

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO E LICENCIATURA EM QUÍMICA

MARYANE COVEZZI NASCIMENTO

**BIOSSÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2016

MARYANE COVEZZI NASCIMENTO

**BIOSSÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de TCC2, do Curso Superior de Bacharelado em Química do departamento de Química e Biologia – DAQBI - da Universidade Tecnológica federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel.

Orientadora: Profa. Dra. Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2016

MARYANE COVEZZI NASCIMENTO

**BIOSSÍNTESE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Avaliador: Profa. Dra. Marlene Soares
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

Avaliador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

Profa. Dra. Giselle Maria Maciel
Orientadora

Dra. Danielle Caroline Schnitzler
Coordenadora de Curso

Curitiba, 29 de novembro de 2016.

Resumo

NASCIMENTO, Maryane Covezzi, **Biossíntese e atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade tecnológica federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Os materiais em escala de nanômetros são alvo de muitos estudos devido à sua gama de aplicações tecnológicas, sendo essencial a investigação de suas propriedades, aplicações e meios de síntese. A biossíntese ou síntese verde vem se destacando por ser uma tecnologia viável e sustentável para sintetizar nanopartículas, levando vantagem sobre a síntese química e física por ser rentável e limpas, por não consumirem muita energia e tão pouco gerarem resíduos tóxicos. Dentre essas nanopartículas que podem ser biossintetizadas, destacam-se as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs), devido às suas propriedades mecânicas, magnéticas, químicas e antimicrobianas. As nanopartículas de ZnO foram sintetizadas por processos biotecnológicos, colocando o óxido de zinco comercial em contato com os fungos, os quais possuem as enzimas e outras proteínas necessárias para a síntese biológica das nanopartículas de ZnO. O material obtido foi caracterizado, por Difração de Raios X (XRD), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Após a caracterização foi possível iniciar os testes utilizando as nanopartículas de óxido de zinco como inibidores do crescimento de bactérias patogênicas através da microdiluição em caldo, encontrando a concentração inibitória mínima (MIC). Os resultados obtidos foram satisfatórios e condizentes com o esperado.

Palavras chave: biossíntese, nano óxido de zinco, síntese verde, antimicrobiano, resistência microbiana.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Maryane Covezzi, **Biosynthesis and antimicrobial activity of Zinc Oxide nanoparticles**. 2016. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) – Departamento Acadêmico de Química e Biologia. Universidade tecnológica federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Nanometer-scale materials are the subject of many studies due to their range of technological applications, and their properties, applications and synthesis media are essential. The biosynthesis or green synthesis has been outstanding because it is a viable and sustainable technology to synthesize nanoparticles, taking advantage of the chemical and physical synthesis for being profitable and clean, as they do not consume much energy and do not generate toxic residue. Among these nanoparticles that can be biosynthesized, the zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) stand out due to their mechanical, magnetic, chemical and antimicrobial properties.

ZnO nanoparticles were synthesized by biotechnological processes, placing the commercial zinc oxide in contact with the fungi, which have the enzymes and other proteins necessary for the biological synthesis of ZnO nanoparticles. The material obtained was characterized by XRD, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Infrared Spectroscopy by Fourrie Transform (FTIR). After the characterization, it was possible to start the tests using the zinc oxide nanoparticles as inhibitors of the growth of pathogenic bacteria through broth microdilution, finding the minimum inhibitory concentration (MIC). The results were satisfactory and consistent with the expected results.

Key words: Biosynthesis, nano zinc oxide, green synthesis, antimicrobial, microbial resistance.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	5
2. JUSTIFICATIVA	7
3. OBJETIVOS	8
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
4.1. NANOTECNOLOGIA	9
4.1.1. Bionanotecnologia	10
4.2. AGENTES ANTIMICROBIANOS NANOESTRUTURADOS	11
4.2.1 Nanopartículas de óxido de zinco	12
4.2.2 Caracterização	13
4.3. RESISTÊNCIA MICROBIANA	15
4.3.1 Antibióticos	16
4.3.1.1 Cefalexina	17
4.3.1.2 Amoxicilina	17
5. METODOLOGIA	18
5.1. FUNGOS	18
5.2. PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA	18
5.3. BIOSÍNTESE DA NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO	19
5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	19
5.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS	19
5.5.1. Teste de Difusão em Ágar em Perfuração de Poços	20
5.5.2 Bactérias	20
5.5.3. Antibióticos comerciais	20
5.5.2. Preparo de Placas de Petri para os Ensaios	21
5.5.3. Padronização do Inóculo e Inoculação	21
5.5.4. Aplicação da amostra e dos Antibióticos nas placas	22
5.5.5. Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM / CBM)	22
5.6 TESTES ESTATÍSTICOS	22
6. VIABILIDADE	23
7. CRONOGRAMA	24
8. RESULTADOS ESPERADOS	25
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia vem atraindo muitas atenções nos últimos anos, pelo fato de causar um grande impacto com seus novos materiais, gerando melhorias na qualidade de vida e na preservação do meio ambiente (FERREIRA & RANGEL, 2009). Com escalas manométricas, os materiais podem adquirir diferentes propriedades químicas, biológicas e físicas, o que leva a uma gama de possibilidades para o desenvolvimento da nanotecnologia (SUDARENKOV, 2012). As nanopartículas de metais demonstram que suas propriedades podem ser modificadas de acordo com o metal em macroescala (BRUST, 1994). Dentro desse âmbito de desenvolvimento, surge a nanobiotecnologia, onde baseada em princípios limpos de síntese de nanopartículas a partir de um processo biotecnológico, tendo aplicação em diferentes setores como, na medicina, agricultura, eletrônica, cosmético, meio ambiente, dentre outros. A nanobiotecnologia verde faz uso da química verde, promovendo desenvolvimento tecnológico sustentável, sendo economicamente viáveis e ecologicamente corretas (RAI, 2013). Atualmente, a nanobiotecnologia, é um campo da ciência que se preocupa em utilizar sistemas biotecnológicos otimizados através da evolução para fabricação de matérias nanoestruturados funcionais, tanto orgânicos quanto inorgânicos (Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives, Volume 1).

Os métodos de síntese dessas nanopartículas se dividem em químicos, físicos e biológicos (ONZI, 1992). Existem inúmeras formas de síntese de nanopartículas de forma química e física, entretanto essas formas, muitas vezes demandam muita energia ou geram como resíduos, substâncias químicas tóxicas, por isso é interessante o desenvolvimento de novas formas de síntese. A biossíntese é uma forma ecológica de sintetizar essas nanopartículas, que tem sido realizada principalmente pelo uso de bactérias, fungos, plantas, acnomicetos e cianobactérias. Esses sistemas biológicos têm sido usados como forma de síntese de nanopartículas metálicas e seus respectivos óxidos. Sabe-se que muitos organismos têm a capacidade de produzir esses materiais inorgânicos extra e intracelularmente (FAYAZ et al., 2009). Certos fungos têm a capacidade de produzir metabólitos extracelulares, para sua própria defesa, quando exposto a algum tipo de estresse, como à presença de metais tóxicos. Na biossíntese de nano óxidos metálicos por um

fungo o micélio é exposto à solução de íons do metal, onde o fungo é levado a produzir enzimas que fazem com que o metal ou seu óxido se transforme em nano partículas metálicas ou óxido de metal sólidos sem toxicidade (VAHABI et al., 2011).

Nos últimos anos, o surgimento de cepas de bactérias e fungos resistentes às drogas antimicrobianas mais comuns disponíveis no mercado tem aumentado de forma alarmante, sendo considerado um problema de cunho mundial. Microrganismos patogênicos livres no meio ambiente podem causar doenças nos seres humanos, animais ou vegetais. Em virtude disso, tem sido necessário ir em busca de novos agentes antimicrobianos, eficazes e atóxicos (GAJBHIYE et al., 2009).

Com a finalidade de resolver esse problema que é a resistência microbiana as drogas atuais, os nanomateriais inorgânicos, mais precisamente os óxidos de metais nanoparticulados, tem emergido como uma promessa de ser o futuro das drogas antimicrobianas, já que eles possuem boa durabilidade, baixa toxicidade, alta estabilidade e são bem seletivos quanto comparados a drogas orgânicas. Óxidos metálicos nanoparticulados já são muito estudados por suas promessas na tecnologia (Stankic et al. J Nanobiotechnol).

Dessa forma, faz-se necessário a utilização de novas formas de combater esses microrganismos patogênicos. Assim este trabalho tem como objetivo realizar a biossíntese de nanopartículas de óxido de zinco através do uso de fungos, *Aspergillus niger* e *Trametes sp.* Será testado os efeitos dessas nanopartículas em bactérias gram-negativas patogênicas, contribuindo para estudos na área da biossíntese aplicada a antimicrobianos, e ao controle, com novas drogas, desses organismos prejudiciais a biota.

2. JUSTIFICATIVA

Em meados de 2014 a OMS (Organização Mundial de Saúde) publicou o relatório *“Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance”* pelo qual se chegou à conclusão que a resistência microbiana a antibióticos e outras drogas é uma “ameaça global” à saúde pública. É sabido que as bactérias sofrem mutações genéticas e que fenótipos são passados, criando assim a resistência as chamadas multidrogas. Frente a este problema, o que se tem feito são novas pesquisas e estudos para o desenvolvimento de novas tecnologias e novas drogas. Dentre essas novas tecnologias, surge a aplicação da nanotecnologia, onde as partículas têm propriedades diferentes de acordo com seu tamanho e morfologia. A nanobiotecnologia, um ramo da ciência muito interdisciplinar, que está em desenvolvimento, visa buscar novas fontes de síntese dessas nano partículas, bem como sua aplicação como agente antimicrobianos, sendo esta uma alternativa mais sustentável, limpa e ambientalmente correta.

