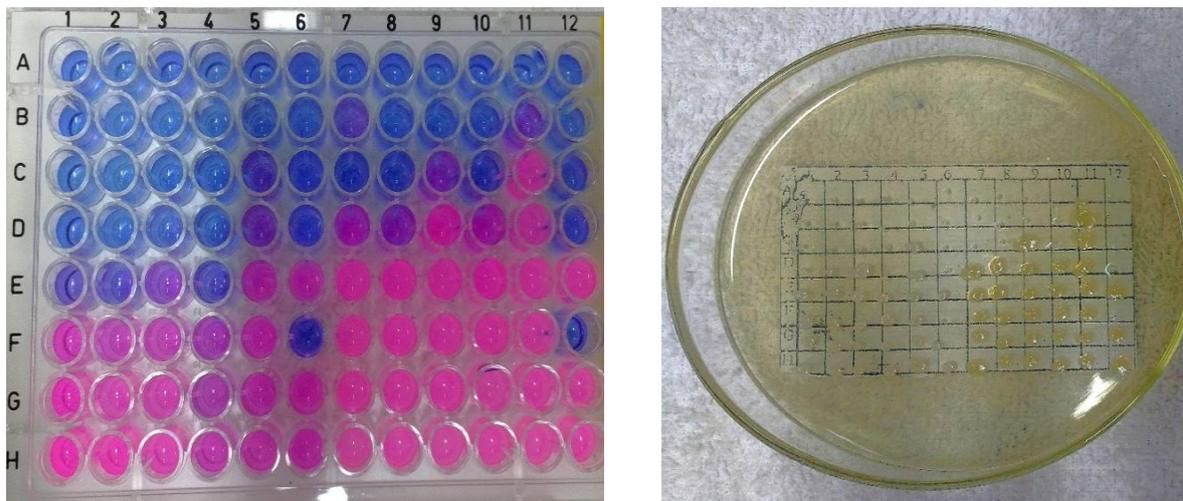
## 5.2. Avaliação do potencial antimicrobiano

### 5.2.1 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida e Fungicida mínima

Para o estudo da atividade antimicrobiana das NP de ZnO, duas metodologias foram realizadas: a concentração inibitória mínima (CIM) que corresponde à concentração necessária para matar 99% dos microrganismos e a concentração bactericida mínima (CBM) que fornece dados sobre o tipo de atividade da nanopartícula contra as cepas, por exemplo: bactericida ou bacteriostática (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2016).

A figura 25 mostra um exemplo de resultados de CIM (esquada) e CBM (direita). Para os testes de CIM, a coloração do poço azul e rosa representam a ausência e a presença de células viáveis, respectivamente. Dessa forma, através de diluições seriadas foi possível avaliar para cada amostra os valores de CIM. Para a análise de CBM, onde há crescimento de colônia (representados pelos poços nos quais não houve células viáveis) a atividade é descrita como bacteriostática, enquanto onde não há crescimento de colônias, bactericida. É possível observar na figura, colônias de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com coloração branca e amarela, respectivamente.

**Figura 25.** Exemplo de testes de atividade antimicrobiana realizados CIM (esquada) e MBC (direita).



Os testes foram realizados em triplicata. Os valores encontrados, que representam as médias de CIM e CBM de diferentes amostras de NP de ZnO para *S aureus* e *E. coli*, estão apresentados nas tabelas 6 e 7, respectivamente. Para os testes de atividade antibacteriana, alguns parâmetros foram levados em consideração. O primeiro deles foi a influência do pH das nanopartículas modificadas na atividade, seguido pela influência do tamanho e do modificador de superfície na atividade antibacteriana das NP de ZnO.

**Tabela 6.** CIM e CBM de nanopartículas de ZnO contra *S. aureus*.

Amostra	<i>S.aureus</i>	
	CIM	CBM
<i>ZnO_GPTMS_3h_pH 11</i>	0,0782 mg/mL	bactericida (0,7292mg/mL)
<i>ZnO_GPTMS_3h_pH 8,5</i>	0,0782 mg/mL	bactericida (0,5209mg/mL)
<i>ZnO_GPTMS_3h_pH 7,0</i>	0,1172 mg/mL	bactericida (0,4948mg/mL)
<i>ZnO_GPTMS_24h_pH 11,0</i>	0,0782 mg/mL	bactericida (0,7292mg/mL)
<i>ZnO_GPTMS_24h_pH 8,5</i>	0,0782 mg/mL	bactericida (0,6250mg/mL)
<i>ZnO_GPTMS_24h_pH 7,0</i>	0,0652 mg/mL	bactericida (0,1367mg/mL)
<i>ZnO_3h</i>	0,0782 mg/mL	bactericida (0,1042mg/mL)
<i>ZnO_24h</i>	0,0456 mg/mL	bactericida (0,3125mg/mL)
<i>ZnO_GPTMS_3h_mufla</i>	0,3125 mg/mL	bacteriostático
<i>ZnO_GPTMS_24h_mufla</i>	0,4167 mg/mL	bacteriostático
<i>ZnO_3h_mufla</i>	0,2082 mg/mL	bacteriostático
<i>ZnO_24h_mufla</i>	0,1041 mg/mL	bacteriostático

A avaliação da influência do pH para as NP de ZnO tornou-se importante porque para realizar a modificação de superfície das NP de ZnO, é necessário adicionar GPTMS e mais uma quantidade de LiOH à suspensão coloidal de NP de ZnO, e por esse motivo, após a dispersão em água do pó modificado, o pH é na ordem de 11. Dessa forma, o estudo de pH tornou-se necessário para avaliar quais seriam suas influências nos testes de CIM e CBM. Isso foi possível através da correção do pH 11,0 para 8,5 e 7,0 com ácido acético glacial, sendo que conforme o pH foi diminuindo a amostra apresentou aspecto turvo.

