

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

DIEGO FERNANDO SUÁREZ PEÑARANDA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES  
NANOPARTICULADAS NA BASE DE ÓXIDO DE ZINCO E  
POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PARA A LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE ANTIMICROBIANOS**

Belo Horizonte 2017

UFMG/ICEx/DQ 1214<sup>a</sup>

T 545<sup>a</sup>

DIEGO FERNANDO SUÁREZ PEÑARANDA

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MATRIZES  
NANOPARTICULADAS NA BASE DE ÓXIDO DE ZINCO E  
POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS PARA A LIBERAÇÃO  
CONTROLADA DE ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências-Química

Belo Horizonte 2017

S939p  
2017  
T

Suarez Peñaranda, Diego Fernando

Preparação e caracterização de matrizes nanoparticuladas na base de óxido de zinco e polímeros biodegradáveis para a liberação controlada de antimicrobianos [manuscrito] / Diego Fernando Suarez Peñaranda. 2017.

[xix], 106 f.: il.

Orientador: Rubén Dario Sinisterra Millán.

Coorientadora: Luzia Valentina Modolo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.

Inclui bibliografia.

1. Química inorgânica - Teses 2. Preparações de liberação controlada - Teses 3. Materiais nanoestruturados - Teses 4. Óxidos metálicos - Teses 5. Agentes antibacterianos - Teses 6. Compostos de zinco - Teses 7. Cúrcuma - Teses 8. Fibras - Teses I. Sinisterra Millán, Rubén Dario, Orientador II. Modolo, Luzia Valentina, Coorientadora III. Título.

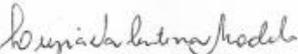
CDU 043

**"Preparação e Caracterização de Matrizes Nanoparticuladas na Base de Óxido de Zinco e Polímeros Biodegradáveis para a Liberação Controlada de Antimicrobianos"**

**Diego Fernando Suarez Peñaranda**

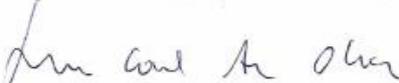
Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

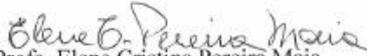
  
Prof. Rubén Dario Sinisterra Millán - Orientador  
UFMG

  
Prof. Luzia Valentina Modolo - Coorientadora  
UFMG/ICB

  
Prof. Flávia Cavaleri Machado  
UFJF

  
Prof. Luiz Fernando Cappa de Oliveira  
UFJF

  
Prof. Luiz Carlos Alves de Oliveira  
UFMG

  
Prof. Elenc Cristina Pereira Maia  
UFMG

Belo Horizonte, 05 de maio de 2017.

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Prof. Dr. Rubén Dario Sinisterra Millán e a co-orientação da Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo.

## AGRADECIMENTOS

- Ao professor Dr. Rubén Dario Sinisterra pela orientação dedicação e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.
- À professora Dra. Luzia Valentina Modolo pela co-orientação confiança e ajuda sempre oportuna durante estes 4 anos.
- À professora. Dra. Maria Esperanza Cortés da Faculdade de Odontologia da UFMG pelo auxílio na realização dos ensaios microbiológicos e ajuda sempre oportuna.
- Aos Professores Klaus Krambrock e Luiz Curie do Departamento de Física da UFMG pela ajuda e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Professor Dr Ricardo Orlando pela ajuda e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio Financeiro.
- Ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG pelo suporte durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Aos funcionários do Departamento de Química da UFMG pelo apoio e atenção, em especial a todos os profissionais da Secretária de Pós-Graduação em Química.
- A todos os amigos do Laboratório de Encapsulamento Molecular e Biomateriais, Ricardo, Ana Paula, Ana Delia e Michele pelas indispensáveis ajudas e excelente convivência dentro e fora do ambiente de trabalho.
- A toda minha família Yolanda, Luis Gabriel, Marcela, Sara Sofia, Gabriel e Carlos Arturo pelo constante incentivo, apoio e compreensão.
- A Michele Resende pela colaboração e companhia durante esta longa caminhada.
- Aos colegas do Departamento de Física Daniele, Bruno, Frederico e Soldado pela ajuda e aportes durante o desenvolvimento da parte experimental.
- A meus Colegas Ricardo, Juan Felipe, Luis Eduardo, Andrés, Jesus, Carolina pela ajuda e apoio durante estes quatro anos de estudo.
- A Lenka Tamayo pela valiosa colaboração durante a edição e correção deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1</b>	<b>1</b>
<b>1.0 Introdução e Revisão de Literatura</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Sistemas de liberação controlada de uso agrícola</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Nanopartículas metálicas</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Óxido de zinco (ZnO)</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1 Síntese Sol-Gel</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2 Síntese hidrotérmica</b>	<b>7</b>
<b>1.3.3 Síntese hidrotérmica assistida por microondas</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Nanopartículas poliméricas</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Nanofibras poliméricas</b>	<b>10</b>
<b>1.6 Motivações deste trabalho</b>	<b>11</b>
<b>Objetivos</b>	<b>13</b>
<b>1.7 Objetivos gerais</b>	<b>13</b>
<b>1.8 Objetivos específicos</b>	<b>13</b>
<b>Capítulo 2 Materiais e Métodos</b>	<b>14</b>
<b>Nitrato de zinco hexahidratado</b>	<b>14</b>
<b>Acetato de zinco dihidratado</b>	<b>14</b>
<b>Hidróxido de sódio</b>	<b>14</b>
<b>Doxiciclina</b>	<b>14</b>
<b>Álcool etílico</b>	<b>15</b>
<b>Curcumina</b>	<b>15</b>
<b>Amido</b>	<b>15</b>
<b>Alginato de sódio</b>	<b>15</b>

<b>Quitosana</b>	15
<b>Policaprolactona</b>	16
<b>Gelatina</b>	16
<b>Cloreto de cálcio</b>	16
<b>Outros reagentes</b>	16
<b>2.1 Preparação nanopartículas de óxido de zinco (ZnO)</b>	16
<b>2.1.2 Síntese sol-gel</b>	17
<b>2.1.3 Síntese hidrotérmica</b>	17
<b>2.1.4 Síntese hidrotérmica assistida por microondas</b>	17
<b>2.1.5 Tratamento térmico redutor</b>	17
<b>2.2 Caracterizações físicoquímicas</b>	18
<b>2.2.1 Difração de raios X</b>	18
<b>2.2.2 Espectroscopia Raman</b>	18
<b>2.2.3 Área de superfície e porosidade de partícula</b>	18
<b>2.2.4 Espectroscopia de refletância na região UV-Vis</b>	19
<b>2.2.5 Medidas de fotoluminescência</b>	19
<b>2.2.6 Ressonância paramagnética eletrônica</b>	19
<b>2.2.7 Dispersão eletroforética de luz</b>	20
<b>2.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão</b>	20
<b>2.2.9 Testes adsorção de doxiciclina</b>	20
<b>2.2.10 Testes microbiológicos</b>	21
<b>2.2.11 Atividade antimicrobiana e cinética de morte</b>	22
<b>2.3 Métodos de preparo solução sólida amido-curcumina</b>	22
<b>2.3.1 Secagem por aspersão da solução sólida amido-curcumina</b>	22
<b>2.3.2 Preparação de nanopartículas alginato-quitosana carregando curcumina</b>	22

<b>2.3.3 Liofilização de amostras</b>	23
<b>2.3.4 Preparação nanofibras</b>	23
<b>2.4 Caracterização físicoquímica</b>	24
<b>2.4.1 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho</b>	24
<b>2.4.2 Análise térmica</b>	24
<b>2.4.3 Difração de raios X</b>	24
<b>2.4.4 Medidas de tamanho por espalhamento de luz</b>	25
<b>2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura</b>	25
<b>2.4.6 Espectroscopia de absorção na região de UV-Vis</b>	25
<b>2.4.7 Ensaio microbiológicos</b>	26
<b>Capítulo 3 Síntese caracterização físico-química e avaliação microbiológica de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO)</b>	27
<b>3.0 Caracterização físicoquímica</b>	27
<b>3.1 Difração de raios X</b>	27
<b>3.1.2 Espectroscopia Raman</b>	28
<b>3.1.3 Tamanho e morfologia</b>	30
<b>3.1.4 Área específica BET</b>	34
<b>3.1.5 Distribuição de poros</b>	35
<b>3.1.6 Espectroscopia de refletância difusa</b>	37
<b>3.1.7 Cálculos dos “band gaps”</b>	38
<b>3.2 Estudo de fotoluminescência</b>	40
<b>3.3 Ressonância paramagnética eletrônica</b>	42
<b>3.4 EPR “Spin-trap”</b>	43
<b>3.5 Avaliação microbiológica</b>	46
<b>3.6 Adsorção e dessorção de Doxiciclina</b>	50