Dentre as diferentes formas de síntese, a micossíntese, ou seja, síntese via fungo, dessas nanopartículas, tem destaque e eficiência, criando partículas de metais ou óxidos de metais, onde há conhecida atividade antimicrobiana, sendo estes testados em bactérias patogênicas. O que gera um incentivo para à realização de pesquisas e aprimoramento, que futuramente podem contribuir para o avanço das tecnologias e desenvolvimento de novas drogas no combate aos diferentes microrganismos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 NANOTECNOLOGIA

Define-se nanociência como estudo do fenômeno e da manipulação de materiais em escalas atômicas, molecular e macromolecular, onde as propriedades diferem significativamente dos mesmos materiais em grande escala; e nanotecnologia como, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas, onde se controla o tamanho das partículas para que estejam em escalas nanométricas (TURNE, 2008).

Nanotecnologia é um “apanhado” das atividades em nível atômico de átomos e moléculas, aplicadas ao mundo macrométrico. Nano materiais são considerados como aqueles que tem pelo menos uma dimensão com menos de 100 nanômetros (nm) (CHAKRABARTY, 2008). É uma ciência multidisciplinar, tendo aplicação na engenharia, desenvolvimento de novos materiais, na eletrônica, bem como em sistemas eletrotécnicos, na área médica, biológica, biotecnológicas, novas drogas, como farmacologia, e aplicadas a agropecuária, em cosméticos, indústria têxtil e catalizadores (VOGEL e JUNG, 2011).

Dois são os principais motivos pelas mudanças nas propriedades dos nanomateriais diferindo das propriedades de outros materiais: aumento na área superficial relativa; e os efeitos quânticos envolvidos (CHAKRABARTY, 2008). De acordo com a teoria quântica, os elétrons podem se comportar como onda, e isso se manifesta de forma mais clara quando os materiais estão em escalas menores, nanométricas. Isso tem efeito direto em algumas propriedades físicas das nanopartículas, como por exemplo sua cor, condutividade elétrica, e até magnetismo, que podem se alterar de acordo com a escala de tamanho que o material se encontra. Outro aspecto é uma maior superfície de contato devido a pequeno tamanho dos átomos e moléculas, gerando maior reatividade química, como por exemplo o ouro que em escala macroscópica é bem inerte em escala nanométrica pode ser bastante reativo (MELO; PIMENTA 2004).

As nanopartículas têm características ópticas, elétricas, químicas e mecânicas únicas. Muitos esforços têm sido feitos para a fabricação e caracterização dessas nanopartículas durante as últimas décadas. Várias

técnicas, tais como condensação física e química, têm sido adaptadas e bem sucedidas na síntese desses novos materiais nanoparticulados (VOGEL e JUNG, 2011). Metais com tamanho de cerca de 10 nanômetros, são em torno de sete vezes mais duros e resistentes que suas respectivas substâncias em escala maior, com centenas de nanômetros (TURNE, 2008).

3.1.1. Bionanotecnologia

O uso da biotecnologia em escalas nanométricas pode ser dividida em duas grandes vertentes. A primeira é a nanobiotecnologia, onde princípios da nanotecnologia, ou materiais em escala nanométricos são usados para uma aplicação direta em processos biológicos, como por exemplo bioengenharia ou diagnósticos médicos. A segunda é a bionanotecnologia, sendo esta a aplicação tecnológica da biologia e de biomoléculas para síntese de estruturas metálicas em escala nanométrica (RECHES and GAZIT, 2003; PATOLSKY, 2004).

Bionanotecnologia vem ganhando muita importância, devido à possibilidade de moldar metais para que tenham tamanhos nanométricos, mudando, eficientemente, suas propriedades químicas, físicas e ópticas. (PATRA e BAEK, 2014).

Conjuntos biológicos foram usados para várias aplicações nanotecnológicas com bastante eficiência. Uma das aplicações mais avançadas utilizadas recentemente é no uso de conjuntos biológicos para a síntese de fios metálicos nanoestruturados. Para esta, são utilizados vários conjuntos de biomoléculas incluindo DNA, polipeptídios e principalmente proteínas (GAZIT, 2007).

Nanopartículas podem ser sintetizadas de várias formas, incluindo métodos químicos, físicos e biológicos. Entretanto, os métodos físicos e químicos convencionais, podem resultar em coprodutos tóxicos, podendo ser perigosos para o meio ambiente. Ainda, essas partículas não são recomendadas para o uso na medicina, por exemplo (PATRA E BAEK, 2014).

A síntese de nanopartículas, usando técnicas modernas tem emergido como uma importante aplicação para a biomedicina, bem como para cuidados

com a saúde, com uma variedade muito grande de produtos. (PAL, et al., 2011). Muitos esforços têm sido feitos, pelo mundo, para o desenvolvimento de novas tecnologias verdes, ambientalmente sustentáveis, não tóxicas, usando ferramentas bionanotecnológicas (PATRA E BAEK, 2014).

Os métodos biológicos de síntese de nanopartículas, usando microrganismos, enzimas, plantas ou extrato de plantas, têm sido considerados como uma alternativa “limpa” para a síntese química e física (SANGEETHA, et al., 2011). Técnicas de síntese verde eliminam o uso de reagente químicos caros, consomem menos energia e geram produtos e coprodutos não perigosos ao ambiente (KHARISSOVA, 2013).

Essa forma de síntese é relativamente novo no meio da biossíntese de nanopartículas. A aplicação de fungos, para esse fim, tem grande potencial, por causa da sua habilidade de secretar grandes quantidades de proteínas secretadas pelos mesmos, levando vantagem sob a biossíntese feita por bactérias (RAFAKUMAR, et al., 2012).

A biossíntese fúngica se dá por meio da via intracelular ou extracelular. A taxa de produção de nanopartículas, e posteriormente o tamanho dessas nanopartículas podem ser manipuladas por meio do controle de parâmetros como pH, temperatura, concentração do substrato, tempo de exposição ao substrato, e até velocidade de rotação do *shaker* (GERICKE , PINCHES 2006a).

Em (GERICKE AND PINCHES 2006b), também foi testado a manipulação do formato e tamanho de nanopartículas de Ouro, produzidas extracelularmente por microrganismos sendo alteradas alguns parâmetros de crescimento dos mesmos. Os fungos foram considerados adequados para a biossíntese de nanopartículas, onde o mecanismo de síntese foi considerado simples. Os fungos podem ser usados para a síntese de várias nanopartículas diferentes, levando vantagem sobre a síntese utilizando bactérias, por produzir uma quantidade de proteínas extracelular muito maior que as bactérias (RANA E YADAV, 2008). Na Tabela 1, é possível observar uma lista dos fungos que já foram usados na produção de nanopartículas de diferentes metais.

Biossíntese de nanopartículas de Au, Ag, ligas de Au-Ag, Se, Pt, Pd, SiO₂, TiO₂, ZrO₂, usando fungos, bactérias, vírus, plantas e actinomicetos já foram reportados (TOOSI, et al., 2015).

Tabela 1- Biossíntese de nanopartículas por fungos

Fungo	Nanopartícula sintetizada	Método de síntese	Referência
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ag	Extracelular	Kumar et al. 2007a
<i>Colletotrichum sp.</i>	Au	Extracelular	Shankar et al. 2003a
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ag	Extracelular	Bhainsa and D'Spuza 2006
<i>Verticillium sp.</i>	Magnetita	Extracelular	Bharde et al. 2006
<i>Fusarium oxysporium</i>	Ag	Extracelular	Ahmad et al. 2003
<i>Fusarium oxysporium</i>	Au	Extracelular	Mukherjee et al. 2002
<i>Fusarium oxysporium</i>	Zircônia	Extracelular	Balsal et al. 2002
<i>Fusarium oxysporium</i>	CdS	Extracelular	Ahmad et al. 2002
<i>Fusarium oxysporium</i>	Titanato de Bário	Extracelular	Bansal et al 2006
<i>Trichothecium sp.</i>	Au	Extra e intracelular	Ahmad et al. 2005
<i>Vesticillium</i>	Au	Intracelular	Mukherjee et al. 2001
<i>Vesticillium</i>	Ag	Intracelular	Mukherjee et al. 2001; Senapati et al. 2004
<i>V. luteoalbum</i>	Au	Intracelular	Gericke and Pinches 2006b
<i>Fusarium oxysporum</i>	CdSe	Extracelular	Kumar et al. 2007b

3.2. AGENTES ANTIMICROBIANOS NANOESTRUTURADOS

Um agente antimicrobiano é uma substância natural ou sintética que mata ou inibe microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários, sem causar dano ao hospedeiro (MURRAY, 1994).

Óxidos de metais de transição e semicondutores com dimensões nanométricas, têm atraído muitos interesses em muitas áreas da química, física, ciência de materiais, biotecnologia, tecnologia de informações e tecnologias de meio ambiente, como a nova geração de tecnologia aplicável (SANGEETHA, et al., 2011).

