

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Efeito da Transformação de Nanocristais de Simonkolleite em Óxido de Zinco na Ação
Bactericida

Maria Paula Camargo Costa

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Junho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Efeito da Transformação de Nanocristais de Simonkolleite em Óxido de Zinco na Ação Bactericida

Maria Paula Camargo Costa

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Monografia apresentada à Coordenação do Curso
de Biotecnologia, da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Junho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Efeito da Transformação de Nanocristais de Simonkolleite em Óxido de Zinco na Ação Bactericida

Maria Paula Camargo Costa

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

IBITEC

Homologado pela coordenação do

Curso de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Junho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Efeito da Transformação de Nanocristais de Simonkolleite em Óxido de Zinco na Ação Bactericida

Maria Paula Camargo Costa

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

RESUMO

Neste trabalho, nanocristais de simonkolleite foram transformados em óxido de zinco (ZnO), via diferentes tratamentos térmicos em um micro-ondas e em um forno com 250°, 500°, 750° e 1000°C. Os compostos químicos formados foram investigados com base nas técnicas de difração de raios X (DRX). Verificou-se nos difratogramas de DRX as diferentes proporções de ZnO formados. Foram realizados antibiogramas e as amostras com diferentes tratamentos térmicos SM-10, SM-250 e SM-500 demonstraram ação bactericida contra as bactérias gram negativa *Escherichia coli* e gram positiva *Stafilococcus aureus*.

Palavras Chave: óxido de zinco, simonkolleite, difração de Raios X e antibiograma.

ABSTRACT

iv

In this work, nanocrystals of simonkolleite were transformed into zinc oxide (ZnO), through different thermal units in a microwave and in an oven for 250°, 500°, 750° and 1000°C.. The chemical compounds formed were investigated based on X-ray diffraction techniques (XRD). XRD diffractograms were verified as the different proportions of ZnO formed. Antibigrams and as samples with SM-10, SM-250 and SM-500 therapeutic units were done, demonstrating bactericidal action against gram-positive bacteria and *Escherichia coli* and Gram-positive *Staphylococcus aureus*.

Key words: zinc oxide, simonkolleite, X-ray diffraction and antibiogram.

SUMÁRIO

v

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivos Gerais.....	8
2.2. Objetivos Específicos.....	8
3. METODOLOGIA.....	9
3.1. Síntese e Caracterização dos Nanocristais.....	9
3.2. Determinação da atividade bactericida	10
3.3. Análise estatística.....	12
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
5. CONCLUSÃO	20
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas bacterianas constituem um problema grave de saúde que tem atraído a atenção de diversos pesquisadores, sendo uma ameaça à saúde humana. Segundo dados da Organização Mundial de saúde (OMS), infecções representam 25% das mortes no mundo (OMS, 2010). Apesar do progresso que tem sido obtido nos tratamentos de infecções, é preocupante o crescente número de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos no mundo todo (MOHR et al., 2018).

As bactérias multiplicam-se muito rapidamente e uma mutação que ajude um único micróbio a sobreviver na presença de um antibiótico rapidamente se tornará predominante na população microbiana. Assim, é importante se encontrar novas técnicas antimicrobianas contra a qual a bactéria não seja capaz de desenvolver resistência (SITHOLE et al., 2012). Diante disso, a nanotecnologia tem se tornado cada vez mais importante nas áreas biomédicas e farmacêuticas como uma estratégia antimicrobiana.

A venda de antibióticos no Brasil supera a venda de outros fármacos como analgésicos/antitérmicos (ANVISA, 2012). O inadequado uso de antibióticos ocorre pois a maior parte da população, obtêm prescrições inadequadas para o uso de antibióticos além de utilizar esse tipo de medicamento sem prescrição médica ou até interrompendo o tratamento antes do período necessário de ação do antibiótico. Esse comportamento acelera os mecanismos de defesa das bactérias, fazendo com que o medicamento perca sua eficiência. (PAIVA et al., 2013). A resistência bacteriana ocorre quando a bactéria adquire a capacidade de se multiplicar na presença de antibióticos em doses mais altas que as doses ministradas em pacientes.

Do ponto de vista econômico, a resistência bacteriana gera grandes custos porque na

maioria dos casos o tratamento é prolongado e/ou mais caro, pois muitos dos antibióticos considerados necessários são mais caros. Além disso, é necessário maior período de internamento hospitalar, maior número de consultas médicas e a administração por via intravenosa, que pode ser necessária, exige mais material médico e mais profissionais de saúde envolvidos (OMS, 2015).

De acordo com a revista bio em foco (MOBIUS LIFE, 2019), a lista das 10 bactérias mais resistentes do mundo inclui em sexto lugar a bactéria *Escherichia coli*, inofensiva enquanto está no intestino humano, porém em contato com outros órgãos, leva a infecções alimentares, meningites e infecção urinária. Além disso, algumas cepas possuem alto nível de resistência dos antibióticos. E em primeiro lugar está a bactéria *Staphylococcus aureus* (MRSA), presente naturalmente na pele, mas ao invadir outras partes do corpo, pode causar infecções como a meningite e pneumonia. Na década de 60, 80% das amostras de MRSA eram resistentes aos antibióticos.

A bactéria *Staphylococcus aureus* é bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (SANTOS et al., 2007).

A bactéria *Escherichia coli*, do grupo gram-negativo, possui fácil cultivo em laboratório, e é empregada como indicador de contaminação fecal, pois têm seu habitat exclusivo no trato intestinal. Sua presença na água indica a possibilidade de também estarem presentes microrganismos entéricos/ patogênicos. Porém, alguns sorotipos de *E. coli* são responsáveis por gastroenterites, sendo a diarreia o principal sintoma (CORDEIRO; LEITE; DEZOTTI, 2004).