<b>3.7 Cinética antimicrobiana</b>	55
<b>Capítulo 4 Preparação e caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas carregadoras de curcumina</b>	56
<b>4.1 Caracterização físicoquímica dos materiais de partida</b>	56
<b>4.1.1 Análise térmica</b>	56
<b>4.1.2 Espectroscopia na região de infravermelho</b>	59
<b>4.1.3 Difração de raios X</b>	61
<b>4.2 Sistema nanoparticulado alginato-quitosana carregando curcumina</b>	63
<b>4.2.1 Análise térmica</b>	63
<b>4.2.2 Espectroscopia na região de infravermelho</b>	67
<b>4.2.3 Difração de raios X</b>	69
<b>4.3 Estudos de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico</b>	71
<b>4.4 Encapsulamento de curcumina</b>	74
<b>4.5 Cinéticas de liberação</b>	74
<b>4.6 Avaliação microbiológica</b>	76
<b>Capítulo 5 Preparação caracterização físico-química e avaliação microbiológica de nanofibras poliméricas carregando curcumina</b>	78
<b>5.0 Caracterização físicoquímica dos materiais de partida</b>	78
<b>5.1 Caracterização físicoquímica de policaprolactona</b>	78
<b>5.2 Caracterização físicoquímica de gelatina</b>	81
<b>5.3 Caracterização físicoquímica das nanofibras poliméricas</b>	82
<b>5.4 Caracterização morfológica</b>	88
<b>5.5 Cinéticas de liberação</b>	92
<b>5.6 Avaliação microbiológica</b>	94

<b>Conclusões</b>	99
<b>Perspectivas</b>	100
<b>Referencias bibliográficas</b>	101

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b>	Número de patentes e artigos publicados classificados por sistemas e países no ano 1995-2012 adaptado do trabalho de Gogos et al. 2012.	4
<b>Figura 2</b>	Estrutura química da doxiciclina.	14
<b>Figura 3</b>	Estrutura molecular da quitosana.	16
<b>Figura 4</b>	Difratogramas de raios X de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico redutor.	27
<b>Figura 5</b>	Espectros de Raman de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) dos métodos de síntese sol-gel e hidrotérmico.	29
<b>Figura 6</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelo método de sol-gel.	30
<b>Figura 7</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelo método hidrotérmico.	31
<b>Figura 8</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ZnO sintetizadas pelo método hidrotérmico assistido por microondas.	33
<b>Figura 9</b>	Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.	34
<b>Figura 10</b>	Perfil de porosidade de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sínteses sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.	36
<b>Figura 11</b>	Espectros de refletância difusa de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico, com e sem tratamento térmico.	38
<b>Figura 12</b>	Função Tauc-Davies e valores de “band gap” de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.	39
<b>Figura 13</b>	Fotoluminescência de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.	40
<b>Figura 14</b>	Espectro de ressonância paramagnética eletrônica de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.	42
<b>Figura 15</b>	Espectro de EPR das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico em água-etanol e PBN em diferentes tempos de iluminação	44

<b>Figura 16</b>	Cinética de produção de aduto PBN-OH• em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico.	45
<b>Figura 17</b>	Cinética e produção de aduto TEMP - <sup>1</sup> O <sub>2</sub> de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico.	46
<b>Figura 18</b>	Curvas de adsorção de doxiciclina em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico.	51
<b>Figura 19</b>	Curvas de liberação de doxiciclina usando como matrizes nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de síntese sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.	53
<b>Figura 20</b>	Perfil de liberação de doxiciclina de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ajustado com o modelo de Higuchi.	54
<b>Figura 21</b>	Curvas de morte das bactérias <i>E. carotovora</i> e <i>Pantoea sp</i> usando nanopartículas de ZnO-doxiciclina.	55
<b>Figura 22</b>	Curvas TG, DTG e DTA de curcumina em N <sub>2</sub> .	57
<b>Figura 23</b>	Curvas TG, DTG e DTA de amido em N <sub>2</sub> .	57
<b>Figura 24</b>	Curvas TG DTG e DTA de amido-curcumina em N <sub>2</sub> .	58
<b>Figura 25</b>	Comparação das curvas TG e DTA de amido (Am), Amido-curcumina (Am-Cur) e curcumina pura (Cur).	59
<b>Figura 26</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho de curcumina.	60
<b>Figura 27</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho de amido.	60
<b>Figura 28</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho amido-curcumina.	61
<b>Figura 29</b>	Difratograma de curcumina.	62
<b>Figura 30</b>	Difratograma de raios X de amido.	62
<b>Figura 31</b>	Difratograma de raios X de amido-curcumina.	63
<b>Figura 32</b>	Curvas TG, DTG e DTA de alginato em N <sub>2</sub> .	64
<b>Figura 33</b>	Curvas TG, DTG, DTA de quitosana em N <sub>2</sub> .	65
<b>Figura 34</b>	Curvas TG, das nanopartículas alginato-quitosana (Nps), nanopartículas branco (Nps branco) e mistura física (MF).	66
<b>Figura 35</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho de alginato de sódio.	67
<b>Figura 36</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho de quitosana.	68

<b>Figura 37</b>	Comparação dos espectros de absorção de infravermelho de Nps alginato-quitosana, Nps branco e solução solida amido-curcumina.	69
<b>Figura 38</b>	Difratograma de raios X de alginato.	70
<b>Figura 39</b>	Difratograma de raios X de quitosana.	70
<b>Figura 40</b>	Comparação difratograma de raios X de nanopartículas de alginato-quitosana Nps, nanopartículas branco Nps branco e solução solida amido-curcumina (Am-Cur).	71
<b>Figura 41</b>	Distribuição do tamanho das nanopartículas branco alginato-CaCl <sub>2</sub> + Poli-L-Lisina.	72
<b>Figura 42</b>	Distribuição do tamanho das Nanopartículas branco alginato-CaCl <sub>2</sub> + quitosana.	72
<b>Figura 43</b>	Distribuição do tamanho das NPs alginato-CaCl <sub>2</sub> + amido-curcumina+ quitosana.	73
<b>Figura 44</b>	Cinéticas de liberação de curcumina de nanopartículas de alginato-quitosana em pH ácido e neutro.	74
<b>Figura 45</b>	Cinéticas de liberação de Nps de alginato-quitosana ajustadas ao modelo de Higuchi.	76
<b>Figura 46</b>	Porcentagem de inibição do crescimento das bactérias E. Coli e S. aureus usando curcumina, amido-curcumina e Nps carregando amido curcumina a 500 µg·mL <sup>-1</sup> .	77
<b>Figura 47</b>	Curvas TG, DTG e DTA policaprolactona em N <sub>2</sub>	79
<b>Figura 48</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho da policaprolactona.	80
<b>Figura 49</b>	Difratograma de raios X de policaprolactona.	80
<b>Figura 50</b>	Curvas TG, DTA e DTG da gelatina em atmósfera de N <sub>2</sub>	81
<b>Figura 51</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho da gelatina.	82
<b>Figura 52</b>	Difratograma de raios x de gelatina.	82
<b>Figura 53</b>	Curvas TG de PCI-curcumina (PCI-Cur), PCI-alginato (PCI-Alg), fibra concêntrica PCI-alginato (Con PCI-Alg), fibra concêntrica PCI-gelatina (PCI-Gel).	83
<b>Figura 54</b>	Curvas DTG de PCI, gelatina , alginato e fibras concêntricas PCI gelatina e PCI alginato.	84
<b>Figura 55</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho de PCI, curcumina e fibra PCI-curcumina	85
<b>Figura 56</b>	Espectro de absorção na região de infravermelho de alginato, PCI, fibra PCI-alginato e fibra concêntrica PCI-alginato.	86
<b>Figura 57</b>	Espectros de absorção na região de infravermelho de alginato, Policaprolactona, gelatina e fibra concêntrica PCI-gelatina.	87
<b>Figura 58</b>	Difratograma de raios X das fibras PCI-curcumina (PCI-Cur), PCI-alginato (PCI-Alg) e fibra concêntrica PCI-Gelatina (Con PCI-Gel).	88
<b>Figura 59</b>	Morfologia e distribuição de tamanho de fibra PCI-curcumina.	89