Estudos recentes mostraram que nanopartículas de alguns materiais incluindo óxidos metálicos, podem induzir a morte celular em células eucarióticas, e inibir o crescimento em células procarióticas, devido a sua citotoxicidade

A atividade antimicrobiana de óxidos metálicos como, ZnO, MgO e CaO, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e fungos foi quantificado e avaliada em meio de cultura (SAWAI, 2003). Considerou-se que a atividade da espécie de oxigênio gerada por essas partículas de óxidos poderia ser o princípio do mecanismo de ação da atividade antimicrobiana dessas partículas (PANA, 2009). Entretanto, alguns poucos estudos têm sido feitos para o acompanhamento dos efeitos antimicrobianos de nanopartículas contra fungos e bactérias patogênicos (JONES, et al., 2008).

A biossíntese de nanopartículas de óxido de titânio (NPs deTiO₂), foi considerada uma nova forma de biodegradação, sendo um procedimento conveniente usando *Aspergillus flavus* como agente redutor e estabilizante, sendo considerado um método simples e barato (RAJAKUMAR et al., 2012).

3.2.1 Nanopartículas de óxido de zinco

O óxido de zinco é não tóxico, barato, é um sólido inorgânico, polar e não higroscópico, seguro de se trabalhar, usado como catalisador em processos orgânicos (Shamsuzzaman, et al 2013). São também utilizados em diodos de luz (LED's, sensores químicos e biológicos, fotodetectores e nanolasers de ultravioleta (CHENG; SAMULSKI, 2004).

Entre as nanopartículas de óxidos metálicos, o óxido de zinco é particularmente interessante porque ele tem aplicação, em várias áreas, como óptica, elétrica, magnética, sensores gasosos e piezoelétrico. Além dessas propriedades, as nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO), têm alto potencial catalítico, habilidade de adsorção, e é muito comum seu uso em protetores solar, cerâmicas, processamento de borracha, tratamento de água residuais e como fungicida (SANGEETHA, et al., 2012).

Por esses motivos as NPs ZnO, são bio-seguras, biocompatíveis, e tem propriedades de transporte elétricas e térmicas, que podem variar de acordo com o tamanho, formato, morfologia, orientação da partícula, tudo isso fez com que aumentasse o interesse na obtenção desse nanomaterial (DAKHLAOUI et. al., 2009; MULVANEY, 1996; KNOLL E KEILMANN, 1999). A larga transição de bandas (*the wide band gap*) e a grande energia eletrônica de ligação, fizeram do óxido de zinco importante para a ciência e para aplicações industriais (WANG et. al., 2004).

Foi observado que a inibição do crescimento de microrganismos na presença das NPs ZnO foi maior quando usado as partículas biossintetizadas do que as que foram sintetizadas quimicamente. O aprimoramento da bioatividade dessas partículas, é atribuído a relação de maior área superficial por volume. O mecanismo antibacteriano das NPs ZnO envolve a interação direta das nanopartículas com a superfície celular bacteriana, afetando a permeabilidade da membrana celular; então, essas nanopartículas adentram a célula, induzindo uma oxidação dessa célula, que resulta na inibição do crescimento bacteriano e até a morte celular (SABIR et. al., 2014; SANGEETHA E RAJESHWARI, 2012).

Essas nanopartículas de óxido de zinco podem ser aplicadas como um potente agente sanitário e esterilizante na indústria alimentícia, em equipamentos e containers, contra o ataque e possível contaminação dos alimentos por bactérias patogênicas. As nanopartículas se mostraram eficientemente tóxicas para bactérias patogênicas bem como para outros microrganismos (MOLINA E RAMOS, 2006). Nanopartículas de óxido de zinco têm o potencial para impulsionar o rendimento e o crescimento do cultivo de alimentos na agricultura (PRASAD et. al., 2012).

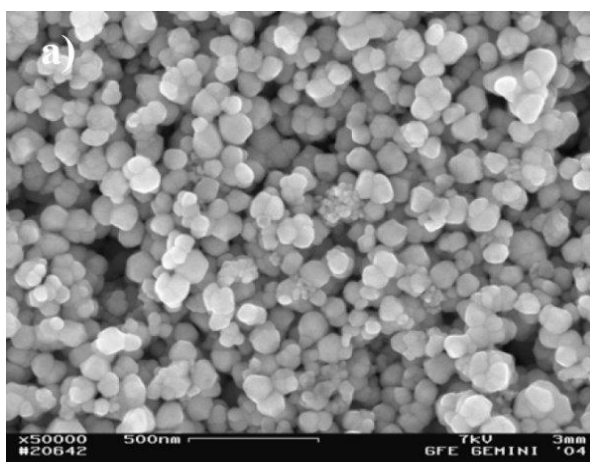
3.2.2 Caracterização

A MEV é um instrumento poderoso que permite a observação e caracterização de materiais e superfícies heterogêneas, orgânicas e inorgânicas. A área a ser analisada é irradiada com um fino feixe de elétrons focado. O tipo de sinal produzido quando o feixe de elétrons colide com a superfície de uma espécie inclui elétrons secundários e fótons com diversas energias. Esse sinal pode ser usado para obter informações da amostra como composição, topografia da superfície, cristalografia dentre outros (FIORI ET AL. 1981).

Os componentes básicos do MEV são os sistemas de lentes, o canhão de elétrons, coletor de elétrons, visualização e gravação de tubos de raios catódicos e os eletrônicos acoplados a eles (SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND X-RAY MICROANALYSIS: A TEXT FOR BIOLOGISTS, MATERIALS SCIENTISTS, AND GEOLOGISTS).

KOPLIN et. al., (2005) afirma que uma das formas de caracterizar as nanopartículas de óxido de zinco envolve a Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Uma imagem obtida por esses autores está representada na Figura 1.

Figura 1: Imagem de nanopartículas de óxido de zinco, obtidas através de Microscopia eletrônica de varredura. **Fonte:** KOPLIN et. al., 2005



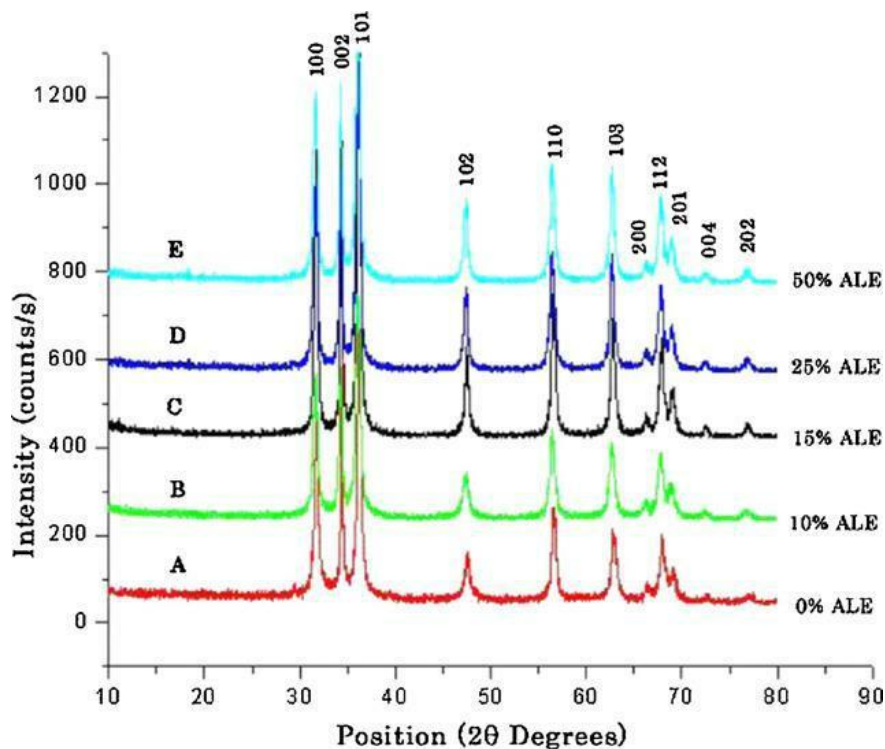
Os efeitos da difração são observados quando a radiação eletromagnética incide periodicamente sobre estruturas com variações geométricas na escala de comprimento do comprimento de onda da radiação.

Em Castro (2009), foram feitas análises de difração e raio X (DRX). Os resultados obtidos mostraram que a síntese foi efetiva e pode-se caracterizar as nanopartículas estudadas através de todas as bandas características presentes no difratograma. Além disso, outras informações também podem ser obtidas através desse difratograma como por exemplo, quanto maior a largura a meia altura do pico no difratograma de raios X, menor o tamanho das partículas analisadas.

Sangeetha et al. (2011) determinou a pureza e o tamanho dos grãos por difração de raio X, onde os dados foram registrados pelo difratômetro. Os padrões obtidos por DRX dos produtos mostraram que as amostras têm boa cristalinidade e não havia mais traços de meio. Os picos correspondem ao Nano óxido de zinco, como se observa na Figura 2.