O pH mostrou influenciar a atividade antibacteriana dependendo da amostra (3 horas e 24 horas de reação) e da bactéria testada, pois o CIM encontrado para *S. aureus* na amostra ZnO\_GPTMS\_3h\_pH 7,0 foi de 0,1172 mg/mL, enquanto, essa mesma amostra mostrou

valores de CIM menores (0,0782 mg/mL) para pH mais elevados. Nesse caso, podemos sugerir que o pH mais alcalino mostrou maior atividade, mas esse efeito pode estar relacionado apenas ao pH, independente da nanopartícula, no entanto, para ZnO\_GPTMS\_24h\_pH 7,0 o CIM para *S aureus* foi de 0,0652 mg/mL, ou seja, menores concentrações dessa amostra foram necessárias para inibir o crescimento de *S. aureus* em relação às mesmas amostras com pH 11,0 e 8,5, as quais tiveram valores de CIM de 0,0782 mg/mL. Nesse caso, pode-se dizer que as nanopartículas de ZnO com pH mais próximo do neutro obtiveram melhor atividade, inclusive com CIM 1,79 vezes menor que a amostra ZnO\_GPTMS\_3h com pH 7,0.

**Tabela 7.** CIM e CBM de NP de ZnO contra *E.coli*

Amostra	<i>E.coli</i>	
	CIM	CBM
ZnO_GPTMS_3h_pH 11	0,3125mg/mL	bactericida (0,8333 mg/mL)
ZnO_GPTMS_3h_pH 8,5	0,3125 mg/mL	bactericida (1,0420 mg/mL)
ZnO_GPTMS_3h_pH 7,0	0,6250 mg/mL	bactericida (0,6250 mg/mL)
ZnO_GPTMS_24h_pH 11,0	0,3125 mg/mL	bactericida (0,7292 mg/mL)
ZnO_GPTMS_24h_pH 8,5	0,3125 mg/mL	bactericida (0,8333 mg/mL)
ZnO_GPTMS_24h_pH 7,0	0,4167 mg/mL	bactericida (0,4167 mg/mL)
ZnO_3h	0,3125 mg/mL	bactericida (0,3125 mg/mL)
ZnO_24h	0,3125mg/mL	bactericida (0,3125 mg/mL)
ZnO_GPTMS_3h_mufla	>1,25 mg/mL	bacteriostático
ZnO_GPTMS_24h_mufla	1,25 mg/mL	bacteriostático
ZnO_3h_mufla	1,25 mg/mL	bacteriostático
ZnO_24h_mufla	1,25 mg/mL	bacteriostático

Para *E. coli*, tanto a amostra sintetizada em maior e em menor tempo de reação, o pH 7,0 apresentou valores de CIM mais elevados. No caso de ZnO\_GPTMS\_3h\_pH 7,0, o CIM encontrado foi de 0,6250 mg/mL, enquanto para as amostras de pH mais elevados foi de 0,3125 mg/mL, o que mostra que a diminuição do pH, aumentou em cerca de duas vezes a CIM. Entretanto, vale ressaltar que esse efeito é resultado apenas do pH elevado, uma vez que mudanças para pH alcalino pode ser estressante para a bactéria (PADAM, et al., 2005).

Embora a diminuição do pH tenha por vezes acarretado aumento da CIM, os testes de CBM mostraram que menores concentrações das NP modificadas em pH 7,0 foram necessárias para obter a atividade bactericida de *S. aureus* e *E.coli*, pois menores valores de CBM foram encontrados.

O estudo do pH foi realizado apenas para as amostras modificadas pois a dispersão das NP de ZnO puras em água apresentaram valores de pH próximos ao neutro, não tornando necessário a avaliação dos diferentes pH em relação as técnicas de CIM e CBM. Além disso, deve-se ressaltar que o foco do trabalho foi o efeito do tamanho das NP de ZnO em sua atividade antimicrobiana.

Uma explicação plausível para a diferença da atividade antibacteriana com a alteração do pH deve-se ao fato de que a mudança do pH do meio em que a nanopartícula é suspensa pode resultar em diferenças na dissolução das NP em íons e também alterar a superfície da nanopartícula, que por sua vez, altera a forma com que as NP ligam-se aos constituintes celulares, como proteínas, afetando assim os mecanismos de internalização das NP de ZnO (GUO, et al., 2009).

Outro aspecto considerado foi a influência do tempo de síntese das nanopartículas em relação à sua atividade antibacteriana, pois esse parâmetro poder alterar o tamanho das NP formadas. Tanto para as amostras com a ausência ou presença do modificador, o maior tempo de síntese resultou em melhor atividade em *S.aureus*. Já para *E.coli*, em relação as amostras sem modificador sintetizada em 3 e 24 horas o valor de CIM foi o mesmo, no entanto, com o modificador foi observado melhor atividade em ZnO\_GPTMS\_24h do que ZnO\_GPTMS\_3h.

Em relação ao uso do modificador de superfície, foi possível observar que o uso do GPTMS diminuiu a atividade antibacteriana. Para *S.aureus* os valores de CIM da amostra ZnO\_3h e ZnO\_GPTMS\_3h\_pH\_7.0 foram de 0,0782 e 0,1172 mg/mL. Vale ressaltar que também foi observado aumento do valor de CBM com o uso do modificador para as mesmas amostras citadas. No caso de *E.coli* o CIM e o CBM aumentaram com o uso do modificador

para a amostra sintetizada em 3 horas e 24 horas. No entanto, para *S.aureus*, a atividade bactericida da amostra ZnO\_24h foi encontrada na concentração de 0,3124 mg/mL enquanto ZnO\_GPTMS\_24h\_pH7.0 mostrou diminuição da concentração bactericida, sendo de 0,1367mg/mL.