<b>Figura 60</b>	Morfologia e distribuição de tamanho da fibra policaprolactona-alginato (PCI-Alg).	90
<b>Figura 61</b>	Morfologia e distribuição do tamanho da fibra concêntrica policaprolactona-alginato.	91
<b>Figura 62</b>	Morfologia e distribuição de tamanho da fibra concêntrica policaprolactona-gelatina.	92
<b>Figura 63</b>	Cinéticas de liberação das fibras policaprolactona curcumina (PCI-Cur), policaprolactona-alginato (PCI-Alg), fibra concêntrica policaprolactona-alginato (Con PCI-Alg) e fibra concêntrica policaprolactona gelatina (Com PCI-Gel).	93
<b>Figura 64</b>	Porcentagem de inibição do crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> usando as fibras PCI-curcumina, PCI-alginato, concêntrica PCI-alginato e concêntrica PCI gelatina.	94

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b>	Condições usadas na preparação das nanofibras.	24
<b>Tabela 2</b>	Tamanhos dos cristalitos de nanopartículas óxido de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico.	28
<b>Tabela 3</b>	Halo de inibição (mm) das bactérias <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. carotovora</i> e <i>Pantoea sp</i> usando nanopartículas de óxido zinco (ZnO) ( $25 \text{ mg.ml}^{-1}$ )	46
<b>Tabela 4</b>	Concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas de ZnO com e sem tratamento térmico, durante 4 horas de iluminação com luz UV frente as bacterias <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. carotovora</i> e <i>Pantoea sp</i> .	48
<b>Tabela 5</b>	<i>Potencial Z de nanopartículas de ZnO antes e depois da carga de doxiciclina.</i>	52
<b>Tabela 6</b>	Eventos térmicos de nanopartículas e alginato-quitosana (Nps), nanopartículas branco (Nps branco), mistura física (MF).	66
<b>Tabela 7</b>	Eventos térmicos das fibras obtidas por eletrofiação.	83

### Lista de Abreviaturas

Alg	Alginato
Am	Amido
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BC	Banda de condução
°C	Grau centigrado
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cur	Curcumina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
DLS	Espalhamento de luz
Embrapa	Empresa Brasileira de pesquisa agropecuária
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
ERO	Espécies reativas de oxigênio
eV	Elétron-volt
FDA	Food and Drug Administration
g	constante giromagnética
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K	Kelvin
MF	Mistura Física
MIC	Mínima Concentração Inibitória
Nps	Nanopartícula
O <sub>D</sub>	Densidade ótica
PBN	N-ter-butil- $\alpha$ -fenil-nitrona
PCI	Policaprolactona
PEO	Óxido de polietileno
pH	Inverso do logaritmo da concentração de Hidrogênio
pK <sub>a</sub>	cologaritmo do K <sub>a</sub>
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

P/V	Peso/Volume
PVA	Álcool polivinílico
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Sódio dodecil sulfato
TG	Análise termogravimétrica
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta- Visível
$\lambda_{em}$	Comprimento de onda de emissão
$\lambda_{ex}$	Comprimento de onda de excitação

# Preparação e caracterização de Matrizes Nanoparticuladas na Base de Óxido de Zinco e Polímeros Biodegradáveis para a Liberação Controlada de Antimicrobianos

## Resumo

No presente trabalho foram desenvolvidos três sistemas de liberação controlada de antimicrobianos de interesse agrícola, como nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) carregando doxiciclina, nanopartículas de alginato-quitosana carregando curcumina e nanofibras poliméricas de policaprolactona-alginato e gelatina carregando curcumina. A atividade antimicrobiana e as cinéticas de liberação foram avaliadas em cada um dos sistemas estudados.

Foram sintetizadas e caracterizadas nanopartículas de óxido de Zinco (ZnO) pelos métodos sol-gel, hidrotérmico e hidrotérmico assistido por microondas. Os compostos foram testados frente as bactérias *E. carotovora*, *Pantoea sp*, *E. coli* e *S. aureus*, apresentando ação antimicrobiana. O efeito antimicrobiano também foi avaliado por efeito fotocatalítico, onde foi evidenciada a eficiência do tratamento pela formação de defeitos na superfície como vacâncias de oxigênio e zinco intersticial. Estudos de EPR “spin trap” demonstraram a relação entre densidade de defeitos de superfície e produção de radicais livre como radical hidroxila.

Os estudos de absorção e desorção de doxiciclina nas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) mostraram a eficiência da matriz como plataforma de liberação controlada de fármacos catiônicos como doxiciclina.

As nanopartículas poliméricas alginato-quitosana carregando curcumina apresentaram tamanhos de partícula entre 125 e 500 nm. Foram avaliadas frente as bactérias *E. coli* e *S. aureus* não apresentando atividade antimicrobiana. Os estudos de liberação de curcumina mostraram dependência de pH.

As nanofibras poliméricas obtidas apresentaram diâmetros entre 215 – 1000 nm. O recobrimento da fibra concêntrica policaprolactona-alginato prolongou o tempo de liberação “*in vitro*” da curcumina. As fibras poliméricas não revelaram ação antimicrobiana nas bactérias testadas.

**Palavras chaves:** nanopartículas de óxido de Zinco, nanopartículas poliméricas alginato-quitosana, nanofibras poliméricas, antimicrobiano.

## Characterization and Preparation of Zinc Oxide Based Nanoparticles Matrix and Biodegradable Polymers for Controlled Antimicrobial Release.

### Abstract

In the present work three systems of controlled release of doxycycline and curcumin for agricultural use were developed as nanoparticles of zinc oxide (ZnO) carrying doxycycline, alginate-chitosan nanoparticles carrying curcuma and polymeric nanofibers of polycaprolactone-alginate and gelatin carrying curcuma. The antimicrobial activity and release kinetics were evaluated in each system under study.

Nanoparticles of zinc oxide (ZnO) were prepared and characterized by microwave-assisted sol-gel, hydrothermal methods. The compounds were tested against the bacteria *E. carotovora*, *Pantoea sp*, *E. coli* and *S. aureus* that exhibited antimicrobial action. The antimicrobial effect was also evaluated by photocatalytic effect, where the efficiency of the treatment was evidenced by the formation of surface defects such as oxygen and interstitial zinc vacancies. EPR "Spin Trap" studies have demonstrated the relationship between surface defect density and free radical production as the hydroxyl radical.

Studies of doxycycline desorption uptake in zinc oxide (ZnO) nanoparticles have shown matrix efficiency as a platform for the controlled release of cationic drugs such as doxycycline.

The alginate-chitosan polymer nanoparticles carrying curcuma had particle sizes between 125 and 500 nm. They were assessed against the *E. coli* and *S. aureus* bacteria that exhibited no antimicrobial activity. The release studies showed pH dependence.

The obtained polymer nano-fibers had diameters between 215-1000 nm. Coating of polycaprolactone-alginate concentric fiber extended the in vitro release time of curcuma. The polymer fibers exhibited no antimicrobial action on the tested bacteria.