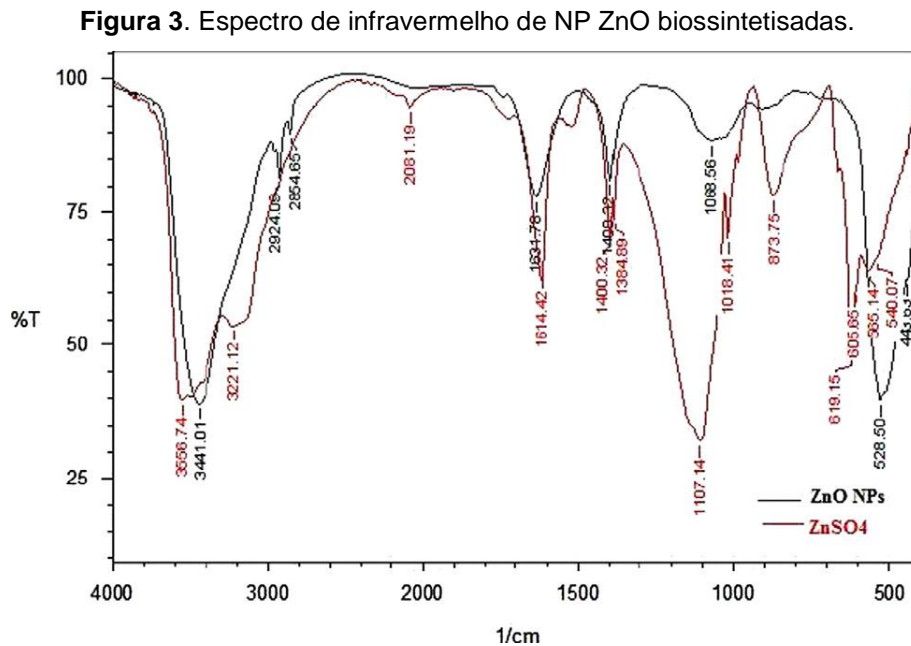
SHAMSUZZAMAN et al. (2013) afirmou que todos os picos do DRX combinaram muito bem com a fase hexagonal esperada por comparação com o banco de dados *JCPDS card No.89-7102*. O pico forte e estreito no difratograma indica que o produto obtido tem boa estrutura cristalina.

Figura 2. Padrões de XRD obtidos para as nanopartículas de óxido de zinco. **Fonte:** CASTRO, 2009.



Análises de FTIR foram feitas por SELVARAJAN, MOHANASRINIVASAN (2013), e costumam ser usadas para ter acesso a

detalhes dos grupos funcionais envolvidos na biossíntese das NP ZnO. O espectro de infravermelho obtido pelos autores, mostrado na figura 3, exibe picos proeminentes em 3441, 1631, 1400, 1068 e 528 cm^{-1} . A ampla banda vibracional observada em 3441 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das moléculas de água. A banda observada em 1631, 1400 e 1068 cm^{-1} estão associadas a vibração angular das moléculas de água. O pico correspondente em 528 cm^{-1} é o de estiramento de vibração das NP ZnO.



3.3 RESISTÊNCIA MICROBIANA

As drogas antimicrobianas se provaram muito efetivas no combate dos microrganismos patogênicos, entretanto, percebeu-se que esses fungos e bactérias patogênicos se tornaram, rapidamente, resistentes a essas drogas. Por exemplo a resistência a penicilina do *Staphylococcus aureus*, pela produção da β -lactamase, diminuindo a efetividade desse antibiótico contra infecções causadas por essa bactéria (GOLD e MOELLERING, 1996).

A resistência bacteriana é adquirida por uma célula sensível quando há alguma alteração genética que se manifesta bioquimicamente. Essas alterações genômicas podem se originar de mutações cromossômicas ou pela obtenção de plasmídeos R (de resistência) ou por transposons (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

De acordo com Madigan et al. (2010), algumas das razões que fazem organismos serem resistentes a algumas drogas são:

- A. O organismo pode não possuir a estrutura que seria inibida por um antibiótico;
- B. O organismo não é permeável ao antibiótico;
- C. O organismo pode alterar o antibiótico para uma forma não prejudicial;
- D. O organismo pode ser capaz de mudar o alvo do antibiótico;
- E. O organismo pode gerar uma via bioquímica resistente;
- F. O organismo pode se fazer valer de sua capacidade de efluxo, bombeando para fora da célula o antibiótico.

A crescente taxa de doenças infecciosas emergentes e o consequente desenvolvimento de resistências as drogas, que combatem microrganismos patogênicos, estão causando grandes preocupações no meio científico. Apesar do vasto conhecimento que se tem sobre as doenças infecciosas e de seus tratamentos, a mortalidade por doenças associadas a infecções microbianas ainda é muito alta (RAI e JAMUNA, 2011).

3.3.1. Antibióticos

Antibióticos são agentes antimicrobianos sintetizados por microrganismos, sendo a maior parte desses fármacos produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* ou fungos do gênero *Penicillium* e *Cephalosporium*. Geramente eles exercem funções antibacteriana, antifúngica, antiviral e antitumoral. Podem agir por inibição, inativação ou matar o microrganismo causador da infecção (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008).

3.3.1.1 Amoxicilina

Este antibiótico é semi-sintético e pertence a classe das penicilinas. Tem um amplo espectro de ação devido ao fato de possuir um grupamento amino. Age sobre bactéria Gram-positivas e Gram-negativas, com grande uso no tratamento de infecções do sistema respiratório (CAIAFFA *et al.*, 2002; KOROLKOVAS e FRANÇA, 2008).

4. METODOLOGIA

4.1 PRODUÇÃO DE BIOMASSA FÚNGICA

Os fungos selecionados para a biossíntese foram *Trametes sp.* e *Aspergillus niger*, disponíveis no banco de cepas do laboratório de Biotecnologia da UTFPR, campus Curitiba, sede Ecoville.

Três *plugs* de agar contendo o micélio de cada fungo foram removidos para a inoculação em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 75 mL de meio líquido MGYD (0,3% extrato de malte, 1,0% glicose, 0,3% extrato de levedura e 0,5% de peptona, com pH final igual a 7). Os frascos foram agitados em *shaker* a 130 rpm e 28°C por 72 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata (CHAUHAN et al. 2015).

Os *pellets* de biomassa fúngica, formados durante a incubação, passaram por três lavagens com água ultrapura para completa remoção do meio, e novamente incubados em 100 mL de água estéril em frascos Erlenmeyer de 250 mL, nas mesmas condições descritas acima por 72 horas. Depois da incubação a biomassa foi separada por meio de filtração a vácuo, usando papel filtro qualitativo, e o filtrado foi coletado para os experimentos de biossíntese das nanopartículas (JAIN, 2012).

4.2. BIOSÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Uma solução aquosa de óxido de zinco, com uma concentração final de 1 mM, foi adicionada a um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do filtrado. Os frascos serão incubados em *shaker* com rotação constante de 130 rpm a 28°C por 72 horas. Simultaneamente serão incubadas amostras controle, sendo o controle positivo um frasco contendo apenas 100 mL do filtrado e o controle negativo uma amostra contendo apenas 100 mL da solução de óxido de zinco. O processo será realizado em triplicata (JAIN, 2012).

O produto obtido será filtrado, seco e armazenado para posterior caracterização e utilização nos testes de atividade antimicrobiana.

4.3 SÍNTESE QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

Para fins comparativos, na caracterização das nanopartículas, será também realizado uma síntese química. Essa síntese será realizada misturando as soluções a 1 molL^{-1} de Nitrato de Zinco ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$), com solução de Hidróxido de Sódio (NaOH), com aquecimento e agitação mecânica por 12 horas. O produto obtido foi filtrado a vácuo, seco e armazenado (SANGEETHA et al. 2012).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

O pó obtido será submetido as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de Raio-X (XRD) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os parâmetros para caracterização e análise das nanopartículas em cada equipamento foram definidos, seguindo as metodologias descritas na literatura, o ângulo para DRX foi de 2θ , variando de 15 a 75° . Para FTIR foram feitas leituras de 400 a 4000 cm^{-1} , foram realizados também análises de MEV e EDS (VÁSQUEZ, 2003; SANGEETHA, et al., 2011). O microscópio eletrônico de varredura o difratômetro se encontram no Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Curitiba, sede Centro. Já o FTIR foi realizado no departamento de química também da UTFPR, disponível na sede Ecoville.

4.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS

4.5.1. Teste de Microdiluição em caldo

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de óxido de zinco foi feita como descrita em Nature (Wiegand, 2008).

A avaliação será realizada com cada cepa bacteriana separadamente. Inicialmente, os microrganismos serão ativados em ágar nutriente, por 24 horas. No momento do ensaio, essas culturas serão inoculadas em solução

salina estéril (0,9 % m v⁻¹) para padronização do inoculo, segundo a escala 0,5 de McFarland.

4.5.2 Bactérias

A avaliação da sensibilidade e inibição de crescimento bacteriano, mediante a presença das nano partículas de óxido de zinco, e por antibióticos, foi realizada com duas espécies de bactérias sendo elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

As cepas foram obtidas do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR. Essas bactérias foram caracterizadas antes da aplicação nos testes pelo uso da coloração de Gram e em meios diferenciais. As cepas foram mantidas em meios adequados para o melhor crescimento de cada microrganismo, incubados em estufa a 37°C por 24 horas e conservados na geladeira a 4°C.

4.5.3. Antibióticos comerciais

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, será utilizado a amoxicilina, antibiótico comercial. O preparo das soluções de cada um dos antibióticos será realizado de acordo com as diluições em caldo especificadas em Wiegand et al. 2008.