A atividade antimicrobiana de nanopartículas é um campo promissor, já que elas atuam contra diversos micro-organismos, o que tem gerado aplicações na incorporação de produtos de consumo, como: papel, óculos, têxteis, e embalagens de alimentos aumentando seu prazo de validade. A ação de fotoxidação com nanopartículas é um campo a ser explorado para a eliminação de microrganismos em muitas aplicações, como materiais auto-limpantes e auto-esterilizantes. No Japão, uma das aplicações mais importantes dessa tecnologia é o uso de azulejos de cerâmica auto-esterilizantes para hospitais, particularmente em salas cirúrgicas. Ao contrário dos bactericidas comuns, os azulejos revestidos com nanopartículas fotoxidantes são continuamente ativos, enquanto houver iluminação (COLOMBO, 2016).

A utilização de nanomateriais permite a melhora de instrumentações e metodologias tradicionais de análise na medicina. Características como alta especificidade, estabilidade, dispersão de tamanho, morfologia, carga superficial e toxicidade podem ser definidas por meio da produção de nanomateriais com elevado controle dos seus parâmetros físico-químicos. Devido às suas dimensões reduzidas, as nanopartículas podem penetrar em diversas regiões do organismo de um indivíduo por meio da absorção/adsorção desses nanomateriais no uso como creme para pele, via oral, ou por inalação (CANCINO, 2014).

Os nanomateriais podem possuir diferentes conformações espaciais, difentes fases, conformações amorfas e estrutura cristalina. Estudos comparando Óxido de Zinco cristalino, com os picos típicos de difração de Bragg de cristais de ZnO hexagonais, com um Óxido de Zinco amorfo (sem forma definida) e os resultados demonstraram aument0 significativo da frequência de manchas mutantes em *Drosophila melanogaster*, indicando maior genotoxicidade que o nanomaterial cristalino. (REIS et al, 2016)

O efeito bactericida dos nanomateriais óxidos, em geral, é atribuído principalmente pela

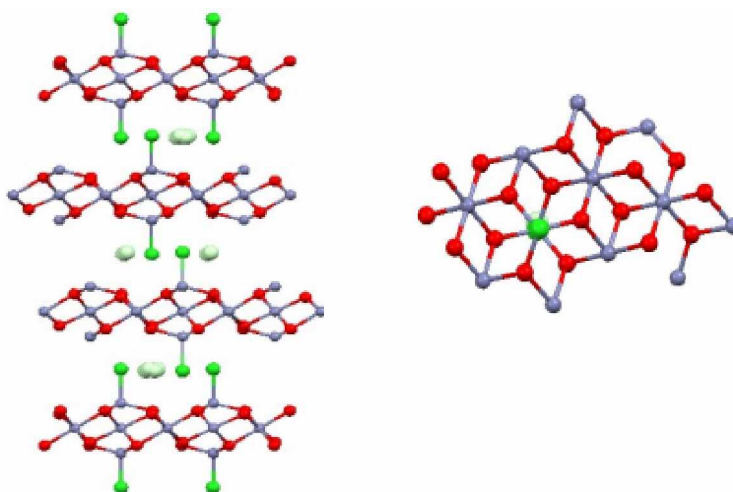
formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) na superfície do óxido¹. O processo envolve a geração de pares elétron-lacuna (e^-/h^+), quando um óxido de metal semiconductor é ativado por radiação ultravioleta, com energia maior ou igual à do seu “bandgap”. Essas espécies podem se recombinar ou migrar para a superfície do catalisador, reagindo com espécies adsorvidas, como por exemplo a membrana de uma bactéria. O considerável poder redutor dos elétrons fotogerados permite a redução de alguns metais e do oxigênio dissolvido, formando o íon radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Os buracos fotogerados, poderosos agentes oxidantes, são capazes de gerar radicais hidroxila ($\bullet OH$), oxidando moléculas de água (ou $-OH$) previamente adsorvidos na superfície do semiconductor. Esses agentes oxidantes atuam diretamente contra microrganismos (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, porém a membrana celular é um dos mais atingidos que pode sofrer alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas. Como consequência, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e formação de produtos citotóxicos, culminando em morte celular (FERREIRA et al., 1997). O radical hidroxila ($HO\bullet$) é o mais deletério ao organismo e causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. Nos aminoácidos e proteínas, o radical pode reagir na cadeia lateral, gerando danos e consequente perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS et al., 2006).

Simonkolleite ($Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot H_2O$), também conhecido como, hidróxido de cloreto de zinco monohidratado é um mineral secundário formado pelo produto da corrosão de zinco na forma de cristais de plaquetas micro hexagonal, como demonstrado na figura 1, com perfeita

clivagem paralela na direção (001) encontrado na região alemã de Michelsdorf. Esse mineral apresenta diversas aplicações que variam de sensor de gás à supercapacitor. A utilização desse mineral nessas aplicações está relacionada por ser ativo eletricamente e quimicamente (eletroquimicamente) devido às vacâncias de oxigênio na superfície, aumentando significativamente a condutividade. A presença dessas vacâncias de oxigênio na superfície desse mineral possibilita o seu uso como agente bactericida. (TAVARES, 2013).