Independente da amostra, as nanopartículas de ZnO possuíram melhores atividades em *S.aureus* que em *E.coli*. Essa melhor atividade antibacteriana de NP de ZnO em gram-positivas foi reportada anteriormente por outros pesquisadores como Arakha e colaboradores, (2015) e Shinde e colaboradores, (2014).

Uma explicação sobre essa diferença está na dependência do potencial zeta. Tanto *E.coli* quanto *S.aureus* possuem potenciais negativos, no entanto, bactérias gram-negativas são mais carregadas negativamente devido a camada de lipopolissacarídeos (ARAKHA et al., 2015). Como as nanopartículas são carregadas negativamente, maiores forças de repulsão existem entre as NP de ZnO em gram-negativas do que em gram-positivas, o que pode ser um fator contribuinte para a melhor atividade das NP de ZnO em gram-positiva em relação à gram-negativas.

Outra hipótese sugerida para a melhor atividade de nanopartículas de ZnO em bactérias gram-positivas em relação à gram-negativas deve-se ao fato de que a camada de peptidoglicano de gram-negativas contem componentes, como o LPS capazes de conter o ataque do ZnO para dentro da célula (TAYEL et al., 2011).

O tratamento térmico aumentou o tamanho da partícula acarretando mudanças significativas de perda na atividade antibacteriana. Esses resultados mostram-se satisfatórios, pois conseguem provar que o tamanho da partícula foi um fator importante para a atividade antimicrobiana, sendo possível verificar que as nanopartículas de ZnO tanto puras, quanto modificadas pelo GPTMS com tamanho na ordem de 5 nm, apresentaram atividade antibacteriana em baixas concentrações comparada com as partículas de 30 nm.

Para as amostras de tamanhos maiores, as nanopartículas sem modificador contra *S. aureus* apresentaram em geral, valores menores de CIM do que as modificadas com o GPTMS. Além disso, as amostras modificadas e não modificadas submetidas a tratamento térmico apresentaram menores atividades, o que mostra a influência do tamanho da partícula na atividade antibacteriana.

Além disso, baixas concentrações das nanopartículas com e sem modificador, com tamanho na ordem de 5 nm, possuíram atividade bactericida em *S.aureus*, no entanto para *E. coli* maiores concentrações dessas NP foram necessárias para obter a atividade bactericida. Já as NP de ZnO com tamanhos maiores apresentaram atividade bacteriostática em *S. aureus* e *E.coli*.

A melhor atividade antibacteriana para partículas menores pode ocorrer, pois mais partículas são necessárias para recobrir a bactéria, resultando na geração de grandes concentrações de ERO, que são liberadas pelo ZnO na superfície da célula, o que pode matar a bactéria com maior eficiência (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2016). Ainda, NP de tamanhos menores também podem mais facilmente penetrar na membrana bacteriana devido à sua alta área interfacial, aumentando assim a atividade antibacteriana (SIRELKHATIM et al., 2015).

A cristalinidade da nanopartícula pode ser um fator que influenciou na sua atividade antibacteriana, pois, entre as amostras de maior tamanho, as que tinham GPTMS apresentaram tamanhos menores, no entanto, a atividade antibacteriana foi menor em relação as NP de ZnO sem modificador. Ao observar os difratogramas de raios X nota-se que há um aumento da cristalinidade muito mais pronunciado para as NP sem modificador em relação às NP de ZnO com GPTMS.

Há grande concordância nos valores de CIM para *S.aureus* encontrados por Arakha et al., (2015) com os resultados de CIM encontrados em nossa pesquisa quando comparamos nanopartículas na mesma ordem de tamanho, sintetizadas por Arakha et al., (2015) ( 39 nm) com ZnO\_24h\_mufla (38,25 nm). O CIM encontrado para os dois casos foi na ordem de 0,1041 mg/mL, o que mais uma vez mostra a importância do tamanho da nanopartícula de ZnO em sua atividade antibacteriana.

Foi possível também correlacionar a atividade antibacteriana da amostra ZnO\_GPTMS\_3h\_mufla com os dados apresentados por Sharma e colaboradores, 2016. Os pesquisadores mostraram que NP de ZnO, caracterizadas por DRX, apresentaram tamanho de 20 nm. Dessa forma, comparando a amostra ZnO\_GPTMS\_3h\_mufla (cristalito de 21,20 nm), pode-se correlacionar os valores de CIM obtidos para *S.aureus*, que em ambos os casos foi de 0,31 mg/mL (SHARMA, et al., 2016).

Os resultados apresentados no EDS provaram que há alto grau de pureza nas amostras, ou seja, a atividade antibacteriana das nanopartículas de ZnO realmente é oriúnda do ZnO e

não de quaisquer outras substâncias que poderiam ser encontradas na partícula, resultante de contaminação da síntese. Além disso, conforme mostrado por Farouk et al., 2014, o GPTMS sozinho também não possui qualquer atividade antimicrobiana.

Também foram realizados testes de CIM e CBM para *Candida albicans*, no entanto, diferentemente dos resultados apresentados para bactérias, a atividade anti-Cândida das NP de ZnO mostrou-se baixa, apresentando valores de CIM > de 1,25 mg/mL para todas as amostras testadas.

A menor atividade de NP de ZnO para fungos em relação à bactérias corrobora com os resultados encontrados por Pasquet e colaboradores, 2014 e a maior resistência de fungos em relação às bactérias pode ser atribuída devido a menor sensibilidade de fungos às ERO, sugerindo que o mecanismo de atividade antimicrobiana de NP de ZnO através da liberação de ERO pode ter uma maior contribuição para a atividade antimicrobiana do ZnO em bactérias (YAMAMOTO; LIDA, 2003).

As nanopartículas obtidas sintetizadas na ordem de 5 nm, com e sem GPTMS, quando comparadas com NP de tamanhos maiores de outros trabalhos, apresentaram melhor atividade antibacteriana, mostrando que, a síntese sol-gel é capaz de obter nanopartículas de ZnO suficientemente pequenas e com excelente atividade antibacteriana.