4.5.4. Preparo das suspensões de nanopartículas de ZnO

O nano óxido de zinco em pó foi suspenso em caldo Mueller Hinton em uma proporção de 0,5 g de NP ZnO para 6 mL de caldo agitados vigorosamente. As diluições foram feitas, para que em cada poço da microplaca, as seguintes concentrações estivessem presentes, do primeiro ao último poço respectivamente: 41,6 mg/mL, 20,8 mg/mL, 10,4 mg/mL, 5,2 mg/mL, 2,6 mg/mL, 1,3 mg/mL, 0,65 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,16 mg/mL, e 0,08 mg/mL.

4.5.3. Padronização do Inóculo e Inoculação

A padronização dos inóculos foi feita através da escala de McFarland, sendo realizada no mesmo dia do teste, fazendo também um padrão equivalente ao valor de 0,5 desta escala, que corresponde a mistura de 0,5 mL da solução de BaCl₂ 0,048 mol L⁻¹ e 99,5 mL da solução de H₂SO₄ a 1% (v/v), isso é relativo a uma suspensão que contém cerca de 1 a 2·10⁵ células mL⁻¹ de bactérias (NCCLS, 2003).

Uma alça de platina esterilizada foi utilizada para a inoculação das bactérias em tubos de ensaio, onde estará contida a solução salina estéril (0,9 m v⁻¹), que serão homogeneizados em vórtex. A fim de igualar a densidade óptica da solução a escala McFarland, usou-se a comparação visual, com o auxílio de uma folha branca com linhas contrastantes pretas (GHENOV, 2014). O próximo passo foi a diluição das bactérias em caldo Mueller Hinton, onde 2µL da solução salina padronizada com bactéria é adicionada a 19,8 mL de caldo. Essa solução foi adicionada posteriormente as microplacas.

A análise da concentração inibitória mínima obtida das amostras, que demonstrarem maior inibição será feita pelo método microdiluição em caldo, com base no protocolo da *Nature Protocols*, conforme descrito em Wiegand e seus colaboradores (2008).

4.5.4. Aplicação da amostra e dos Antibióticos nas placas

Será colocado nas microplacas, já estéreis de 96 poços, 50µL de caldo Mueller Hinton em todos os poços, em seguida em duplicata foram adicionadas as diluições do antibiótico. Em duplicata também foram adicionadas as diluições da suspensão do nano óxido de zinco, sintetizados por ambos fungos. Por último foi adicionado 50µL de solução com bactéria em todos os poços. Para o controle de esterilidade foi utilizado apenas caldo e para controle de crescimento apenas caldo com solução de bactérias. Ao final, foram depositadas em cada poço de cada placa 100µL de cada uma das soluções descritas acima

As placas inoculadas foram levadas para a leitura da absorbância no espectrofotômetro em 620nm e posteriormente incubadas em shaker a 60 rpm

e 37° C por 18 horas. Após o período de incubação, as placas são levadas para nova leitura de absorvância no espectrofotômetro, para comparação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

5.1.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV – EDS) da marca Zeiss, modelo EVO MA15, pertencente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, do Departamento Acadêmico de Engenharia Mecânica (DAEM).

As análises foram realizadas nas amostras sintetizadas pelos fungos *Trametes sp.* e *Aspergillus niger* e na amostra sintetizada quimicamente, para avaliação da morfologia das partículas de ZnO. Foram realizadas também as análises de EDS para determinação da composição química do produto, As imagens obtidas do MEV e os dados do EDS são mostrados no Quadro 1 e na Tabela 2, respectivamente.

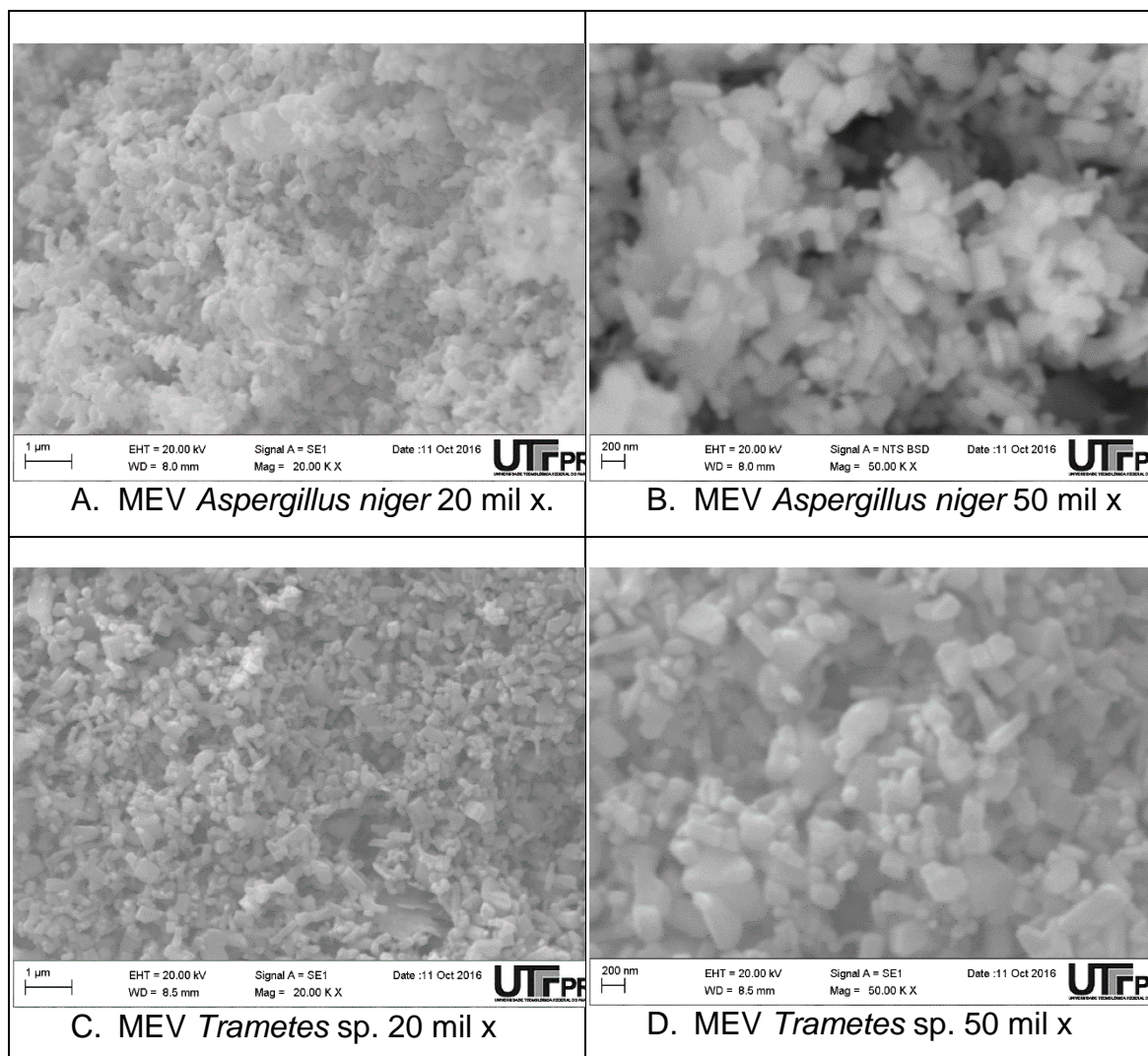
Ao analisar as imagens da microscopia eletrônica, foi possível observar que não houve homogeneidade morfológica das partículas sintetizadas, no entanto, nota-se que grande parte das nanopartículas apresentaram morfologia de bastões. A aparência das NPZnO sintetizadas por *A. niger* e *Trametes sp* é similar às NPZnO obtidas por Oliveira (2009).

Com relação ao tamanho das partículas biossintetizadas, observou-se em escala de comparação entre as fotomicrografias eletrônicas que muitas corresponderam ao tamanho nanométrico esperado, porém algumas outras partículas com tamanhos maiores estavam nas mesmas amostras, as quais não podem ser consideradas nanométricas. Essa característica pode estar relacionada a uma possível concentração desproporcional de óxido de zinco que foi colocada em contato com o extrato bruto fúngico, o qual continha as proteínas responsáveis pela síntese. A quantidade disponível de proteínas para a síntese talvez não fosse a ideal para uma conversão eficiente do ZnO em

NPZnO. Outros testes com variações da concentração inicial de óxido de zinco teriam que ser realizados para comprovação desse parâmetro se síntese.

Nas imagens de microscopia feitas da amostra sintetizada quimicamente, não foi possível a visualização clara das partículas, isso provavelmente se deve ao fato de as partículas serem muito pequenas e o alcance de aproximação do equipamento utilizado não ser suficiente para visualização. Essa constatação pode ser corroborada por Sangeetha et al. (2012), que utilizou o mesmo método de síntese química e obteve partículas de tamanhos de aproximadamente 25 nm. Sangeetha et al. (2012) também afirma que as NPZnO biosintetizadas, tiveram tamanho de aproximadamente 40 nm, o que não condiz com os resultados obtidos, já que as partículas obtidas tiveram tamanhos maiores. Já Jain et al. (2012) obteve resultados mais parecidos, onde suas partículas tiveram tamanhos entre 100 e 140 nm.

Quadro 1. Fotomicrografias obtidas por MEV das amostras de NPZnO sintetizadas quimicamente e biologicamente.