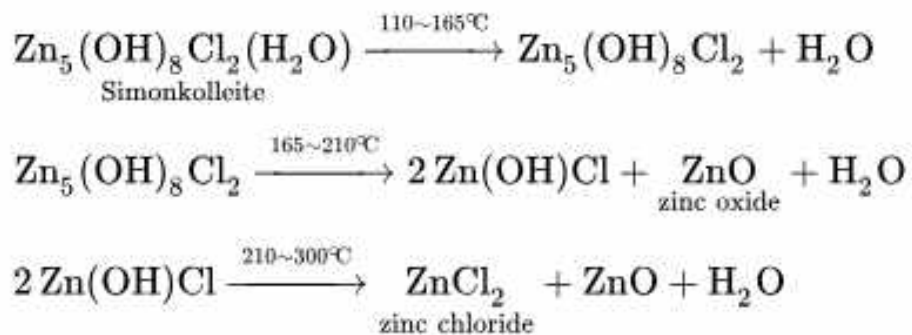
Figura 1 - Estrutura do Simonkolleite



Fonte: TAVARES, 2013

Além disso, é possível transformar o simonkolleite em óxido de zinco em função da temperatura de tratamento térmico como demonstrado na reação química da figura 2.

Figura 2 - Esquema da conversão de Simonkolleite em ZnO por meio de tratamentos térmicos



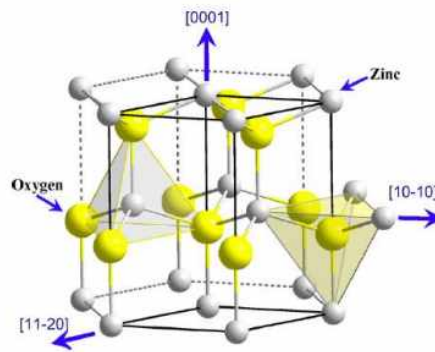
Fonte: GARCIA-MARTINEZ, 1994

O óxido de zinco (ZnO) é um semicondutor que absorve e emite na região do ultravioleta, bastante utilizado em diversas áreas, tais como, farmacêutica, cosméticos, têxtil, eletrônica e eletro-tecnológica. Além disso, nanocristais de ZnO apresentam propriedades bactericidas e antitumorais.

5

O óxido de zinco é um semicondutor intrínseco do tipo n, encontrado naturalmente no mineral chamado zincita e está na classe dos óxidos condutores transparentes, sendo altamente transparente à luz visível e eletricamente condutor. É um pó fino, amorfo, de coloração branca e com densidade igual a 5,6 g cm⁻³, é uma molécula covalente, com hibridização sp³ e apresenta caráter anfótero. O óxido de Zinco é um importante semicondutor intrínseco de “gap” direto de 3,37 eV, alta energia de ligação de excitação (60 meV) e boa mobilidade eletrônica. Ele se decompõe à pressão atmosférica em temperaturas superiores a 2070 K, apresenta atividade óptica, elétrica, físicas e mecânicas. É um material de fácil cristalização e quando está na forma de nanopartículas apresenta algumas mudanças em suas propriedades, tais como, área superficial e estrutural. Sua estrutura cristalina na forma hexagonal (wurtzita) e é constituída por átomos de zinco (Zn²⁺) e oxigênio (O²⁻), demonstrado na figura 3, coordenados tetraedricamente e dispostos alternadamente camada por camada (MAYRINCK et al., 2014).

Figura 3 - Estrutura do Óxido de Zinco



Fonte: MAYRINCK et al., 2014

Nesse trabalho, propomos estudar o efeito da transformação de nanocristais de simonkolleite em óxido de zinco na ação bactericida. Além disso, estudos bactericidas de Simonkolleite ainda não são reportados na literatura, motivando o desenvolvimento desse trabalho. Assim, iremos transformar nanocristais de simonkolleite, em diferentes razões de nanocristais de ZnO, gerando nanocompósitos derivados e investigar a ação bactericida das amostras geradas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Investigar o efeito bactericida de nanocristais de Simonkolleite submetidos a diferentes temperaturas de tratamento térmico.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar tratamentos térmicos nas temperaturas de 250, 500, 750 e 1000°C nos nanocristais de Simonkolleite.
- Investigar as propriedades físicas utilizando a técnica de Difração de Raios-x.
- Investigar o efeito bactericida dos nanocristais nas bactérias gram negativa *Escherichia coli* e gram positiva *Staphylococcus aureus*.
- Analisar estatisticamente os resultados do antibiograma.

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese e Caracterização dos Nanocristais

Os nanocristais de Simonkolleite foram sintetizados pelos professores Anielle Christine Almeida Silva e Noelio Oliveira Dantas no Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia. Posteriormente os nanocristais foram submetidos aos seguintes tratamentos térmicos: em um micro-ondas comercial, que atinge aproximadamente 100°C, por 10 minutos (SM-10) e em um forno por 1 hora nas temperaturas 250°C, 500°C, 750°C e 1000°C (SM-250, SM-500, SM-750 e SM-1000 respectivamente).

Existe a possibilidade de se incorporar diversos tipos de moléculas na superfície de uma nanopartícula ou nanocristal que permite a adição de propriedades adicionais ao nanomaterial (MENJOGE, 2010). Neste trabalho os nano cristais não foram funcionalizados, ou seja não há a adição de biomoléculas ou qualquer outra substância na sua superfície.

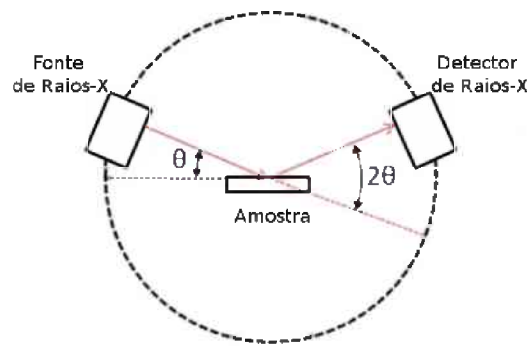
A estrutura cristalina e tamanho médio dos nano cristais formados foram confirmadas com base nos difractogramas de Raios-x, utilizando um difratômetro de Raios-x (DRX-6000), Shimadzu com usando radiação monocromática Cu-K α_1 ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$). A figura 4 mostra o

esquema experimental da difração de raios-x.