### **5.2.2. Microscopia eletrônica de Varredura**

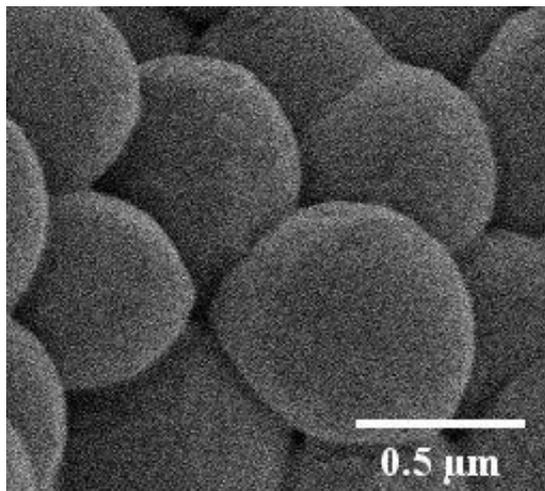
Com a finalidade de verificar as mudanças morfológicas que as NP de ZnO causaram nas bactérias a técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para *S. aureus*. A figura 26 mostra as imagens obtidas antes (A) e após (B) o tratamento da bactéria com as NP de ZnO. A diferença entre as amostras antes do tratamento e após é facilmente observada. O controle de bactérias, sem NP apresentou morfologia esférica, com superfície regular e bom estado celular. Após serem submetidas ao tratamento com NP de ZnO foi possível observar que as células apresentaram buracos na estrutura de contorno (indicado em forma de setas brancas), sendo que a superfície da célula perdeu o aspecto regular com aparecimento de área de morte celular. A presença de estruturas sem forma e tamanho definido indica que, provavelmente houve lise celular, com extravasamento dos conteúdos intracelulares. Esses resultados corroboram com os achados por Guo e colaboradores, 2015 sugerindo que as partículas de ZnO podem inibir o crescimento bacteriano pela penetração destas no envelope celular e desorganização da membrana, sendo que a ruptura celular é relacionada com a

atividade de superfície das NP de ZnO em contato com a bactéria. A ruptura da célula pode ocorrer devido à peroxidação lipídica ou devido à ligação de moléculas na superfície do nanomaterial aos grupos de cabeça dos fosfolípídeos da membrana (HSU et al., 2014).

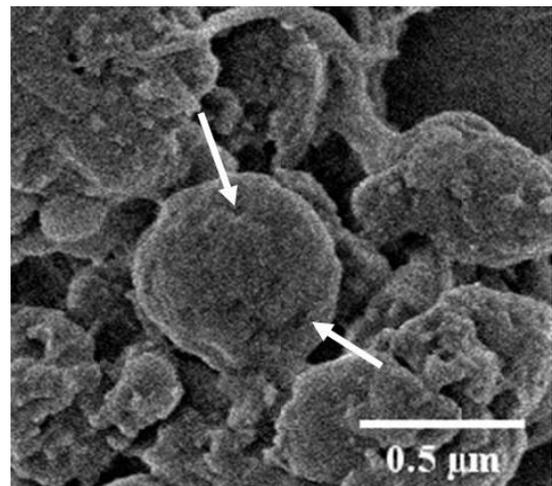
Dessa forma, sugere-se que os mecanismos que envolvem a toxicidade das NP de ZnO resultam em danos à estrutura celular por meio de buracos formados na parede celular, com lise celular e extravasamento dos conteúdos intracelulares.

**Figura 26.** Microscopia eletrônica de varredura. *S.aureus* (A) *S.aureus* com amostra ZnO\_GPTMS\_24h (B) na concentração de 0,0652 mg/mL.

(A)



(B)



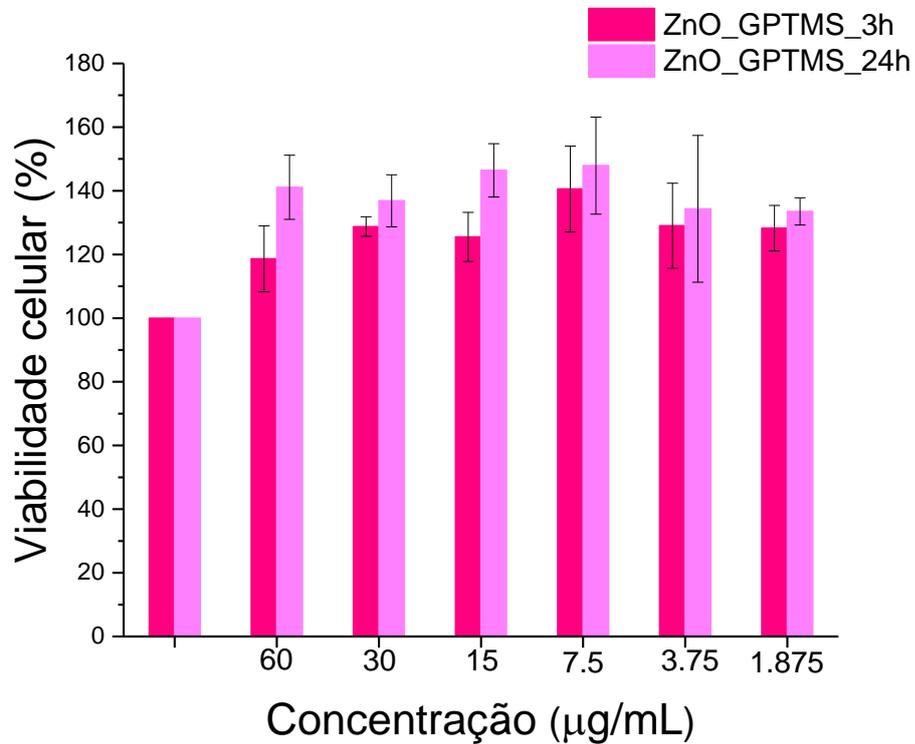
### 5.2.3 Avaliação do potencial citotóxico das nanopartículas de ZnO

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade foi selecionada a linhagem celular HaCat, pois esta é uma linhagem de queratinócitos humanos adultos com alto poder regenerativo, além de possuírem fenótipo próximo ao normal. A escolha desse tipo celular também se deve ao fato de que muitos nanomateriais podem penetrar na pele, dessa forma, pode ser uma porta de entrada para as NP no corpo humano (PATHAKOTI et al., 2013).