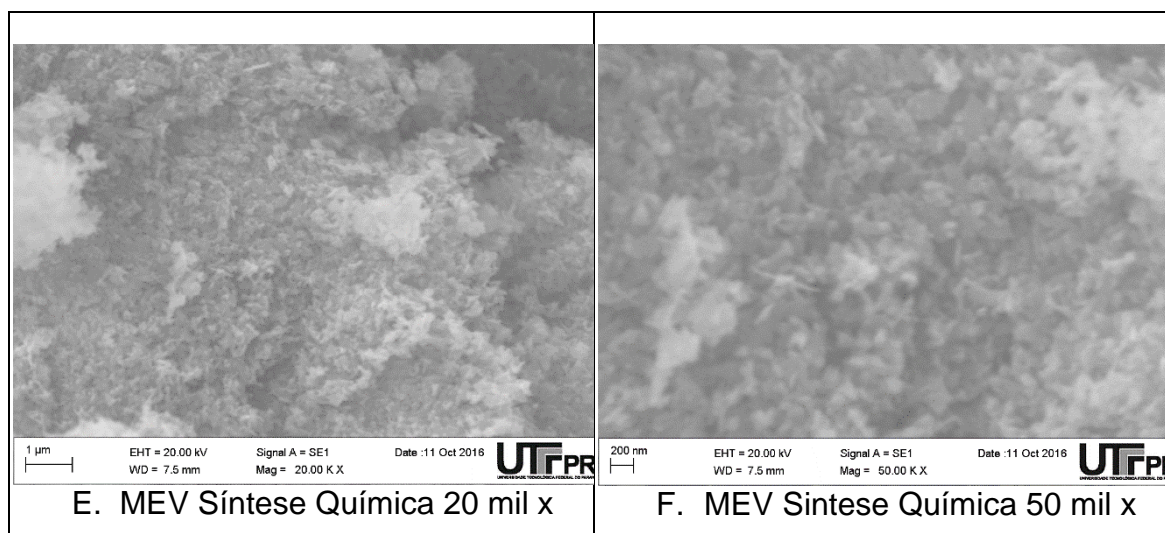


Tabela 2: Resultados da análise de composição elementar por MEV-EDS das amostras de NPZnO química e biossintetizadas.

Método de síntese	C	O	Zn	Al	Si	Total
NPZnO de <i>Aspergillus niger</i>	19,26	25,14	55,04	0,56	ND	100,0
NPZnO de <i>Trametes sp.</i>	10,36	23,27	66,03	0,35	ND	100,0
NPZnO Quimica	ND	30,98	67,06	0,46	1,50	100,0

ND – Não detectado

Em termos de comparação entre os fungos utilizados, ambos se mostraram promissores na síntese de NPZnO. Na literatura há registros de outras espécies de *Aspergillus* que haviam sido utilizadas em biossínteses e foram eficazes nesse papel, então havia uma expectativa de que a espécie *Aspergillus niger* também fosse eficiente na biossíntese. Com relação ao fungo do gênero *Trametes*, não foi encontrado até o momento qualquer registro na literatura de sua aplicação nessa área, entretanto ele também se mostrou efetivo na síntese das NPZnO neste trabalho.

Na análise de EDS, obtivemos também mais uma comprovação de que a composição da amostra era de óxido de zinco, pois se os elementos não estivessem ligados, eles iriam lixiviar no processo de lavagem da amostra. Assim, principalmente o nano óxido de zinco, insolúvel em água fica retido. É

importante observar que na amostra sintetizada quimicamente, não há presença de carbono, enquanto nas amostras biossintetizadas tem a presença do carbono, isso se deve ao fato de ainda haverem resquícios de meio de cultivo, células e proteínas remanescentes da biossíntese, apesar da lavagem.

A presença de Alumínio pode estar relacionada ao fato do uso de papel alumínio na hora de fazer a pesagem do óxido de zinco e também na utilização de instrumentos metálicos. A presença do silício, pode estar ligada a alguma pequena fonte de contaminação ou do próprio uso das vidrarias realizadas na síntese.

Na síntese química foi obtida a maior quantidade de produto, proporcionalmente falando, por apresentar maior quantidade de O e Zn. Já nas biossintetizadas, observa-se que o uso de *Trametes* sp. possibilitou uma maior quantidade de produto formado do que *Aspergillus niger*, onde este último mostrou também maior quantidade de matéria orgânica, representada por quantidades de carbono maiores do que as vistas na análise do produto de *Trametes* sp.

5.1.2 DIFRAÇÃO DE RAIOS X (DRX)

A análise de difração de raios X (DRX) dos catalisadores foi realizada em difratômetro da marca Shimadzu, modelo XDR-700, pertencente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, do Departamento Acadêmico de Engenharia Mecânica (DAEM).

Foram realizadas análises no difratômetro de raio x, em 2θ de num alcance de 15° a 75° , de todas as amostras realizadas, e os resultados obtidos podem ser visualizados nas Figuras 10 e 11..

A análise do DRX demonstrou que as partículas sintetizadas eram puras e cristalinas, todo os picos combinaram bem com a fase hexagonal que se era esperada para as NPZnO (estrutura wurtzita), em comparação com a base de dados padrão, ficha cristalográfica, JCPDS (897102). Não houve característica de picos de outras substancias senão o nano óxido de zinco. Os picos entre 30° e 40° indicam boa cristalinidade do produto obtido.

Figura 10: Difratoograma das NPZnO biossintetizadas por *Aspergillus niger* e sintetizadas quimicamente.

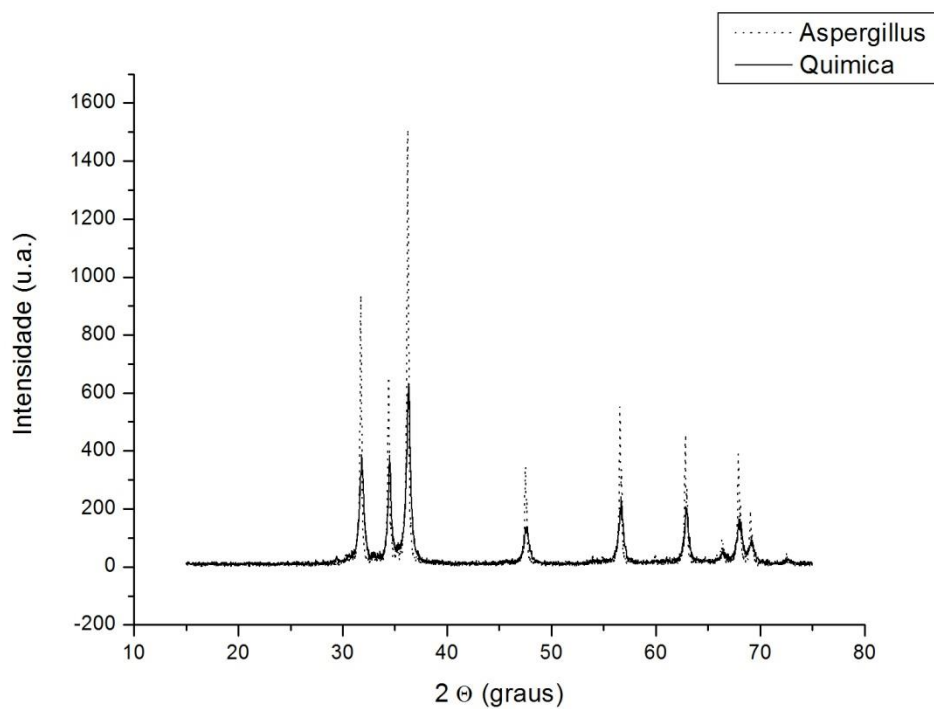
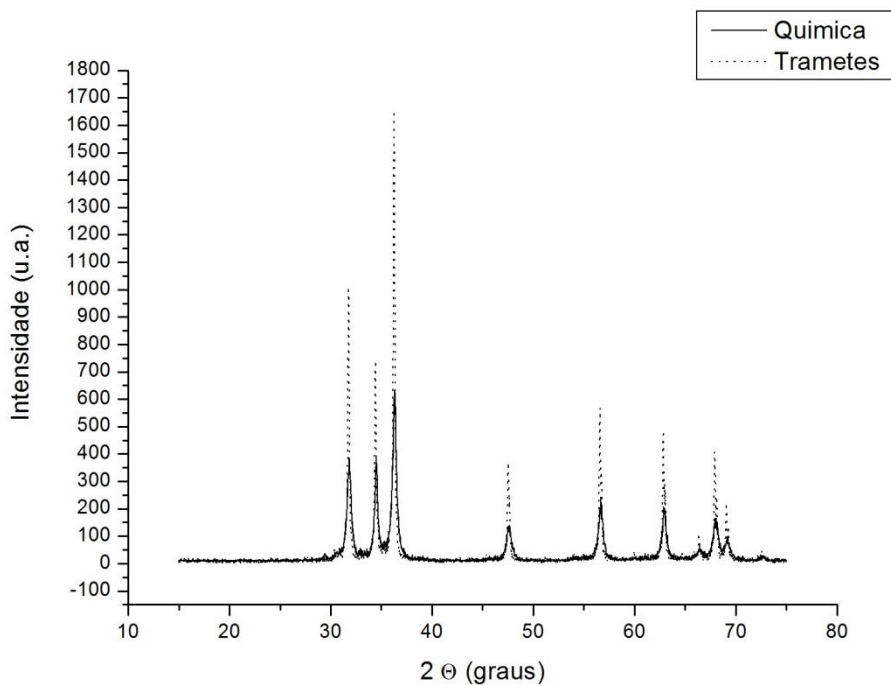


Figura 11: Difratoograma das NPZnO biossintetizadas por *Trametes* sp. e sintetizadas quimicamente.