**Key words:** Zinc oxide nanoparticles, alginate-chitosan polymer nanoparticles, polymer nano-fibers, antimicrobial.

# Capítulo 1

## 1. Introdução e Revisão da Literatura

A economia brasileira é uma das mais dinâmicas dos países emergentes, destacando-se pela massiva produção e exportação de alimentos. Em 2015 o desempenho do PIB agrícola mostrou um aumento de 1,8% alcançando valores de 450,3 bilhões contrastando com o pobre desempenho dos outros componentes da economia que mostraram uma contração de 3,8% no mesmo período (Novaes, 2016; Oliveira, 2017).

O aumento do PIB agropecuário representa 30 % do setor pecuário e 70% do setor agrícola respectivamente. Dentro do segmento agrícola destaca-se o setor das hortaliças com uma área plantada próxima a 815.000 hectares com produções estimadas em 23 milhões de toneladas que representam um valor no mercado de 14,21 bilhões de reais por ano (Nascimento and Tavares, 2011; Monteiro et al., 2014). A produção de hortaliças continua em expansão refletindo no uso intensivo de mão de obra, estimado em 3,8 emprego/hectare. Esse segmento da economia gera empregos diretos para 2 milhões de pessoas, constituindo-se numa das principais fontes de emprego no Brasil (Cleonice et al., 2016), embora o setor apresenta expectativas de crescimento tanto em áreas cultivadas como em produtividade.

Essa agroindústria enfrenta novos desafios como o controle de fitopatógenos que permitam manter a produtividade de forma eficiente e segura. De acordo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), atualmente o Brasil está classificado em alto risco em relação à ameaças fitossanitárias no setor de hortaliças, destacando-se doenças como a podridão mole, classificada como uma das enfermidades mais destrutivas que afetam a produção de hortaliças, legumes, frutas e ornamentais (Bhat et al., 2010).

Essa doença é causada por bactérias da família Enterobacteriaceae destacando-se *Erwinia carotovora*, responsável pela podridão mole da batata (Carvalho et al., 2008) e outras bactérias do género *Pantoea* sp que geram a podridão do bulbo em cebola, tubérculos e enfermidades como da mancha folhar em milho (Pérez-y-Terrón et al., 2009; Vahling-Armstrong et al., 2016).

O controle destas bactérias fitopatogênicas é dispendioso pela capacidade de adaptação destes patógenos em diferentes ambientes como água e solo, mantendo-se viáveis por longos períodos de tempo. A grande incidência destas doenças pode ocasionar perdas de aproximadamente 40% das lavouras e até 100% dos tubérculos estocados prontos para comercialização.

Diferentes estratégias têm sido usadas no controle dessas bacterioses como o uso de boas práticas culturais e sanitárias durante o período de produção das lavouras; também são recomendadas aplicações periódicas preventivas de antimicrobianos e fungicidas cúpricos tais como Agrimacin (Sulfato Tribásico de cobre+ oxitetraciclina) e Mycosheld que é uma Fórmula baseada em oxitetraciclina com registro e autorização do MAPA.

A eficiência destes tratamentos é baixa devido à localização dos patógenos nas lenticelas e tecido vascular das plantas infetadas, evitando o contato com o agente bactericida, fazendo o tratamento pouco eficiente no controle desta doença (Carvalho et al., 2008). Antibióticos como estreptomicina, gentamicina, ácido oxolínico e oxitetraciclina são de amplo uso na área agrícola destacando-se o setor de hortaliças e frutas (McManus and Stockwell, 2001; Stockwell and Duffy, 2012).

O alto consumo destes antibióticos vem sofrendo uma série de restrições, relacionadas com o efeito residual (bioacumulação), o alto custo e eventos de resistência. É importante salientar também que diferentes trabalhos relacionam o uso de antibióticos com casos de resistência em bactérias fitopatogênicas como *Erwinia amilovora*, *Pseudomonas cichorii*, *Pseudomonas syringae* e *Xanthomonas campestris* (McManus and Jones, 1994; McManus and Stockwell, 2001).

Além dos eventos de resistência, a aplicação de antibióticos baseadas nas Fórmulas convencionais gera outro tipo de problemas como inativação dos compostos ativos por processo de intemperismo, filtração e lixiviação que compromete a sustentabilidade do solo, microbiota e fontes de água (Fraceto et al., 2016).

Embora não existam dados precisos do consumo de antibiótico no setor agropecuário no mundo, estima-se que o consumo atual de antibióticos é de 64000 toneladas por ano, destacando-se o uso não terapêutico para crescimento de gado (70%), discrepando com as baixas porcentagens de uso agrônomico estimadas na faixa 0,2-0,4% do total consumido (O'Neill, 2015).

Atualmente no Brasil não existem estatísticas em relação ao consumo de antibióticos no setor agropecuário, no entanto estudos relatam alto consumo, de tetraciclina que são antibióticos considerados bacteriostáticos (Regitano and Leal, 2010). O modo de ação das tetraciclina baseia-se na ligação à sub- unidade 30S ribossomal que bloqueia a ligação com RNA, por tanto a síntese de proteínas nas bactérias tratadas. Os principais fármacos dos

grupos das tetraciclina são oxitetraciclina, doxiciclina e clortetraciclina (Borghi and Palma, 2014).

Além das tetraciclina encontra-se relatos na literatura de antimicrobianos naturais como a curcumina (Negi et al., 1999; Aggarwal et al., 2007). Sua atividade antimicrobiana está relacionada com a capacidade de bloquear o processo divisão do citoplasma, inibindo a ação da proteína FtsZ envolvida no processo de polimerização dos microtúbulos, como também a capacidade de perturbar as membranas plasmáticas (Rai et al., 2008; Tyagi et al., 2015). Relatos na literatura descrevem ação antimicrobiana usando curcumina frente a bactérias de alimentos e fungos fitopatogênicos, relacionada com a diminuição do fator de virulência das bactérias (Kim et al., 2003; Balbi-Peña et al., 2006; Rudrappa and Bais, 2008; Gul and Bakht, 2015).

O alto consumo de antibióticos no setor agropecuário está associado à resistência antimicrobiana cada vez mais recorrentes demonstrando uma necessidade de desenvolver novas estratégias de terapias nessa área. Dessa maneira, o presente trabalho visou o uso de antimicrobianos naturais e sintéticos como a curcumina e a doxiciclina, no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada frente a bactérias fitopatogênicas.

### **1.1 Sistemas de liberação controlada de uso agrícola**

A liberação controlada é definida como a transferência ou permeação regulada de um ingrediente ativo de um reservatório ou sistema, para o local de interesse.

O uso na agricultura destes sistemas tem ganhado relevância nos últimos anos, pelas claras vantagens frente às Fórmulações convencionais, tais como:

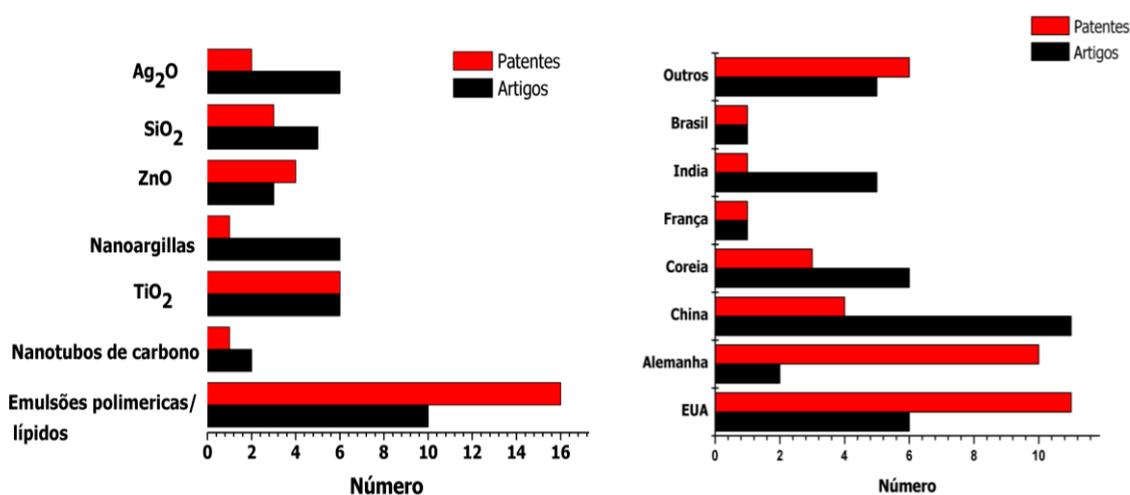
- A proteção de princípio ativo contra fatores ambientais,
- A manutenção constante na concentração do ingrediente ativo por períodos de tempo prolongados,
- A diminuição das doses,
- A redução de perdas por evaporação e lixiviação,
- A diminuição de eventos de fito-toxicidade e de resistência a antibióticos.