A difração de Bragg foi proposta por William Lawrence Bragg e William Henry Bragg em 1913. Eles descobriram que sólidos cristalinos produziam padrões de reflexão de raios para alguns comprimentos de onda e ângulos de incidência específicos, produzindo intensos picos de radiação refletida (conhecidos como picos de Bragg). Tanto os nêutrons quanto os raios X possuem comprimento de onda compatível com as distâncias interatômicas - da ordem de 150 pm - e, portanto, são uma ferramenta para se explorar dimensões com essa ordem de grandeza (COWLEY, 1975). Todas as caracterizações foram feitas à temperatura ambiente.

9

Figura 4 - Esquema da difração de raios-x



Fonte: HAIM, 2010

3.2. Determinação da atividade antibacteriana

O ensaio bactericida de difusão por disco foi testado contra as bactérias Gram-negativa (*E. coli*) e Gram-positiva (*S. aureus*). O teste de difusão em disco foi descrito em 1966 por Kirby e Bauer, sendo uma das mais simples e confiável utilizada pelos laboratórios de microbiologia para a determinação da sensibilidade a antibacterianos.

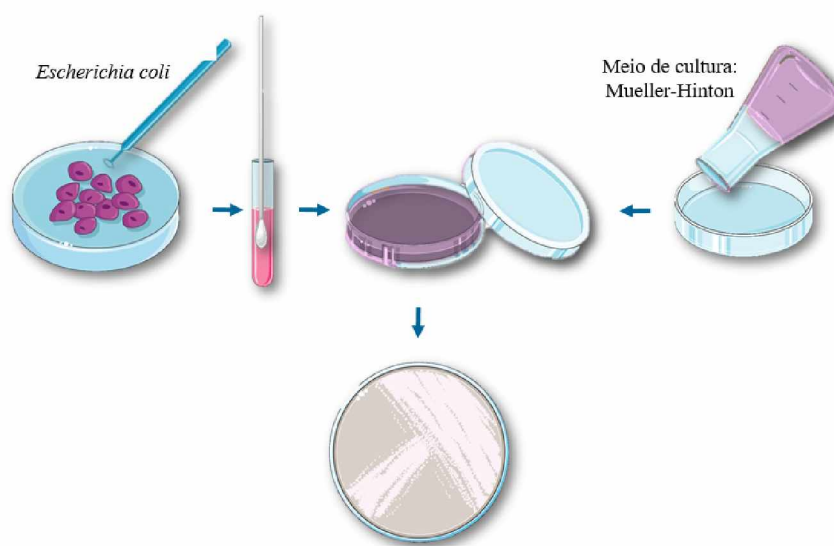
Primeiramente, cada cultura pura de bactéria foi cultivada em meio Luria-Bertani a 37° graus durante a noite em uma estufa. No outro dia, com o auxílio de uma alça bacteriológica de 3 a 4 colônias foram transferidas para um falcon contendo 3 a 4 ml de tampão fosfato-salino para obter

6

uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml como demonstrado no esquema da figura 5.

Figura 5 - Esquema do cultivo de bactérias.

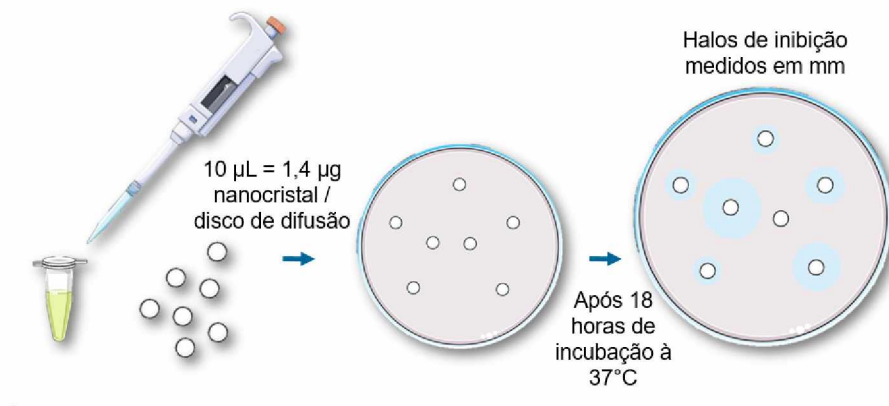
10



Fonte: CAMARGO, 2018

A cultura bacteriana é semeada e tampão fosfato-salino por espalhamento utilizando swabs em placas de meio de cultura contendo meio de cultura Müller-Hinton. O Agar Mueller Hinton é o meio padrão recomendado pela OMS para essa finalidade. Nesta placa, 10 microlitros ($1,4 \mu\text{g}$) dos diferentes nanocristais em suspensão foram utilizados em cada um dos discos, como representado no esquema da figura 6.

Figura 6 - Esquema do antibiograma



Fonte: CAMARGO, M.P.,2018

11

Subsequentemente, estas placas foram incubadas durante a noite a 37 ° em estufa. Concomitante ao período de crescimento das bactérias, a zona de inibição é formada. O veículo utilizado para os nanocristais foi água destilada, que foi utilizada como controle positivo. O controle negativo usado foi o antibiótico ampicilina. O antibiograma foi realizado em triplicata e os halos de inibição foram medidos em milímetros por meio de uma régua. Sendo assim, a medida dos halos possui 0,05 cm de incerteza. A área em volta de um disco antibiótico que não tem crescimento formada é chamada de halo de inibição. Se essa zona é observada o microrganismo é considerado sensível ao antibiótico. Por outro lado, se não há halo formado o microrganismo é considerado resistente.