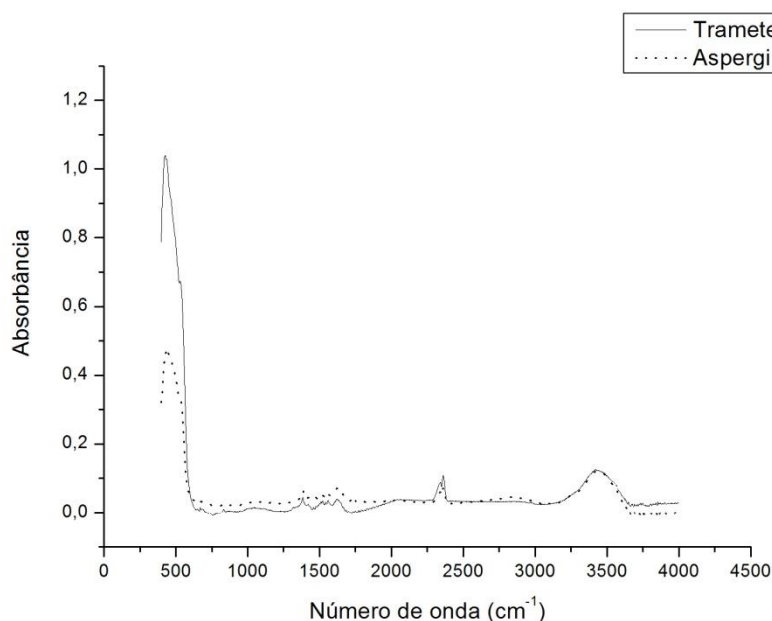


O alargamento dos picos está relacionado com o tamanho das partículas analisadas, sendo assim, quanto mais largo for um pico, menor será o tamanho das partículas (BECHERI et al. 2007). Observou-se assim que as menores partículas foram as sintetizadas quimicamente, como já se era previsto pelas análises de MEV. Conclui-se também que as partículas biossintetizadas por *Aspergillus niger*, são menores do que as sintetizadas por *Trametes* sp.

5.1.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (FTIR)

Foram realizadas também análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) a fim de detectar quais grupos funcionais estavam presentes na amostra. O gráfico com os resultados da análise encontra-se na Figura 12. As análises de FTIR foram executadas na Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, utilizando o espectrômetro Varian 640- IR, pertencente ao Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBi), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), como agente dispersante.

Figura 12: Gráfico de FTIR para NPZnO biossintetizadas por *Aspergillus niger* e *Trametes* sp.



A análise foi realizada na faixa de 400 – 4000 cm^{-1} para as duas amostras. Há presença de bandas largas características de ZnO, que indicam uma organização a curto alcance. A maioria das bandas presentes entre 1000 e 4000 cm^{-1} são características, principalmente, de água e grupos orgânicos. Já as vibrações menores que 1000 cm^{-1} , relacionam-se principalmente a grupos inorgânicos, o que inclui o Zn na rede.

É possível ver nos espectros uma banda larga, em torno de 3457 cm^{-1} que corresponde ao estiramento do OH, presente na água de hidratação nas amostras. Isso se deve ao fato das análises terem sido realizadas muito tempo depois de serem secas e também devido ao fato de não terem sido armazenadas em um dessecador. Há também bandas em torno de 1630 e 1425 cm^{-1} que representam as vibrações restantes das moléculas de água e também à ligação C-O, respectivamente. As bandas em torno de 400-420 cm^{-1} são atribuídas a ligação Zn-O, o que evidencia a formação do nanoóxido de zinco e indicam um certo grau de ordem a curto alcance do material.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes antimicrobianos foram realizados por diluição em caldo nas microplacas, que foram analisadas no espectrofotômetro e a partir destes então é que foi possível analisar os resultados de inibição. Os valores de concentração inibitória mínima (MIC) da amoxicilina para *Escherichia coli* foi de 4 mg/L e para *Staphylococcus aureus* foi de 8 mg/L.

As amostras de NPZnO sintetizadas por *Aspergillus niger* e *Trametes* sp. apresentaram inibição contra as duas espécies bacterianas testadas. O valor de MIC observado para *E. coli* foi de 5,2 mg/mL e para *S. aureus* de 41,6 mg/mL para ambas as amostras de NPZnO.

Não foram realizados teste antimicrobianos com as NPZnO quimicamente sintetizadas, pois já há dados na literatura que comprovam sua eficácia, sendo nosso foco principal nas nano partículas biossintetizadas, segundo Sangeetha et al. (2012), bem como também obteve sucesso com suas análises utilizando nano óxido de zinco biossintetizado.

Podemos verificar que houve maior eficácia na inibição do crescimento de *E. coli*, isso pode estar relacionado ao fato de ser uma bactéria

representante do grupo das Gram-negativas, apresentando composição de parede celular diferente de *S. aureus* a qual é uma bactéria Gram-positiva, entretanto esse fato deve ser melhor avaliado com outros testes.

Fica claro também como o aumento da concentração da suspensão de NPZnO é mais eficiente como agente antimicrobiano, o que provavelmente se da pela melhor difusão das nanopartículas no meio. Apesar disso, há uma inconsistência, já que por ser uma suspensão, as partículas acabam se depositando no fundo dos poços da microplaca, o que pode influenciar na sua atividade antimicrobiana, já que as partículas não ficam todas difusas pelo meio, e não tem um total de superfície de contato suficiente para uma melhor inibição do crescimento bacteriano.

O mais provável mecanismo de ação de partículas manométricas de óxidos metálicos envolve a ruptura da parede celular e membrana citoplasmática com uma taxa muito alta de geração de oxigênio superficial e, finalmente levando a morte celular do patógeno. É interessante salientar que o tamanho das nanopartículas influencia diretamente na eficácia das mesmas como agentes antimicrobianos, assim como aponta Sangeetha et al. (2012) e também Souza et al. (2014).

Entretanto, Brunner et al., (2006) diz que há pelo menos três mecanismos de ação para a toxicidade de nanopartículas de metais e óxidos desses metais. A primeira seria que as partículas de ZnO solubilizam e liberam íons de zinco, sendo este, o mecanismo mais citado e considerado mais importante, agindo com uma parcela ou total responsabilidade para a toxicidade do ZnO contra patógenos. A segunda é a possibilidade é a interação da superfície do material com o meio produzindo substâncias tóxicas como radicais livres ou oxigênios reativos. Uma terceira opção seria que a partícula ou sua superfície interage diretamente com a ruptura das células biológicas alvo (MA et al. 2012).

CONCLUSÃO

Neste trabalho, provamos que a biossíntese de nanopartículas de óxido de zinco pelos fungos *Aspergillus niger* e *Trametes* sp. é possível e efetiva, já que conseguimos obter resultados positivos nas análises de caracterização das mesmas, que evidenciaram seu tamanho nanométrico. Sendo essa uma alternativa limpa e ecologicamente sustentável em comparação com a síntese química, que pode gerar gasto de energia e dejetos tóxicos. Demonstrou-se também a elevada bioatividade das NPZnO biossintetizadas, através do estudo de sua atividade antimicrobiana. As NPZnO se mostraram efetivas na inibição do crescimento bacteriano, em especial de *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa. A elevada biotoxicidade das nanopartículas de tamanhos menores pode ser atribuída a maior superfície de contato em volumes médios.

Baseado na efetiva síntese de NPZnO, e na eficácia da atividade antimicrobiana da mesma, podemos concluir então que o nano óxido de zinco constitui um efetivo agente contra microrganismos patogênicos, e tem grande potencial para um futuro biocida comercial, sendo uma nova droga de importante reconhecimento contra a resistência microbiana às drogas atuais.

REFERÊNCIAS

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. 12^a edição. Porto Alegre: AMGH, 2012. 2079 p.

BRUST, M., m. walker, ET AL. Synthesis of Thiol-Derivatized Gold Nanoparticles in a 2-Phase Liquid-Liquid System. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, n.7, p. 801, 1994.

CAIAFFA, M. C. et al. Estudo biofarmacotécnico de cápsulas de amoxicilina. Análise comparativa de produtos industrializados e magistrais. Cinética de dissolução. *Revista Lecta*, v. 20, n. 1, p. 77-90, jan.-jun., 2002.

CASELLA, R. J.; PAULA, C. E. R. de.; ALMEIDA, V. G. K. Determinação espectrofotométrica de cefalexina em formulações farmacêuticas explorando a sua reação de transferência de carga com a quinalizarina. *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 914-919, 2010.

CASTRO, E. G. de. Nanopartículas de platina e seus nanocompósitos com nanotubos e outras formas de carbono: preparação, caracterização e propriedades. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. 2009

CHAKRABARTY, A. Nanotechnology: An Introduction. Delhi, IND: Rajat Publications, 2008. ProQuest ebrary. Web. 26 October 2015.

DAKHLAOU, A.; JENDOUBI, M.; SMIRI, L. S.; KANAIEV, A.; JOUINI, N. Synthesis, characterization and optical properties of ZnO nanoparticles with controlled size and morphology, *Journal of Crystal Growth* 311, 3989– 3996. 2009.

FAYAZ, A. M.; BALAJI, K.; KALAICHELVAN, P. T.; VENKATESAN, R. *Fungal based synthesis of silver nanoparticles: An effect of temperature on the size of particles*. *Biointerfaces*. (v) 74, p. 123–126. 2009.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotechnology: general aspects and potential applications in catalysis. *Quím. Nova*, v. 32, n.7, São Paulo-SP. 2009.