Matrizes nanoparticuladas (nanopartículas poliméricas, nanofibras poliméricas, nanotubos de carbono e óxidos metálicos nanoparticulados) podem ser usadas em diferentes áreas da agricultura como modificação genética de plantas, produção e proteção vegetal, melhoramento químico e físico do solo. Na área de proteção e produção vegetal são utilizadas

como plataformas na liberação de produtos como adubos, feromônios, pesticidas, fungicidas, herbicidas (Gogos et al., 2012; Fraceto et al., 2016; Maruyama et al., 2016).

Na proteção vegetal matrizes nanoparticuladas, permitem o ingresso de compostos ativos nos tecidos vegetais, através de estomas, lenticelas ou sistema radicular (Wang et al., 2016). O ingresso através dos estomas requer um tamanho promedio de 50 nm, o movimento através da rota apoplástica tem um tamanho de exclusão entre 5-20 nm e o transporte através da banda de caspari tamanhos  $\leq 10$  nm (Eichert et al., 2008; Ma et al., 2010; Aubert et al., 2012).

O uso desses sistemas tem despertado interesse, tendência que se vê refletida no número de patentes e artigos científicos publicados como apresentado na Figura 1.



**Figura 1** Número de patentes e artigos publicados, classificados por sistemas e países nos anos 1995-2012 adaptado do trabalho de Gogos et al. 2012.

Os maiores números de patentes depositadas estão classificados nas áreas de melhoramento físico e químico do solo, produção e proteção vegetal. Diferentes categorias estão incluídas na área de proteção vegetal como melhoramento da disponibilidade e estabilidade dos compostos ativos, o uso de novos agentes antimicrobianos, o uso de matrizes inertes para liberação controlada e prolongada dos agentes de proteção vegetal (Goverment, 2016).

Empresas multinacionais como “BASF Group”, “Shikefeng Chemistry”, “Suzhou Setek”, “Vive Crop Protection” e “Dow AgroSciences são os principais depositantes de patentes neste setor. Algumas famílias de patentes reivindicam o uso plataformas inorgânicas de silício e

zeólita carregando nanopartículas de prata como sistemas antimicrobianos como descrito na patente WO201362163A1. A Fundação para apoio da pesquisa da Universidade Central da Flórida reivindica o uso de uma Fórmula baseada em sílica carregando nanopartículas de cobre para o tratamento do câncer dos citros e fungos patogênicos como narrado na patente WO2010068275A1 (Swadeshmukul, 2010; Kwon, 2013).

Em geral, na área agrícola existem 128 famílias de patentes relacionadas com materiais nanoparticulados concentrando-se em sistemas para o melhoramento físico e químico do solo além de agentes de proteção vegetal. É importante ressaltar que atualmente o número de produtos no mercado é baixo em comparação com o número de patentes depositadas. A Empresa “Vivecrop”, comercializa Fórmulas de nanopartículas poliméricas carregando inseticidas e Fórmulas nanoparticuladas de fungicidas baseados em estrobilurina (protection, 2017).

Dos trabalhos relatados na literatura existem diferentes sistemas nanoparticulados de uso agrícola com escala compatível ao tecido vegetal. Dentre esses sistemas podemos citar as nanopartículas de óxido metálico, as nanopartículas poliméricas, as nanofibras poliméricas que são as estratégias empregadas neste trabalho.

## **1.2 Nanopartículas metálicas**

Nanopartículas metálicas como óxidos metálicos em escala nanométrica são definidos como estruturas em que pelo menos uma das suas dimensões (largura o comprimento) está na faixa de 1-100 nm (Auffan et al., 2009; Schmid and Fenske, 2010). Materiais nesta escala ostentam vários atributos em comparação com materiais não nanométricos com a mesma composição química, como maior área de superfície, maior energia de superfície e aumento das reações redox (Auffan et al., 2009; Phogat et al., 2016).

É conhecido que diversas partículas metálicas e óxidos metálicos apresentam efeito antimicrobiano, dentre elas se destacam as nanopartículas de prata, óxido de prata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), óxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ), óxido de cobre ( $\text{CuO}$ ), óxido de magnésio ( $\text{MgO}$ ) e óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ) (Dizaj et al., 2014).

Assim, o presente trabalho será focado na preparação de óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ) em razão das suas propriedades antimicrobianas, como também sua inocuidade pelo qual é considerado um material seguro e aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) órgão regulatório americano (Raghupathi et al., 2011; Administration, 2016).

### 1.3 Óxido de zinco (ZnO)

O óxido de zinco (ZnO) é definido como um semicondutor com características iônicas e covalentes, este material é considerado um dos mais versáteis devido às propriedades como: alta estabilidade química, amplo rango de absorção, amplo “band gap” de 3,37, estabilidade mecânica e térmica que permite aplicações optoeletrônicas (Kołodziejczak-Radzimska and Jesionowski, 2014) além da reconhecida atividade antifúngica (Mitra et al., 2011).

A atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) é associada por vários fatores físicos e químicos. Diferentes trabalhos descrevem a eficiência antimicrobiana por efeitos abrasivos das nanopartículas sobre as membranas plasmáticas, relacionando com menores tamanhos de partícula e com maior eficiência bactericida (Jones et al., 2008; Navale et al., 2015). O efeito abrasivo está relacionado com a morfologia da partícula encontrando-se maior efeito antimicrobiano em estruturas com formas de flores (Cai et al., 2016). Além do tamanho outro fator envolvido é o efeito tóxico de íons de  $Zn^{2+}$  que interagem com os clusteres de Ferro-enxofre, substituindo o ferro levando a quebra do cluster. A quebra do cluster inibe o transporte de elétrons, induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Lemire et al., 2013).

Devido a sua natureza como semicondutor as nanopartículas de óxido de Zinco (ZnO) possuem atividade antimicrobiana pela produção de espécies reativas de oxigênio; neste processo as nanopartículas irradiadas com uma fonte de luz UV, promovem a transferência de elétrons da banda de valência para a banda de condução, formando-se elétrons buracos com alto poder oxidante e elétrons na banda de condução com capacidade redutora que em conjunto com moléculas de água podem formar espécies reativas de oxigênio como radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (Kansal et al., 2008).

Estas espécies radicais são responsáveis pela quebra das moléculas de DNA e perda de fluidez da membrana que levam aos processos de peroxidação lipídica e finalmente processo de vazamentos de material citoplasmático (Liu et al., 2013). A eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio está relacionada pela densidade de defeitos de superfície nos óxidos metálicos, onde os defeitos funcionam como núcleos catalíticos promovendo reações de oxirredução permitindo a formação de diferentes espécies reativas de oxigênio (Pacchioni, 2003; Dutta et al., 2013; Lakshmi Prasanna and Vijayaraghavan, 2015).

Diferentes métodos de síntese são descritos na obtenção de nanopartículas de ZnO como deposição química de vapor, condensação molecular, ablação por laser, processo sonoquímico, rota sol-gel, síntese hidrotérmica e por último hidrotérmica assistida por microondas (Charitidis et al., 2014). Este trabalho estará focado principalmente nos métodos de síntese sol-gel, hidrotérmica e hidrotérmica assistida por microondas, porque são métodos que não precisam de uma infraestrutura complexa, são econômicos e ambientalmente aceitos.

Além das vantagens descritas anteriormente estes métodos permitem controlar parâmetros como morfologia e tamanho de partícula que são variáveis importantes para aplicações na área agrícola (Shandilya et al., 2016).