3.3. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Utilizou-se o modelo estatístico One-way ANOVA para análise de comparações múltiplas entre o controle e as amostras. A análise estatística foi gerada pelo *Software GraphPad Prism 7.0*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fases cristalinas das amostras produzidas no presente trabalho foram analisadas através da difração de raios X. Os difratogramas obtidos são comparados com os cartões de difração em pó (JCPDS).

A Figura 7 mostra os padrões de DRX das amostras sintetizadas submetidas aos seguintes tratamentos por micro-ondas / 10 min, 250°C/ 5h, 500°C/ 5h, 750°C/ 5h e 1000°C / 5h.

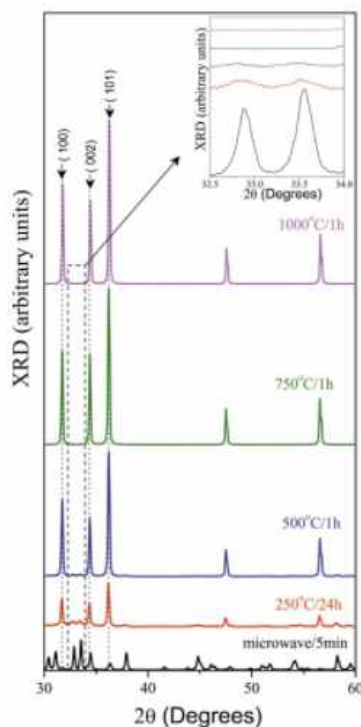


Figura 7. Padrões de difração de raios X das amostras submetidas a aquecimento térmico por micro-ondas / 10min, 250°C / 5h, 500°C / 5h, 750°C / 5h e 1000°C / 5h.

No difratograma da amostra submetida ao micro-ondas observa-se que todos os picos de difração de Bragg são característicos de Simonkolleite de $(\text{Zn}_5(\text{OH})_8\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O})$ (JCPDS, No 07-0155), confirmando a formação desses nanocristais. Em temperaturas iguais e acima de 250°C / 1h mostram outros picos de difração de Bragg que correspondem a ZnO na fase wurtzita (JCPDS card 89-7102).

No entanto, os difratogramas das amostras submetidas a 250°C / 5h e 500°C / 5h mostraram picos de difração de Bragg associados a simonkolleite, enfatizando que a transformação de simonkolleite em ZnO era incompleta nessas temperaturas.

Realizamos uma ampliação na faixa de 32 a 34 para demonstrar que os principais picos de simonkolleite desapareceram apenas a temperaturas superiores a 750°C.

O tamanho médio dos nanocristais foi determinado ajustando o pico principal do difratograma e a largura a meia altura substituída na fórmula de Debye-Scherrer, sendo que o Simonkolleite em torno de 24,1 nm e dos nanocompósitos derivados em torno de 42,0; 48,4 nm (250°C / 5h, 500°C / 5h) e de ZnO em torno de 53,0 e 55,0 nm (750°C / 5h e 1000°C / 5h).

Outro resultado encontrado foi a porcentagem de óxido de zinco formado em cada tratamento térmico, SM-10 possui 100% simonkolleite e 0% de ZnO, SM-250 possui 63,6% ZnO, SM-500 possui 69,5% ZnO e SM-750 e SM-1000 apresentam 100% de ZnO formado, descrito na Tabela 1.

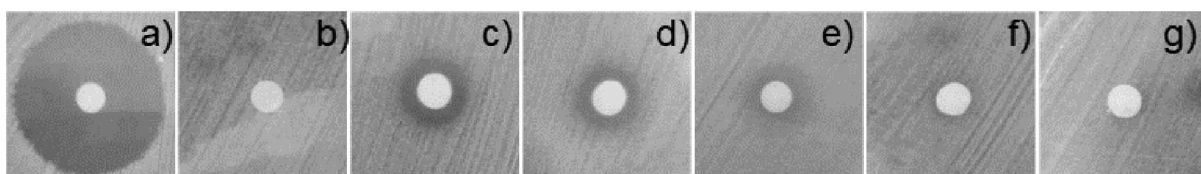
Tabela 1: Porcentagem de ZnO formada em cada amostra e tamanho do cristal

Amostras	Porcentagem de ZnO	Tamanho do Nanocristal (nm)
SM-10	0%	24,1
SM-250	63,6%	42,0
SM-500	69,5%	48,4
SM-750	100%	53,0
SM-1000	100%	55,0

Os nanocristais de SM-10, SM-250, SM-500, SM-750 e SM-1000 foram testados quanto à sua atividade antibacteriana in vitro contra bactérias gram-positiva *Stafilococcus aureus* e bactérias gram-negativa *Escherichia coli* na concentração de 1,4 mg / ml. A figura 8 mostra os halos de inibição formados nas bactérias *E. coli* e *S. aureus* respectivamente

Tamanho variação, 250 e 500, 500 e 1000 cristalinidade varia maior gera menor atividade influenciou a concentração

1.



2.