GAJBHIYE, M.; KESHARWANI, J.; INGLE, A.; GADE, A. and RAI, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (v) 5, p. 382–386. 2009.

GAZIT, Ehud. *Plenty of Room For Biology at the Bottom: An Introduction to Bionanotechnology*. Singapore, SGP: Imperial College Press, 2007.

GERICKE M, PINCHES A. *Biological synthesis of metal nanoparticles*. Hydrometallurgy 83:132–140, 2006a.

GERICKE M, PINCHES A. Microbial production of gold nanoparticles. *Gold Bull* 39:22–28, 2006b.

GHENOV, F. Avaliação *in vitro* das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de chá preto (*Camellia sinensis*) e dos cogumelos Shitake (*Pleurotus ostreatus*) e Shimeji (*Lentinula edodes*). Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Paraná, 2014.

GOLD, H. S.; MOELLERING JR., R.C. Antimicrobial-Drug Resistance. *The New England Journal of Medicine*, 1996.

GUNALAN S.; SIVARAJ R.; RAJENDRAN V. *Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens*. Progress in Natural Science: Materials International. Vol. 22, Ed. 6, 2012.

JAIN, N.; BHARGAVA, A.; TARAFDAR, J. A.; SINGH, S. K.; PANWAR, J. A biomimetic approach towards synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Applied microbiology and biotechnology*, 2012.

JONES, N.; RAY, B.; RANJIT, K. T.; MANNA, A. C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 279 (2008) 71–76.

KHARISSOVA, O. V.; DIAS, H. V. R.; KHARISOV, B. I.; PÉREZ, B. O.; PÉREZ V. M. J.; The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, vol. 31, no. 4, pp. 240–248, 2013.

KNOLL, B.; KEILMANN, F. Near-field probing of vibrational absorption for chemical microscopy. *Nature* 399 p.134-137. 1999.

KOROLKOVAS, A. FRANÇA, F. F. de A. C. de. Dicionário Terapêutico Guanabara. 21^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 724 p.

ONZI, G.A. *Nanochemistry-Synthesis in Diminishing Dimensions*. *Advanced Materials*, v.4, n.10, p.612-649, 1992.

KOPLIN, T. J.; SIEMONS, M.; OCÉN-VALÉNTIN, C.; SANDERS, D.; SIMON, U. Workflow for High Throughput Screening of Gas Sensing Materials. *Sensors* 2006, 6(4), 298-30.

MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. 12^a edição. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MURRAY, P. R.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A.; ROSENTHAL, K. B. *Medical Microbiology*. Ed. 2, Mosby, St. Louis, 1994.

Bhainsa KC, D'Souza SF (2006) Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids Surf B: Biointerf* 47:160–164

Shankar SS, Ahmad A, Pasricha R, Sastry M (2003a) Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. *J Mater Chem* 13:1822–1826

Bharde A, Rautaray D, Bansal V, Ahmad A, Sarkar I, Yusuf SM, Sanyal M, Sastry M (2006) Extracellular biosynthesis of magnetite using fungi. *Small* 2:135–141

Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Khan MI, Kumar R, Sastry M (2002) Extracellular synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *Chem Bio Chem* 3:461–463

Bansal V, Rautaray D, Ahmad A, Sastry M (2004) Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Materials Chem* 14:3303–3305

Ahmad A, Mukherjee P, Mandal D, Senapati S, Khan MI, Kumar R, Sastry M (2002) Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus *Fusarium oxysporum*. *J Am Chem Soc* 124:12108–12109

Bansal V, Poddar P, Ahmad A, Sastry M (2006) Room-temperature biosynthesis of ferroelectric barium titanate nanoparticles. *J Am Chem Soc* 128:11958–11963

Ahmad A, Senapati S, Khan MI, Kumar R, Sastry M (2005) Extra-/intracellular, biosynthesis of gold nanoparticles by an alkalotolerant fungus, *Trichothecium* sp. *J Biomed Nanotechnol* 1:47–53

Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, Parishcha R, Ajay PV, Alam M, Kumar R, Sastry M (2001) Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. *Nano Lett* 1:515–519

Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, Ramani R, Parischa R, Kumar PAV, Alam M, Sastry M, Kumar R (2001a) Bioreduction of AuCl_4^- ions by the fungus, *Verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed. *Angew Chem Int Ed* 40:3585–3588

Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Khan MI, Sastry M, Kumar R (2004) Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles: a novel biological approach. *Indian J Phys* 78A:101–105

Gericke M, Pinches A (2006a) Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy* 83:132–140

Kumar SA, Abyaneh MK, Gosavi SW, Kulkarni SK, Pasricha R, Ahmad A, Khan MI (2007a) Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO_3 . *Biotechnol Lett* 29:439–445

Bansal V, Rautaray D, Bharde A, Ahire K, Sanyal A, Ahmad A, Sastry M (2005) Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles. *J Mater Chem* 15:2583–2589

MOHANPURIA, P.; RANA, N.K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Res* 10:507–517. 2008.

MOLINA, M. A.; RAMOS, J. L.; ESPINOSA-URGEL, M. A two-partner secretion system is involved in seed and root colonization and iron uptake by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, vol. 8, no. 4, pp. 639–647, 2006.

MULVANEY, P. *Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles*. Langmuir 12 788. 1996.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard – Eighth. NCCLS document M2-A8, Pennsylvania, USA: Edition Wayne, 2003.

PAL, S. L.; JANA, U.; MANNA, P. K.; MOHANTA, G. P.; MANAVALAN, R. Nanoparticle: an overview of preparation and characterization. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, vol. 1, no. 6, pp. 228–234, 2011.

PANÁČEK, A.; KOLÁŘ, M.; VEČEŘOVÁ, R.; PRUCEK, R.; SOUKUPOVÁ, J.; KRYŠTOF, V.; HAMAL, P.; ZBOŘIL, R.; KVÍTEK, L. *Antifungal activity of silver nanoparticles against Candida spp.* Biomaterials 30 (2009) 6333–6340.

PATOLSKY, F.; WEIZMANN, Y.; WILLNER, I. Actin-based metallic nanowires as bio-nanotransporters. *Nat. Mater.* 3 , 692-695. (2004)

PATRA, J. K.; BAEK, K.H. Green Nanobiotechnology: Factors Affecting Synthesis and Characterization Techniques. *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, Article ID 417305, 12 pages, 2014.

PRASAD, T. N. V. K. V.; SUDHAKAR, P.; SREENIVASULU, Y. et al. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, vol. 35, no. 6, pp. 905–927, 2012.

RAI, R. V.; BAI, J. A. *Nanoparticles and their potential application as antimicrobials*. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.), 2011.

RAI, Mahendra. Tradução de Germana Barata e Diego Stéfani. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. *Cienc. Cult.* vol.65 no.3 São Paulo, 2013.

RAJAKUMAR, G.; RAHUMAN, A. A. ; ROOPAN, S. M.; KHANNA, V. G.; ELANGO, G. KAMARAJ, C.; ZAHIR, A. A.; VELAYUTHAM, K. Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. *Spectrochimica Acta Part A*, 91. p. 23-29. 2012.

RECHES, M.; GAZIT, E. *Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes*. *Science* 300, 2003. p. 625-627

SABIR, S.; ARSHAD, M.; CHAUDHARI, S. K. Zinc Oxide Nanoparticles for Revolutionizing Agriculture: Synthesis and Applications. *The Scientific World Journal*, vol. 2014, Article ID 925494, 8 pages, 2014.

SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 54, 2003. p.177–182.

STANKIC ET AL. Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties. *Journal of nanobiotechnology*. 2016.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5ª edição. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TURNER, A. *Nanotechnology an Introduction*. Chandigarh, IND: Abhisek Publications, 2008. ProQuest ebrary. Web. 26 October 2015.

VAHABI, K.; MANSOORI, G. A.; KARIMI, S. 2011. *Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus Trichoderma reesei*. (A Route for Large-Scale Production of AgNPs). *Insciences J.*, 1(1), p. 65-79.

VOGEL, J. F.; JUNG, Fe. T. *Nanotechnology*. New York, NY, USA: Nova, 2009. ProQuest ebrary. Web. 26 October 2015.

WANG, X.; DING, Y.; SUMMERS, C. J.; WANG, Z. L. Large-scale synthesis of six-nanometer-wide ZnO nanobelts. *Journal of Physical Chemistry B*, vol. 108, no. 26, pp. 8773–8777, 2004.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

Pure and multi metal oxide nanoparticles: synthesis, antibacterial and cytotoxic properties

Shamsuzzaman, et al., Biological synthesis of ZnO nanoparticles using *C. albicans* and studying their catalytic performance in the synthesis of steroidal pyrazolines. *Arabian Journal of Chemistry* (2013),

CHENG, B.; SAMULSKI, E.T.; **Hydrothermal synthesis of one-dimensional ZnO nanostructures with different aspect ratios**, *Chemical Communications*, 986, 2004. BECHERI, A., DÜRR, M., LO NOSTRO, P. et al. *J Nanopart Res* (2008) 10: 679. doi:10.1007/s11051-007-9318-3

BRUNNER, T.J., WICK, P., MANSER, P., SPOHN, P., GRASS, R.N., LIMBACH, L.K., BRUININK, A., STARK, W.J., 2006. **In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility**. *Environmental Science & Technology* 40 (14), 4374e4381.