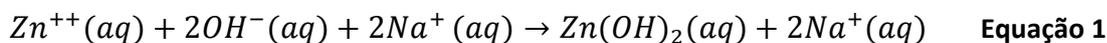
### **1.3.1 Síntese Sol-Gel**

O método de Sol-gel é usado na preparação de materiais inorgânicos e cerâmicos, partindo das misturas de precursores em solução que formam uma suspensão coloidal o “Sol” com dimensões na escala de 1 nm-1 µm. O sistema coloidal é formado por processos de hidrólise e poli-condensação de precursores como metal-alcóxidos. Na primeira etapa se faz uma solução dos precursores em água o solventes orgânicos miscíveis com água, permitindo o processo de hidrólise no qual se substituem grupos hidroxilo por grupos alcóxidos, seguido pela fase de condensação que leva à formação de um sistema coloidal, seguindo uma fase de desidratação do solvente e formação de um xerogel finalizando com a fase de calcinação (Danks et al., 2016).

### **1.3.2 Síntese Hidrotérmica**

Este método é definido como uma reação química que se produz quando o solvente usado é mantido em condições de temperaturas superiores ao ponto de ebulição e uma pressão maior que uma atmosfera. Dependendo dos solventes usados são classificados os métodos de síntese como hidrotérmica, amônio-termal, álcool-termal (Jensen, 2013). A síntese hidrotérmica explora as mudanças fundamentais da água quando submetida em condições de alta temperatura e pressão. Nestas condições o solvente experimenta mudanças físicoquímicas como decaimento da constante dielétrica, que permite a precipitação de compostos polares como sais metálicos, ocasionando saturação no sistema dando início ao processo de nucleação (Dunne et al., 2015).

Em este tipo de síntese precursores como cloreto, sulfato, nitrato, e acetato de zinco são precipitados a seu respectivo alcóxidos, com ajuda de bases como KOH, NaOH para gerar a fase de hidrólise seguido pela fase de desidratação como mostrado nas equações 1 e 2 (Bamiduro et al., 2014).



Durante a fase de desidratação acontece o processo de formação do cristal de óxido de zinco (ZnO), que está controlado por eventos de saturação do sistema e nucleação que ocorrem em forma simultânea. O modelo de crescimento do cristal é descrito de forma geral usando o modelo de Lemer para coloides monodispersos, onde a taxa de formação dos núcleos metálicos depende da taxa de saturação do sistema. O tamanho final da partícula depende da formação dos núcleos metálicos, que dependem do nível de saturação do sistema.

Em sistemas saturados o processo de nucleação é ativado até consumir os precursores precipitados formando núcleos de tamanhos pequenos. Quando os precursores são consumidos e a taxa de saturação diminui, o crescimento do cristal continua por outro processo, onde os pequenos núcleos metálicos remanecentes são acrescentados nos núcleos já existentes por um processo chamado de maturação de Oswald que levam a um aumento de tamanho (Dunne et al., 2015).

### **1.3.3. Síntese Hidrotérmica assistida por microondas**

A síntese hidrotérmica assistida por microondas, é um método rápido, econômico e sustentável usado para produzir nanopartículas inorgânicas em fase aquosa; este método usa o mesmo princípio da síntese hidrotérmica e se diferencia desta pelo mecanismo de aquecimento (Kharisov et al., 2012). As microondas são ondas eletromagnéticas com frequências na faixa de 0,3- 300 GHz com comprimentos de onda entre 1 mm – 1 m (Zhu and Chen, 2014). O mecanismo de aquecimento da radiação de microondas está sustentado em processos de polarização dipolar e condução, conseguindo aquecer qualquer tipo de material composto por cargas elétricas moveis como moléculas polares presentes em um solvente ou um sólido.

Durante o aquecimento de moléculas de água, as mesmas se orientam e se alinham com o campo magnético aplicado, mudando de direção com relação ao campo de 2,5 bilhões de vezes por segundo, provocando choques, giros e atrito entre elas, que aumentam a

temperatura do sistema por um curto período de tempo. Esse fenômeno permite um aquecimento rápido, uniforme e eficiente com a vantagem de que o aquecimento se faz diretamente sobre a solução dos materiais de partida. Esse processo se diferencia do método aquecimento por convecção-condução usado em reatores, que precisam primeiro do aquecimento das paredes do reator que transfere o calor das paredes aos reagentes em solução gerando gradientes de temperatura que perturbam uniformidade do tamanho nos materiais obtidos (Zhu and Chen, 2014).

As matrizes metálicas nanoparticuladas proporcionam amplas vantagens no setor agrícola nas áreas de produção e proteção de lavouras, mas ainda faltam estudos que determinem sua possível toxicidade. Nanopartículas de óxido de prata ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) e óxido de titânio IV ( $\text{TiO}_2$ ) podem-se acumular em tecidos vegetais e eventualmente se introduzir na cadeia alimentar. Para evitar esses riscos, atualmente estão sendo avaliadas nanopartículas poliméricas usando matrizes inócuas e baratas como amido, alginato e quitosana (de-Luque, 2014).

#### **1.4 Nanopartículas poliméricas**

Nanopartículas poliméricas são definidas como coloides, partículas sólidas com tamanho entre 100-1000 nm (Rao and Geckeler, 2011). Diferentes matrizes poliméricas têm sido usadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada no setor agrícola. Destacando-se o uso de polímeros biodegradáveis pelas diferentes vantagens como baixo custo, não apresentam toxicidade, como materiais de compostagem depois do processo de liberação, alta disponibilidade. Diferentes matrizes têm sido usadas na preparação de nanopartículas como amido, dextrano, celulose, goma arábica, pectinas, alginato e quitosana (Campos et al., 2015; Kashyap et al., 2015).

Hidrogeis de alginato-quitosana são matrizes usadas para liberação controlada de adubos, herbicidas, inseticidas e antimicrobianos. As características físico-químicas do alginato permitem o processo de gelação influenciado por fatores como peso molecular e densidade. O alginato é um polímero linear não ramificado composto por sub-unidades de ácido  $\alpha$ -L galurônico e sub-unidades G e  $\beta$ -D manurônico (Rehm, 2009). O processo de gelação acontece com o empilhamento de blocos de ácido galurônico em presença de cátions divalentes ou polímeros catiônicos como quitosana. Esse empilhamento forma uma estrutura tipo broche

chamada modelo de caixa de ovos que permite formação de nano- géis, nano e micropartículas (Donati et al., 2005).

A quitosana é um copolímero composto por sub-unidades de  $\beta(1-4)$  D Glucosamina que é obtido a partir da quitina (Rinaudo, 2006). A quitosana é considerada uma base pela presença de um grupo amina primário dentro da sua estrutura, com um  $pK_a$  estimado de 6,3 característica que permite sua solubilidade em soluções ácidas diluídas com valores de  $pK_a$  menores a 6,0 (Pillai et al., 2009; Szekalska et al., 2017).

Neste trabalho foram desenvolvidas nanopartículas poliméricas de alginato quitosana carregando curcumina com o intuito de serem usadas como sistemas de liberação controlada de uso agrícola. Vale salientar o uso na área agrícola de outros sistemas como nanofibras poliméricas usadas na proteção de sementes e na área de alimentos no desenvolvimento de embalagens carregando compostos antimicrobianos naturais.

### **1.5 Nanofibras poliméricas**

Nanofibras poliméricas são fibras com diâmetro na escala de 100-1000 nm, preparadas pela técnica de eletrofiação. Esta técnica está baseada na injeção de soluções poliméricas através de uma agulha na presença de um campo elétrico permitindo a formação e deposição sobre uma placa coletora (Schiffman and Schauer, 2008).

No processo de formação das fibras os polímeros são previamente solubilizados; as soluções apresentam características dielétricas compostas por cargas positivas e negativas. Quando são submetidos a campos elétricos fortes, as cargas são acumuladas na solução que fluem através da agulha formando uma gota, que se estende criando o cone de Taylor, a gota estendida é projetada sobre a placa coletora formando as fibras.