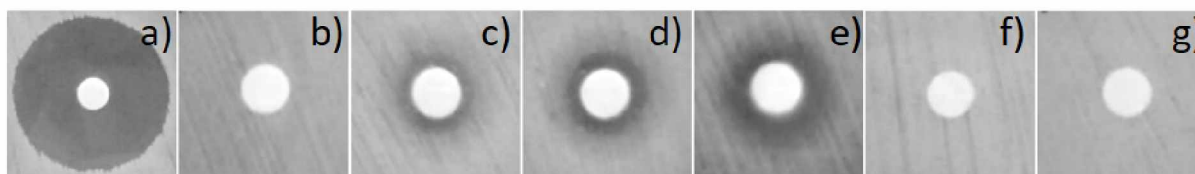


Figura 8: Halos de inibição formados em volta dos discos de papel contendo nanocristais. 1. *E.coli* 2.. *S.aureus* a) Ampicilina b) Água destilada c) SM-10 d) SM-250 e) SM-500 f) SM-750 g) SM-1000.

A figura 9 mostra em forma de gráficos o comportamento de cada bactéria frente ao nanocristal/compósito testado. O comportamento de toxicidade de *Stafilococcus aureus* apresentou maiores halos de inibição gerados por SM-500 (3,0 e 5,3 mm) seguidos por SM-250 (2,3 e 4,0 mm). *Escherichia coli* apresentou a maior zona de inibição com SM-10 (7,0 mm) e depois disso SM-250 (6,3 mm). Assim, de forma geral, os nanocristais SM-500, SM-10 e SM-250 apresentaram maior atividade em comparação com os nanocristais SM-1000 e SM-750.

a)

b)

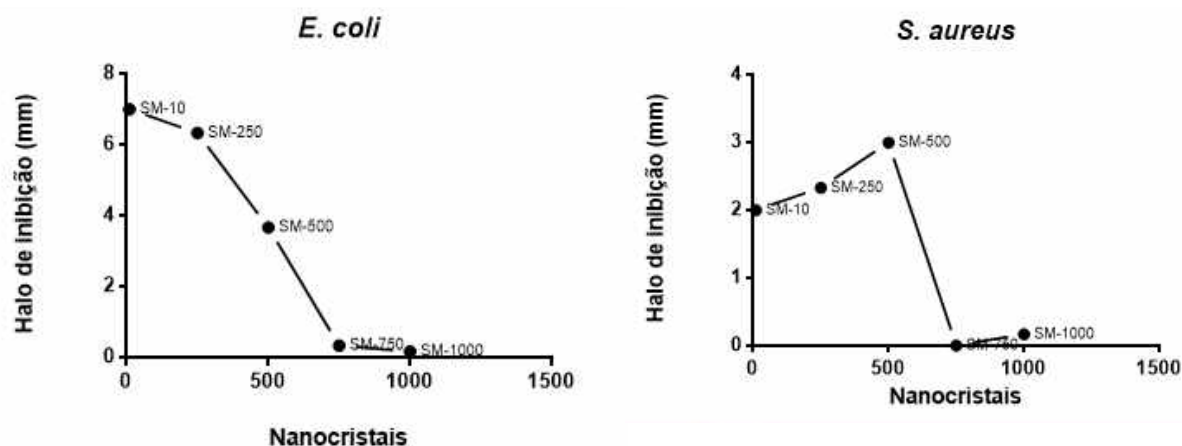


Figura 9: Curva do comportamento dos halos de inibição das bactérias em relação aos tratamentos SM-10, SM-250, SM-500, SM-750 e SM-1000. a) *E. coli* e b) *S. aureus*.

De acordo com a análise estatística dos dados, realizados em triplicata, no antibiograma da bactéria *S. aureus* as únicas amostras estatisticamente significativas foram ampicilina ($p < 0,0001$) e SM-500 ($p < 0,05$). Esse dado informa que, mesmo com a formação do halo de inibição, em torno do disco de difusão, em SM-10 e SM-250 ele não é significativo, ou seja, o halo encontrado no estudo clínico não é relevante no âmbito estatístico. Já em *E. coli* mais amostras foram significativas. SM-10, SM-250, ampicilina ($p < 0,0001$) e SM-500 ($p < 0,01$). Novamente as amostras SM-750 e SM-100 não demonstraram efeito bactericida significativo como demonstrado na figura 10.

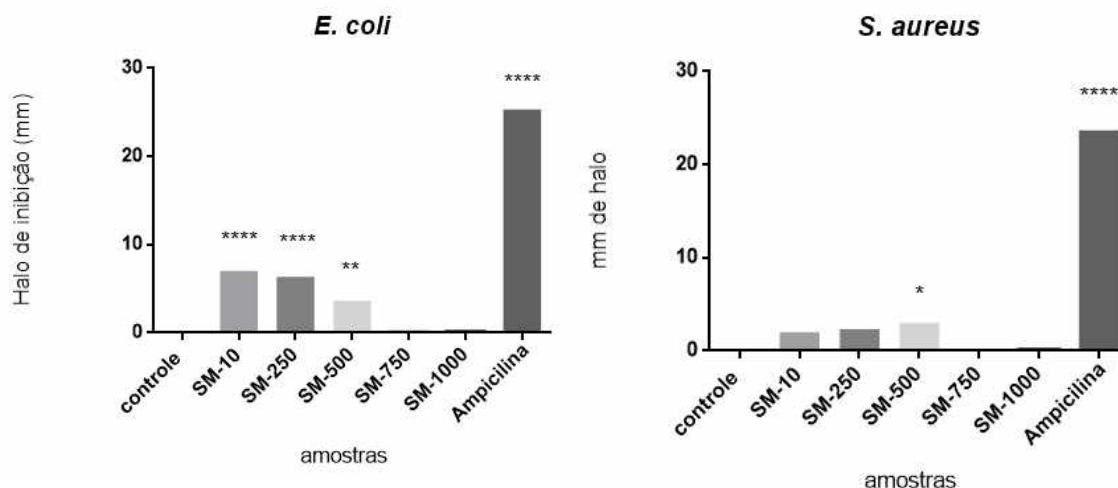


Figura 10 - Gráfico com análise estatística dos antibiogramas realizados.