A figura 27 mostra o gráfico de viabilidade da linhagem celular de HaCat para as NP de ZnO, sintetizadas em 3 e 24 horas, dispersas em água e modificadas com GPTMS. Conforme observado, não foi possível nas concentrações testadas encontrar nenhuma porcentagem citotóxica. A maior concentração testada, representa valor de CIM encontrado

em *S. aureus* para a amostra ZnO\_GPTMS\_24h, ou seja, pode-se dizer que nessa concentração, a amostra foi tóxica para a bactéria e não para a célula humana.

**Figura 27.** Ensaio de citotoxicidade em célula HaCat. No gráfico, o eixo y corresponde a porcentagem de células vivas, enquanto o eixo x corresponde à concentração de NP de ZnO utilizadas no ensaio de MTT.



## 6. CONCLUSÃO

As nanopartículas de ZnO foram sintetizadas em temperaturas amenas pelo método sol-gel e modificadas com GPTMS, tornando-as hidrofílicas, possibilitando a dispersão em água. Pode-se comprovar a obtenção de NP de ZnO através das técnicas de UV-vis e DRX, sendo que o ZnO se encontra em sua fase hexagonal com estrutura wurtzita. A análise termogravimétrica permitiu a seleção da temperatura de 600°C para tratar termicamente as nanopartículas com e sem GPTMS.

O tamanho das NP de ZnO foi avaliado por diferentes técnicas, as quais apresentaram grande concordância entre si. A espectroscopia na região do UV-vis possibilitou o cálculo do raio das NP pelo modelo matemático proposto por Brus. Com a técnica de SAXS, foi possível obter informações de tamanho, estrutura e crescimento das NP de ZnO. De acordo com os dados apresentados por DRX e de espalhamento de raios X a alto ângulo WAXS foi possível calcular o tamanho dos cristalitos pela fórmula de Scherrer. A microscopia eletrônica de

transmissão (MET) mostrou partículas com morfologias relativamente esféricas e possibilitou avaliar a distribuição de tamanho das nanopartículas de ZnO.

O tempo de reação da síntese sol-gel não acarretou diferenças significativas no tamanho da partícula, no entanto, as nanopartículas tratadas termicamente, com temperatura de 600°C, apresentaram acentuado crescimento em relação às que não foram tratadas termicamente, por exemplo, de acordo com o DRX, ZnO\_GPTMS\_3h apresentou tamanho na ordem de 5,2 nm e ZnO\_3h de 4,5 nm, enquanto ZnO\_GPTMS\_3h\_mufla de 21,20 nm e ZnO\_3h\_mufla de 33,93 nm.

As NP de ZnO são mais eficazes em combater *S.aureus* do que *E.coli*, sendo que a atividade antibacteriana em *S.aureus* está relacionada com danos à estrutura celular por meio de “buracos” formados nas estruturas de contorno, com lise celular e extravasamento de conteúdos celulares.

As NP menores apresentaram melhor atividade antibacteriana do que as NP de ZnO de tamanhos maiores. As NP maiores tiveram efeito bacteriostático, enquanto as menores, bactericida, o que comprova que a excelência na atividade de NP de ZnO em *S. aureus* e *E.coli* foi altamente dependente do tamanho da partícula, inclusive mudando o mecanismo de ação.

As NP de ZnO sintetizadas na ordem de 5 nm e modificadas com GPTMS apresentam alto potencial de aplicação como agente antibacteriano, já que pequenas concentrações tiveram efeito bactericida em *S.aureus*, com danos à sua estrutura celular. Além disso, não foi observado perda da viabilidade celular em linhagem celular de queratinócitos humanos (HaCat), o que evidencia que as NP de ZnO apresentam toxicidade para bactérias e não para a linhagem de células humanas testada. A modificação de superfície de NP de ZnO pelo uso do GPTMS torna sua aplicação biológica muito mais fácil e sua excelente atividade antibacteriana, somada com a toxicidade seletiva em bactérias, aumenta ainda mais o potencial de uso das NP de ZnO como agente antibacteriano.

## REFERÊNCIAS

ABOULAICH, A. et al. Physicochemical properties and cellular toxicity of (poly) aminoalkoxysilanes-functionalized ZnO quantum dots. **Nanotechnology**, v. 23, n. 33, p. 335101, 2012. ISSN 0957-4484.

ADAMS, L. K.; LYON, D.Y.; ALVAREZ, P.JJ. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. **Water Research**, v. 40, n. 19, p. 3527-3532, 2006.

AHMAD, M.; ZHU, J. ZnO based advanced functional nanostructures: synthesis, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 599-614, 2011.

APPLEROT, G.; LELLOUCH, J.; PERKAS, N.; NITZAN, Y.; GEDANKEN, A.; BANIN, E. ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility. **RSC Advances**, v. 2, n. 6, p. 2314-2321, 2012.

ARAKHA, M.; SALEEM, M.; MALLICK, B.; JHA, S. The effects of interfacial potential on antimicrobial propensity of ZnO nanoparticle. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

ASOK, A.; GANDHI, M. N.; KULKARNI, A. R. Enhanced visible photoluminescence in ZnO quantum dots by promotion of oxygen vacancy formation. **Nanoscale**, v. 4, n. 16, p. 4943-4946, 2012.