Parâmetros como solubilidade do polímero, tipo de solvente, viscosidade da solução e constante dielétrica afeta a qualidade e diâmetros das fibras. Outras variáveis que afetam o processo de formação das fibras são a taxa de vazamento, o potencial elétrico aplicado, o diâmetro da agulha e distância entre a placa coletora (Schiffman and Schauer, 2008).

Diferentes matrizes poliméricas são usadas na preparação das nanofibras como alginato, quitosana, celulose, amido e gelatina que são usados pelas vantagens anteriormente relatadas.

As fibras preparadas com a técnica de eletrofiação apresentam ótimas características, tais como maiores áreas de superfície em relação ao volume, maior área de contato e

porosidade ajustável, além de permitir a incorporação de diferentes produtos controlando a liberação.

Diferentes estratégias têm sido usadas na formação de nanofibras poliméricas baseadas em biopolímeros como alginato e quitosana bem como blendas com policaprolactona, gelatina, Polivinil álcool PVA, óxido de polietileno PEO e gelatina (Puoci et al., 2008).

A policaprolactona (PCL) é um polímero hidrofóbico semicristalino que apresenta um ponto de fusão baixo, na faixa de 59-64°C, apresenta boa compatibilidade na formação de blendas com outros polímeros biodegradáveis, como amido, PLA, entre outros.

A PCL é sintetizada por polimerização de abertura de anel de monômeros cíclicos de  $\epsilon$ -caprolactona junto com catalisadores, como octanoato de estanho e álcoois de baixo peso molecular (Labet and Thielemans, 2009).

A gelatina é uma proteína hidrossolúvel obtida pela hidrólise parcial de colágeno. Devido a sua origem, fatores intrínsecos como o tipo de colágeno podem influenciar nas propriedades físicoquímicas (Gómez-Guillén et al., 2011).

O uso de blendas poliméricas melhora a capacidade de eletrospinação, fornecendo resistência mecânica. A literatura reporta diferentes tipos de nanofibras usadas no desenvolvimento de embalagens para comercialização de alimentos carregando compostos naturais antimicrobianos como eugenol e moléculas detoxificantes que são carregados em nanofibras preparadas usando várias matrizes como polivinil álcool PVA, alginato, e proteína zein. Estas embalagens são usadas para diferentes produtos como carne, legumes e frutos frescos (Kayaci et al., 2013; Liu et al., 2016; Otoni et al., 2016; Peretto et al., 2017).

Neste trabalho foram preparadas nanofibras poliméricas usando matrizes biodegradáveis carregando curcumina como agente antimicrobiano. Com o objetivo de avaliar sua eficiência e cinéticas de liberação.

## **1.6 Motivações deste trabalho**

No momento existe uma alta procura na indústria do agronegócio em desenvolver novos sistemas antimicrobianos. Em razão disto foram desenvolvidas três diferentes estratégias, nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), nanopartículas poliméricas e nanofibras poliméricas carregando compostos antimicrobianos.

As estratégias adotadas foram desenhadas com o objetivo de ser utilizadas como matrizes de liberação baratas, inócuas que permitam liberar e manter o efeito biológico de forma eficiente por longos períodos de tempo de antibióticos sintéticos como doxiciclina e antimicrobianos naturais como curcumina. Ainda foi feita a exploração das propriedades antimicrobianas das nanopartículas óxido de zinco (ZnO).

# Objetivos

## 1.7 Objetivos gerais

Este estudo visa desenvolver matrizes para liberação controlada baseados em nanopartículas de óxido zinco (ZnO) carregando doxiciclina, nanopartículas de alginato-quitosana e nanofibras poliméricas carregadoras de curcumina e avaliação do efeito antimicrobiano frente a bactérias fitopatogênicas.

## 1.8 Objetivos específicos

1. Preparar e caracterizar as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico.
2. Avaliar o uso do tratamento térmico redutor na produção de espécies reativas de oxigênio nas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de síntese sol-gel e hidrotérmico.
3. Avaliar a adsorção e liberação controlada *in vitro* de doxiciclina nas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO).
4. Avaliar o efeito microbiológico das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) frente a bactérias fitopatogênicas.
5. Avaliar a capacidade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) por efeito fotocatalítico.
6. Preparar e caracterizar as nanopartículas de alginato-quitosana e nanofibras poliméricas contendo curcumina.
7. Avaliar a liberação de curcumina a partir das nanopartículas alginato-quitosana e das nanofibras poliméricas.
8. Avaliar o efeito antimicrobiano da curcumina encapsulada nas nanopartículas alginato-quitosana e nanofibras poliméricas frente as bactérias *E.coli* e *S. aureus*.

## Capítulo 2 Materiais e Métodos

### 2 Materiais

#### Nitrato de zinco hexahidratado

Nomenclatura IUPAC: Nitrato de zinco

Fórmula molecular:  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Massa molecular:  $297,49 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Fabricante: VETEC Brasil.

#### Acetato de zinco dihidratado

Nomenclatura IUPAC: Diacetato de zinco

Fórmula molecular:  $Zn(CH_3CO_2)_2 \cdot 2H_2O$

Massa molecular:  $219,50 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Fabricante: VETEC Brasil.

#### Hidróxido de sódio

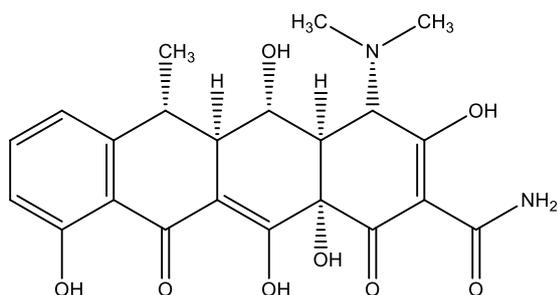
Nomenclatura IUPAC: hidróxido de sódio

Fórmula molecular: NaOH

Massa molecular:  $39,99 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Fabricante: VETEC Brasil.

#### Doxiciclina



**Figura 2** Estrutura química da doxiciclina.

Nomenclatura IUPAC: (4S, 4aR, 5S, 5aR, R, 12aS) -4- (dimetil amino) -3,5,10,12,12A hidroxí-6 metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-2-tetraceno carboxi- amide)

Fórmula molecular:  $C_{22}H_{24}N_2O_8$ .

Massa molecular:  $444,43 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Fabricante: VETEC Brasil.

### Álcool etílico

Nomenclatura IUPAC: Etanol

Fórmula molecular:  $C_2H_6O$

Massa molecular:  $46,07 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Fabricante: Synth Brasil.

### Curcumina

Nomenclatura IUPAC: (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi fenil)hepta-1,6-dieno3,5-diona

Fórmula molecular:  $C_{21}H_{20}O_{11}$

Massa Molar:  $368,37 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Ponto de fusão:  $180^\circ\text{C}$

Fabricante: Sigma Brasil.

### Amido

Nomenclatura IUPAC: (2R,4R,5S)-2-[(2S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-2,5-bis(hidroxi metil)]

Fórmula molecular:  $C_{12}H_{22}O_{11}$

Fabricante: Synth Brasil.

### Alginato de sódio:

Fórmula molecular:  $C_{12}H_{22}O_{11}$

Fabricante: Sigma aldrich

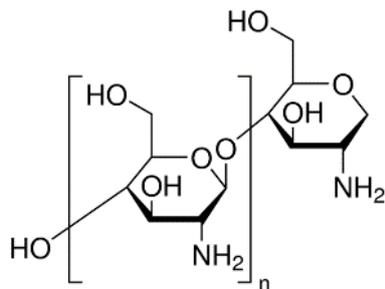
Viscosidade: 100-300 Cp (2%)

Lote: MKBG5630V.

### Quitosana

Nomenclatura IUPAC: poli(1-4)-2-amino-2-deoxi-d-glucopiranososa.