Foi observado de acordo com a comparação dos resultados de DRX, com as porcentagens de óxido de zinco formadas de acordo com os diferentes tratamentos térmicos, e com os testes bactericidas que SM-10 possui 100% simonkolleite e 0% de ZnO e possuiu maior halo de inibição em *E. coli*. Já em *S. aureus*, a amostra com maior halo, ou seja, maior efeito bactericida foi SM-500 que possui 69,5% de ZnO, o que demonstra que a maior porcentagem de ZnO aumentou a capacidade bactericida do nanocompósito.

SM-750 e SM-1000 apresentaram 100% de ZnO formado, porém baixa capacidade bactericida em todas as bactérias testadas, o que demonstra que o nanocompósito derivado do aquecimento do ZnO é mais eficiente que apenas ZnO nas bactérias testadas e que o simonkolleite isolado foi mais eficiente que o nanocompósito em *E. coli*.

Uma diferença importante entre as bactérias cultivadas está relacionada a *S. aureus* ser uma bactéria gram-positiva com uma estrutura de membrana menos complexa. Já a bactéria *E. coli* possui parede celular, estrutura responsável pela forma, rigidez bacteriana, divisão celular e muitas vezes manutenção osmótica, com uma espessura de aproximadamente 10 a 20 nm. Essa parede formada, entre outras substâncias, por um complexo macromolecular. Portanto, ela é quimicamente

mais complexa, possuindo maior quantidade de aminoácidos e de lipídeos (DAVIS, 1989)

Em *E. coli* a amostra bactericida foi SM-500, ou seja, um nanocompósito de 48,4 nm. As bactérias gram-negativas (*E. coli*) possuem uma camada celular externa composta de lipopolissacarídeo (LPS) a qual pode agir como um fator de barreira a mais de permeabilidade, porém a bactéria foi inibida por mais tipos de amostras (SM-10, SM-250, SM-500), ou seja, simonkolleite de 24,1 nm, e dois nanocompósitos com 42,0; e 48, 4 nm, respectivamente.

No estudo de Liu et. al (2009), o contato da *E. coli* com nanopartículas de ZnO levou à danificação e deformação da membrana bacteriana, tendo-se desintegração de componentes intracelulares. Porém nos resultados obtidos a bactéria gram-negativa foi mais susceptível às amostras testadas do que *S.aureus* que possui uma membrana menos complexa. Sendo assim, o mecanismo de ação exato que as nanopartículas causam ainda não é definido, os modos mais prováveis que tem sido estudados são: liberação de íons Zn; interação da nanopartícula com a integridade da membrana bacteriana; e a produção de espécies reativas de oxigênio, o que induz ao estresse oxidativo.

De acordo com a Food and Drug Administration, o ZnO, é considerado um material seguro e atóxico aos seres humanos. Além disso, possui um leque de possibilidades para sua incorporação em diferentes matrizes conferindo propriedades diversas, como capacidade de absorver tanto raios UV-A quanto raios UV-B, propriedade antimicrobiana, melhora de algumas propriedades de empacotamento tais como resistência mecânica, estabilidade e propriedades de barreira (MIRZA et al., 2015; ESPITIA et al., 2012; KUMARI et al., 2011).

De acordo com os resultados obtidos os nanocompósitos derivados do aquecimento de ZNO são mais eficientes para os dois tipos de bactérias. Ou seja, existem outros mecanismos de ação além da ação do Zn. Esse mecanismo extra pode se dar pelo tamanho menor de partícula formada, pela estrutura espacial do simonkolleite (placas hexagonais) ou por características eletroquímicas

diferentes.

Algumas perspectivas para a continuação desse trabalho são: Testar diferentes amostras de nanocompósitos, Simonkolleite e ZnO com o mesmo tamanho, para observar a variação da atividade bactericida apenas em relação ao material, testar contra uma maior gama de bactérias, buscar novos tipos de antibiogramas para validar ainda mais o trabalho e também determinar se esses materiais apenas retardam ou inibem completamente o crescimento bacteriano, como testes em meio de cultura líquido e observando a densidade ótica e realizar experimentos para buscar dados que elucidem o modo de ação da atividade bactericida.

A nanotecnologia possui uma multidisciplinaridade intrínseca pois ela envolve a interligação de grandes áreas da ciência, como a química, biologia, física, medicina, engenharia e informática. Essa característica, além de ser um desafio, deve também motivar os pesquisadores a cada vez estudarem mais essa ciência e obter novos resultados que podem ser aplicados em vários setores, como o de energia, iluminação, automobilístico, de embalagens, cosméticos, tecidos, fármacos entre outros.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram testados diferentes tratamentos térmicos em simonkolleite até transformá-lo em 100% de ZnO. Após a investigação por difratogramas de raio x, observou-se as porcentagens geradas de ZnO e assim pôde-se comparar a atividade bactericida e a relação com diferentes combinações de porcentagem de ZnO em nanocompósito, simonkolleite e ZnO em bactérias gram negativas e gram positivas. Assim conclui-se que o tratamento térmico fornece um método eficaz para transformação de simonkolleite em ZnO e que o nanocompósito intermediário na transformação de simonkolleite à ZnO, e o simonkolleite possuem propriedades bactericidas contra *Escherichia coli* e *Stafilococcus aureus*. Sendo SM-10 (simonkolleite puro), SM-250 (nanocompósito com 63,6%% de ZnO) e SM-500 (nanocompósito com 69,5% de ZnO) agentes bactericidas contra *Stafilococcus aureus* e SM-500 agente bactericida contra *Escherichia coli*.