BADIEE, P.; ALBORZI, A. Susceptibility of clinical Candida species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: A five year study. **Iranian journal of microbiology**, v. 3, n. 4, p. 183, 2011.

BAEK, Y.-W.; AN, Y.-J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) to Escherichia coli, Bacillus subtilis, and Streptococcus aureus. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 8, p. 1603-1608, 2011. ISSN 0048-9697.

BRAR, S. K.; VERMA, M. Measurement of nanoparticles by light-scattering techniques. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 4-17, 2011. ISSN 0165-9936.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M.; FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. **Nano Letters**, v. 6, n. 4, p. 866-870, 2006. ISSN 1530-6984.

BRIVOIS, V. et al. In situ and simultaneous nanostructural and spectroscopic studies of ZnO nanoparticle and Zn-HDS formations from hydrolysis of ethanolic zinc acetate solutions induced by water. **Journal of Sol-gel Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 25-36, 2006. ISSN 0928-0707.

BROUNER, H. "Testing for chemical toxicity using bacteria: An undergraduate laboratory experiment." **Journal of Chemical Education**, v. 68, p. 695-697, 1991.

BRUNNER, T. J. et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 14, p. 4374-4381, 2006. ISSN 0013-936X.

BRUS, L. Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 90, n. 12, p. 2555-2560, 1986. ISSN 0022-3654.

CABEEN, M. T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 601-610, 2005. ISSN 1740-1526.

CAETANO, B. L. **Formação e crescimento de nanopartículas de óxido de zinco via sol-gel**. 2010. 165f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CAETANO, B. L.; SANTILLI, C.V.; MENEAU, F.; BRIOS, V.; PULCINELLI, S.H. In situ and simultaneous UV–vis/SAXS and UV–vis/XAFS time-resolved monitoring of ZnO quantum dots formation and growth. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 11, p. 4404-4412, 2011. ISSN 1932-7447.

ČEPIN, M.; JOVANOVSKEY, V.; PODLOGAR, M.; OREL, Z.C. Amino- and ionic liquid-functionalised nanocrystalline ZnO via silane anchoring—an antimicrobial synergy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, n. 6, p. 1059-1067, 2015.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, tenth edition. CLSI document M07-A10 2015, CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standards**. Approved standard, third Edition. CLSI Document M27-A3. CLSI, 2008, Wayne, Pennsylvania, USA.

DEREWACZ, D. K.; GOODWIN, C.R.; MCNEES, C.R.; MCLEAN, J.A.; BACHMANN, B.O. Antimicrobial drug resistance affects broad changes in metabolomic phenotype in addition to secondary metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 6, p. 2336-2341, 2013. ISSN 0027-8424.

DONG, Y.-D.; BOYD, B. J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **International journal of pharmaceuticals**, v. 417, n. 1, p. 101-111, 2011. ISSN 0378-5173.

DUAN, J.; HUANG, X.; WANG, E. PEG-assisted synthesis of ZnO nanotubes. **Materials Letters**, v. 60, n. 15, p. 1918-1921, 2006. ISSN 0167-577X.

DURAIRAJ, B.; MUTHU, S.; XAVIER, T. Antimicrobial activity of *Aspergillus niger* synthesized titanium dioxide nanoparticles. **Advances in Applied Science Research**, v. 6, n. 1, p. 45-48, 2015.

DUTTA, R. K., SHARMA, P.K.; BHARGAVA, R.; KUMAR, N.; PANDEU, A.C. Differential susceptibility of *Escherichia coli* cells toward transition metal-doped and matrix-embedded ZnO nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 16, p. 5594-5599, 2010. ISSN 1520-6106.

EFERO, A. L. Interband absorption of light in a semiconductor sphere. **Soviet Physics Semiconductors-Ussr**, v. 16, n. 7, p. 772-775, 1982. ISSN 0038-5700.

FAKHROUEIAN, Z. DEHSHIRI, A.M.; KATOZIAN, F.; ESMAEILZADEH, P. . In vitro cytotoxic effects of modified zinc oxide quantum dots on breast cancer cell lines (MCF7), colon cancer cell lines (HT29) and various fungi. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 7, p. 1-14, 2014. ISSN 1388-0764.

FAROUK, A.; MOUSSA, S.; ULBRICHT, M.; SCHOLLMAYER, E.; TEXTOR, T. ZnO-modified hybrid polymers as an antibacterial finish for textiles. **Textile Research Journal**, v. 84, n. 1, p. 40-51, 2014. ISSN 0040-5175.

FIROUZABADI, F. B.; NOORI, M.; EDALATPANAH, Y.; MIRHOSSEINI, M. ZnO nanoparticle suspensions containing citric acid as antimicrobial to control *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in mango juice. **Food Control**, v. 42, p. 310-314, 2014. ISSN 0956-7135.

GHASEMI, Y.; PEYMANI, P.; AFIFI, S. Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting. **Acta Bio Medica Atenei Parmensis**, v. 80, n. 2, p. 156-165, 2009. ISSN 0392-4203.

GUINIER, A.; FOURNET, G. **Small angle scattering of X-rays**. J. Wiley & Sons, New York: Wiley, 1955.

GULIA, S.; KAKKAR, R. ZnO quantum dots for biomedical applications. **Advanced Materials Letters**, v. 4, n. 12, p. 876-887, 2013.

GUO, B.-L. et al. The antibacterial activity of Ta-doped ZnO nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2015. ISSN 1931-7573.

HAIPOUR, M. J. et al. Antibacterial properties of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 499-511, 2012. ISSN 0167-7799.

HE, L.; LIU, Y.; MUSTAPHA, A.; LIN, M.. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. **Microbiological Research**, v. 166, n. 3, p. 207-215, 2011. ISSN 0944-5013.

HEINLAAN, M.; IVASK, A.; DUBOURQUIER, H.V.; KAHRU, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p. 1308-1316, 2008. ISSN 0045-6535.