SITHOLE, J. et al. Simonkolleite nano-platelets: Synthesis and temperature effect on hydrogen gas sensing properties. **Applied Surface Science**, [s.l.], v. 258, n. 20, p.7839-7843, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.04.073>.

PAIVA, C. L., ZANI, L. B., DUARTE, I. D., & JONIS-SILVA, M. D. A. Uso Indiscriminado de Antibióticos e Superbactérias KPC: Temas CTS Controverso no Ensino de Biologia. *Revista Eletrônica Debates em Educação Científica e Tecnológica*. v.03, n.01, p. 32-40, junho de 2013.

SANTOS, André Luis dos et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.413-423, dez. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1676-24442007000600005>.

CORDEIRO, Angela Cristina de Souza; LEITE, Selma Gomes Ferreira; DEZOTTI, Márcia. Inativação por oxidação fotocatalítica de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* sp. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 5, p.689-694, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000500002>.

COLOMBO, Amanda. **Avaliação da atividade antimicrobiana de nanopartícula de óxido de zinco (ZnO)**. 2016. 25 f. TCC (Graduação) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, 2016.

CANCINO, Juliana; MARANGONI, Valéria S.; ZUCOLOTTTO, Valtencir. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Quím. Nova**, São Paulo ,

v. 37, n. 3, p. 521-526, June 2014 .

REIS, E.M. *et al.* Evaluation of titanium dioxide nanocrystal-induced genotoxicity by the cytokinesis-block micronucleus assay and the *Drosophila* wing spot test. **Food and Chemical Toxicology Volume 96**, [S. l.], p. 309-319, 1 set. 2016.

FERREIRA, Hadma Sousa; RANGEL, Maria do Carmo. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, [s.l.], v. 32, n. 7, p.1860-1870, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422009000700033>.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista de Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

TAVARES FILHO, Sérgio Rodrigues. **Simulação de estrutura e cálculo de propriedades de $Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot H_2O$ e $Zn_5(OH)_8(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$ utilizando métodos ab initio**. 2013. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/5515>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

GARCIA-MARTINEZ, O. et al. "On the thermal decomposition of the zinc(II) hydroxide chlorides $Zn_5(OH)_8Cl_2 \cdot (H_2O)$ and β - $Zn(OH)Cl$ ". *J. Mat. Sci.* 1994, 29, 5429

MAYRINCK, Caroline et al. Synthesis, Properties and Applications of Nanostructured Zinc

Oxide. **Revista Virtual de Química**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.1185-1204, 2014. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.5935/1984-6835.20140078>.

MENJOGE, A. R.; Kannan, R. M.; Tomalia, D. A.; *Drug Discovery Today* **2010**,15,171.

COWLEY, John M (1975). *Diffraction Physics*. Amsterdam: North-Holland. 410 páginas. [ISBN 0-444-10791-6](http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-10791-6).

HAIM, Arbel. **Elastic and Mechanical Characterization of Thin Gold Films Utilizing Laser-Based Surface-Acoustic-Waves Spectroscopy**. 2011. Tese (Tel-Aviv University) - Mestrado, [S. l.], 2010

LIU, Y. et al. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157: H7. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 107, n. 4, p.1193-1201, 17 abr. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04303.x>.

MIRZA, E. H., IBRAHIM, W. M. A. B. W., MURPHY, B. P., DJORDJEVIC, I. Polyoctanediol citrate-zinc oxide nano-composite multifunctional tissue engineering scaffolds with anti-bacterial properties. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.*, v. 10, p. 415-428, 2015.

ESPITIA, P. J. P., SOARES, N. F. F., COIMBRA, J. S. R., ANDRADE, N. J., CRUZ, R. S., MEDEIROS, E. A. A. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food Bioprocess Tech.*, v. 5, p. 1447-1464, 2012.

KUMARI, M., KHAN, S. S., PAKRASHI, S., MUKHERJEE, A., CHANDRASEKARAN, N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *J. Hazard. Mater.*, v. 190, p. 613–621, 2011.

MOHR, Laura Cassol et al. Efeito antimicrobiano de nanopartículas de ZnO E TiO₂ frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. **Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.01-10, 4 abr. 2018. Universidade do Estado de Santa Catarina. <http://dx.doi.org/10.5965/24473650312017011>.

SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T.. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 96, n. 4, p.803-809, abr. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02234.x>.

LIU, Jin et al. Effect of Organic Substrates on the Photocatalytic Reduction of Cr(VI) by Porous Hollow Ga₂O₃ Nanoparticles. **Nanomaterials**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.263-263, 22 abr. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nano8040263>.

HAWTHORNE, Frank C; SOKOLOVA, Elena. SIMONKOLLEITE, Zn-5(OH)(8)Cl-2(H₂O), A DECORATED INTERRUPTED-SHEET STRUCTURE OF THE FORM [M phi(2)](4). **The Canadian Mineralogist**, Canada, v. 8, n. 51, p.939-946, jan. 2002.

SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; KAUS, N. H. M.; ANN, L. C.; BAKHORI, S. K. M.; HASAN, H.; MOHAMAD, D. **Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism**. **Nano-Micro Lett**, v. 7, p. 219–242, 2015

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. **Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review**. **Materials**, v. 7, p. 2833-2881, 2014. 219–242, 2015

AHAMED, M. et al. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 7, p. 845-857, 2012.

PREMANATHAN, M. et al. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram- positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 2, p. 184-192, 2010.

24

DAVIS, B. D. ; DULBECCO, R. Microbiologia de Davis ã Infec  es Bacterianas e Mic  ticas. Vol III. 2. ed. São Paulo: Harbra do Brasil. p. 759, 1979. 1219 p