HEYES, C. D.; KOBITSKI, A. Y.; BREUS, V. V.; NIENHAUS, G. U. Effect of the shell on the blinking statistics of core-shell quantum dots: A single-particle fluorescence study. **Physical Review B**, v. 75, n. 12, p. 125431, 2007.

HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O processo sol-gel: uma visão físico-química. **Química Nova**, p. 171-180, 1995. ISSN 0100-4042.

HIROTA, K., SUGIMOTO, M., KATO, M., TSUKAGOSHI, K., TANIGAWA, T., SUGIMOTO, H. Preparation of zinc oxide ceramics with a sustainable antibacterial activity under dark conditions. **Ceramics International**, v. 36, n. 2, p. 497-506, 2010.

HSU, A. et al. Is the effect of surface modifying molecules on antibacterial activity universal for a given material? **Nanoscale**, v. 6, n. 17, p. 10323-10331, 2014.

IRELAND, J. C.; KLOSTERMANN, P.; RICE, E.W.; CLARK, R.M. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1668-1670, 1993. ISSN 0099-2240.

ISNAENI; KIM, K. H.; NGUYEN, D. L.; LIM, H.; NGA, P. T.; CHO, Y.-H. Shell layer dependence of photoblinking in CdSe/ZnSe/ZnS quantum dots. **Applied Physics Letters**, v. 98, n. 1, p. 012109-3, 2011.

JANA, N. R.; EARHART, C.; YING, J. Y. Synthesis of water-soluble and functionalized nanoparticles by silica coating. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 21, p. 5074-5082, 2007. ISSN 0897-4756.

JANAKI, A. C.; SAILATHA, E.; GUNASEKARAN, S. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 144, p. 17-22, 2015. ISSN 1386-1425.

JESLINE, A.; JOHN, N.P.; NARAYANAN, P.M.; VANI, C.; MURUGAN, S. Antimicrobial activity of zinc and titanium dioxide nanoparticles against biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Applied Nanoscience**, v. 5, n. 2, p. 157-162, 2014. ISSN 2190-5509.

KAIRYTE, K.; KADYS, A.; LUKSIENE, Z. Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 128, p. 78-84, 2013. ISSN 1011-1344.

KOHLBRECHER, J.; BRESSLER, I. **SASfit**. Paul Scherrer Institut, Villigen, Switzerland. 0.94.1 2014.

LEUNG, Y. H. et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination. **Nanotechnology**, v. 23, n. 47, p. 475703, 2012. ISSN 0957-4484.

LI, X.; WANG, G.; LI, X. Surface modification of nano-SiO<sub>2</sub> particles using polyaniline. **Surface and Coatings Technology**, v. 197, n. 1, p. 56-60, 2005. ISSN 0257-8972.

LI, M.; ZHU, L.; LIN, D. Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 5, p. 1977-1983, 2011.

LI, Y.; ZHANG, W.; NIU, J.; CHEN, Y. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles. **ACS Nano**, v. 6, n. 6, p. 5164-5173, 2012. ISSN 1936-0851.

LIN, P.-C.; LIN, S.; WANG, P.C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p. 711-726, 2014. ISSN 0734-9750.

LIPOVSKY, A.; NITZAN, Y.; GEDANKEN, A.; LUBART, R. Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. **Nanotechnology**, v. 22, n. 10, p. 105101, 2011. ISSN 0957-4484.

LIU, Y.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z.Q.; LIN, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1193-1201, 2009. ISSN 1365-2672.

MANAIA, E. B. **Pontos Quânticos à base de óxido de zinco (ZnO) para aplicações em bioimagem de nanocarreadores lipídicos.** 2016. 178f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

MANAIA, E. B. et al. Liquid crystalline formulations containing modified surface TiO<sub>2</sub> nanoparticles obtained by sol-gel process. **Journal of sol-gel Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 251-257, 2012. ISSN 0928-0707.

MANOHARAN, C.; PAVITHRA, G.; DHANAPANDIAN, S.; SHANTHI, B. Properties of spray pyrolysed ZnO: Sn thin films and their antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 141, p. 292-299, 2015. ISSN 1386-1425.

MANZOOR, U.; ZAHRA, F.T.; RAFIQUE, S.; MOIN, M.T.; MUJAHID, M. Effect of synthesis temperature, nucleation time, and postsynthesis heat treatment of ZnO nanoparticles and its sensing properties. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 9, 2015. ISSN 1687-4110.

MONTEJANO, H.A., GERVALDO, M., BERTOLOTTI, S.G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by p-benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, n. 64, p. 117-124, 2005.

MOUSSODIA, R.-O.; BALAN, L.; MERLIN, C.; MUSTIN, C.; SCHNEIDER, R. Biocompatible and stable ZnO quantum dots generated by functionalization with siloxane-core PAMAM dendrons. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 6, p. 1147-1155, 2010.

NEDELIJKOVIC, J. M.; PATEL, R.C.; KAUFMAN, P.; JOYCE-PRUDENC.; O-LEARY, N. Synthesis and optical properties of quantum-sized metal sulfide particles in aqueous solution. **Journal of Chemical Education**, v. 70, n. 4, p. 342, 1993.

PADAM, E.; BIBI, E. ITO, M.; KRULWICH, T.A. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1717, n. 2, p. 67-88, 2005.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials**, 2016.

PATHAKOTI, K.; HWANG, H.M.; XU, H.; AQUILAR, Z.P.; WANG, A. In vitro cytotoxicity of CdSe/ZnS quantum dots with different surface coatings to human keratinocytes HaCaT cells. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 1, p. 163-171, 2013. ISSN 1001-0742.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M., GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 46. n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PASQUET, J.; CHEVALIER, Y.; COUVAL, E.; BOUVIER, D.; BOLZINGER, M.A. Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 479, n. 1, p. 88-95, 2015. ISSN 0378-5173.

PASQUET, et al. Antimicrobial activity of zinc oxide particles on five micro-organisms of the Challenge Tests related to their physicochemical properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 460, n. 1, p. 92-100, 2014. ISSN 0378-5173.

RAGHUPATHI, K. R.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. **Langmuir**, v. 27, n. 7, p. 4020-4028, 2011. ISSN 0743-7463.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013. ISSN 0009-6725.

RANA, S.; RAWAT, J.; SORENSON, M.M.; MISRA, R.D.K. Antimicrobial function of Nd<sup>3+</sup>-doped anatase titania-coated nickel ferrite composite nanoparticles: a biomaterial system. **Acta Biomaterialia**, v. 2, n. 4, p. 421-432, 2006. ISSN 1742-7061.

RAOUFI, D.; RAOUFI, T. The effect of heat treatment on the physical properties of sol-gel derived ZnO thin films. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 11, p. 5812-5817, 2009. ISSN 0169-4332.

RISS, T. L. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**, 2016.

RISSI, N. C. **Micelas poliméricas contendo pontos quânticos a base de óxido de Zinco com superfície modificada para futura aplicação em diagnóstico e vetorização de fármacos**. 2016. 121f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

RISSI, N. C.; HAMMER, P.; CHIAVACCI, L. A. Surface modification of ZnO quantum dots by organosilanes and oleic acid with enhanced luminescence for potential biological application. **Materials Research Express**, v. 4, n. 1, p. 015027, 2017. ISSN 2053-1591.

SARTOR, R. B. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v. 134, n. 2, p. 577-594, 2008. ISSN 0016-5085.

SAWAI, J. et al. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 521-522, 1998. ISSN 0922-338X.

SCHERRER, P. H. et al. The solar oscillations investigation-Michelson Doppler imager. **Solar Physics**, v. 162, n. 1-2, p. 129-188, 1995. ISSN 0038-0938.

SCHNABLEGGER, H.; SINGH, Y. The SAXS guide: getting acquainted with the principles. **Anton Paar GmbH**, v. 2, 2013.

SCOTT, J. R.; BARNETT, T. C. Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 397-423, 2006. ISSN 0066-4227.

STANKOVIĆ, A.; DIMITRIJEVIĆ, S.; USKOKOVIĆ, D. Influence of size scale and morphology on antibacterial properties of ZnO powders hydrothermally synthesized using different surface stabilizing agents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 21-28, 2013. ISSN 0927-7765.

SEVEN, O.; DINDAR, B.; AYDEMIR, S.; METIN, D.; OZINEL, M.A.; ICLI, S. Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO<sub>2</sub>, ZnO and Sahara desert dust. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 165, n. 1, p. 103-107, 2004. ISSN 1010-6030.

SHARMA, N.; JANDAİK, S.; KUMAR, S. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências AHEAD**, v. 88, n. 3, supl. p. 1689-1698, 2016.

SHINDE, V. V.; DALAVI, D.S.; MALI, S.S.; HONG, C.K.; KIM, J.H.; PATIL, P.S. Surfactant free microwave assisted synthesis of ZnO microspheres: Study of their antibacterial activity. **Applied Surface Science**, v. 307, p. 495-502, 2014. ISSN 0169-4332.

SHOEB, M. et al. ROS-dependent anticandidal activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by using egg albumen as a biotemplate. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 4, n. 3, p. 035015, 2013. ISSN 2043-6262.

SIRELKHATIM, A. et al. Review on zinc oxide nanoparticles: antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 3, p. 219-242, 2015. ISSN 2311-6706.

SPANHEL, L.; ANDERSON, M. A. Semiconductor clusters in the sol-gel process: quantized aggregation, gelation, and crystal growth in concentrated zinc oxide colloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, n. 8, p. 2826-2833, 1991. ISSN 0002-7863.

SWIDSINSKI, A. et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 44-54, 2002. ISSN 0016-5085.

TALEBIAN, N.; AMININEZHAD, S. M.; DOUDI, M. Controllable synthesis of ZnO nanoparticles and their morphology-dependent antibacterial and optical properties. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 66-73, 2013. ISSN 1011-1344.

TAYEL, A. A. et al. Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. **Journal of Food Safety**, v. 31, n. 2, p. 211-218, 2011. ISSN 1745-4565.

TOKUMOTO, M. S.; BRIOS, V.; SANTILLI, C.V.; PULCINELLI, S.H. Preparation of ZnO nanoparticles: structural study of the molecular precursor. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 26, n. 1-3, p. 547-551, 2003. ISSN 0928-0707.

TOKUMOTO, M. S.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; BRIOS, V. Catalysis and temperature dependence on the formation of ZnO nanoparticles and of zinc acetate derivatives prepared by the sol-gel route. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 2, p. 568-574, 2003. ISSN 1520-6106.

TOKUMOTO, M. S.; PULCINELLI, S.H.; SANTILLI, C.V.; CRAIEVICH, A.F. SAXS study of the kinetics of formation of ZnO colloidal suspensions. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 247, n. 1, p. 176-182, 1999. ISSN 0022-3093.

VISWANATHA, R.; AMENITSCH, H.; SARMA, D. D. Growth kinetics of ZnO nanocrystals: a few surprises. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 14, p. 4470-4475, 2007. ISSN 0002-7863.

XIONG, H.-M. Photoluminescent ZnO nanoparticles modified by polymers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 4251-4262, 2010.

YAMAMOTO, O.; LIDA, Y. Antifungal characteristics of spherical carbon materials with zinc oxide. **Journal of Ceramic Society of Japan**, v. 111, n. 1296, p. 614-616, 2003.

ZHANG, Y., WU, L. J., TASHIRO, S. I., ONODERA, S., & IKEJIMA, T. Evodiamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 1, p. 83-89, 2004.

ZHANG, L.; JIANG, Y.; POVERY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **Journal of Nanoparticle Research**, v. 9, n. 3, p. 479-489, 2007.