Fórmula molecular:  $C_6H_{11}NO_4$



**Figura 3 Estrutura molecular da quitosana.**

Massa molecular: baixo peso molecular  $110000-150000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Fabricante: Sigma Aldrich

Viscosidade: 20-300 cP ( 1% P/V em ácido acético)

Lote: MKBH7256V

### **Policaprolactona**

Nomenclatura IUPAC: (1,7)poliexopan-2-1

Fórmula molecular:  $(C_6H_{10}O_2)_n$

massa molecular: 43000-50000  $g \cdot mol^{-1}$

Fabricante: Polysciences USA.

### **Gelatina**

Nomenclatura IUPAC: são misturas heterogêneas de proteínas solúveis em água com alto peso molecular compostos por misturas de aminoácidos como alanina, valina, leucina, glicina entre outros

Fabricante: Sigma Brasil.

### **Cloreto de Cálcio**

Nomenclatura IUPAC: Cloreto de Cálcio anidro

Fórmula molecular:  $CaCl_2$

Fabricante: Vetec Brasil.

Massa molar: 110,99  $g \cdot mol^{-1}$ .

### **Outros Reagentes**

- Água Milli- Q®
- Ácido acético glacial (Grupo Química, Brasil)- teor mínimo 99,8%
- Acetato de etila (Vetec, Brasil) – teor mínimo 99,5%
- Brometo de potássio para espectroscopia grau IV, 99,9% de pureza
- Fosfato de sódio dibásico anidro, Vetec
- Dodecil sulfato de sódio LGC tecnologia
- Cloreto de sódio, Sigma, 99,0% de pureza
- Cloreto de potássio Merck, grau analítico

## **2.1 Preparação de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO)**

Foram usados três métodos de síntese em solução como o método de sol-gel, síntese hidrotérmica usando autoclave de aço inox e síntese hidrotérmica assistida por microondas.

### **2.1.2 Síntese Sol-Gel**

As nanopartículas foram preparadas usando a metodologia de sol-gel descrita por Vaezi (Vaezi and Sadrnezhad, 2007) e Gusatti (Gusatti et al., 2011) com algumas modificações. Foram preparadas duas soluções aquosas a  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e NaOH. Em um balão de três bocas de 500 mL foi adicionado 150 mL da solução de NaOH, em seguida goteou-se 150 mL de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  à solução da base, sob agitação a  $70^\circ\text{C}$  por 2 h. O produto obtido foi lavado e centrifugado com álcool etílico 4 vezes, secado em forno a  $70^\circ\text{C}$  durante 12 horas.

### **2.1.3 Síntese hidrotérmica**

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) foram preparadas de acordo ao método descrito por Wei et al. com algumas adaptações (Wei et al., 2005). Foi realizada uma solução metanólica a  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e uma solução aquosa de NaOH a  $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Em um beaquer foram adicionados 50 mL de cada solução, sob agitação a temperatura ambiente por 10 min. Após esse tempo foram transferidas a uma autoclave revestida com teflon numa faixa de  $100\text{-}150^\circ\text{C}$  durante 6 h. O produto final foi filtrado, lavado várias vezes com álcool etílico e secado em estufa a  $70^\circ\text{C}$  durante 12 horas.

### **2.1.4 Síntese hidrotérmica assistida por microondas**

Nesta síntese foram solubilizados 0,2 g de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 40 mL de etilenoglicol, a essa solução adicionou-se 0,4 mL de água Milli-Q. Esta mistura foi homogeneizada durante 20 min a  $40^\circ\text{C}$ . Em seguida foram transferidas a um reator assistido por microondas (Milestone Start-S microwave Digestion system). A mistura foi aquecida a  $180^\circ\text{C}$  durante 6 min usando uma taxa de aquecimento de  $75^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  (Zhang et al., 2015). As nanopartículas obtidas foram lavadas e centrifugadas a 17000 rpm numa mistura 3:1 de etanol-água. Finalmente foram secadas em um forno a  $60^\circ\text{C}$  durante 12 h.

### **2.1.5 Tratamento térmico redutor**

As amostras obtidas pelos métodos de sol-gel e método hidrotérmico foram tratadas termicamente, num forno tubular a  $500^\circ\text{C}$ , com uma taxa de aquecimento de  $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  por 2

h, usando uma atmosfera redutora composta por uma mistura de 80% de nitrogênio e 20% de hidrogênio.

## 2.2 Caracterizações físicoquímicas

### 2.2.1 Difração de raios X

O perfil cristalográfico das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) foram avaliados usando a técnica de difração de raios X em pó, usando um difratômetro Shimadzu XRD-700-X-Ray equipado com um tubo de cobre e radiação  $\text{CuK}\alpha = 1,5405 \text{ \AA}$  em ângulos de  $2\theta$  variando de 4 a 80 graus e velocidade de varredura de  $4\theta \cdot \text{min}^{-1}$ . Os difratogramas das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) foram comparados com o padrão 03-065-3411 da base de dados de materiais inorgânicos. Os tamanhos do cristal foram calculados usando a equação de Scherrer (equação 3), que junto com outros parâmetros como largura dos picos permitem estimar o tamanho do cristalito.

$$D = \frac{k\lambda}{FWHM \cos\theta} \quad \text{Equação 3}$$

$$FWHM = \sqrt{B^2 - b^2} \quad \text{Equação 4}$$

Onde K= constante= 0,9

$\lambda$ = comprimento de onda da fonte de raios X;  $\text{K}\alpha\text{Cu} = 1,54062 \text{ \AA}$

FWHM = largura da altura média do pico de estudo

b= largura média do padrão neste caso (b= 0,3563).

### 2.2.2 Espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram usadas para estudar a qualidade e características dos cristais das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), buscou-se identificar algumas variações entre os métodos de síntese usados. Os espectros foram obtidos usando um micro-Raman system, equipado com um laser de Argon de 514 nm, potência de 25 mW e resolução de  $5 \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.2.3 Área de superfície e porosidade de partícula

A técnica de adsorção de nitrogênio sobre superfícies de materiais é um método amplamente usado na determinação de área de superfície, porosidade e distribuição de poros. As amostras de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) foram estudadas usando um analisador de área de superfície Quantochrome IQ. Inicialmente as amostras foram secadas a

200° C por 8 h. posteriormente foram realizadas as medidas de área de superfície e porosidade a 77 K.

#### 2.2.4 Espectroscopia de reflectância na região UV-Vis

A caracterização do “band gap” das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) foi feita usando espectros UV-Vis por reflectância difusa. As medidas de reflectância foram feitas misturando 5 mg de cada uma das nanopartículas com 25 mg de BaSO<sub>4</sub> depois de misturados foram colocados na porta amostra. A reflectância foi medida num espectrofotômetro Shimadzu SUV-2600. Com os dados de reflectância se obteve o valor da função Kubelka Munk F(R) usando a seguinte equação:

$$F(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad \text{Equação 5}$$

F(R) = função Kubelka Munk; R= valor da reflectância

Depois de obter os valores da função Kubelka Munk foi substituída na função proposta por Tauc e Davis para obter o valor dos “band gaps” (Tauc et al., 1966; Davis and Mott, 1970).

$$(h\nu F(R))^2 = (h\nu - E_g) \quad \text{Equação 6}$$

v= frequência da vibração; h= constante de Planck, E<sub>g</sub>= valor do “band gap”.

#### 2.2.5 Medidas de fotoluminescência

A fotoluminescência em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) é um fenômeno que está relacionado com presença de defeitos de superfície. Neste trabalho foi usada a fotoluminescência para estudar o efeito dos métodos de síntese com a formação de defeitos. Os espectros foram registrados em dispersões de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) usando um espectrofluorímetro Jobin Horiba Fluorolog equipado com laser de Xênon de 425 nm de comprimento de onda de emissão.

#### 2.2.6 Ressonância paramagnética eletrônica

Os espectros de EPR foram registrados usando um espectrômetro operando em banda X (9,4 GHz) Miniscope MS4000 (Magnetech) a 77 K. Para detecção de espécies reativas de oxigênio foi usado a ressonância paramagnética eletrônica associada ao método de captura de “spin trap”. Como armadilha de “spin” foram usados os compostos PBN (N-ter-butil-α-fenil-

nitrona) e TEMP (Tetrametil-piperidina-1 – oxil). As amostras foram iluminadas com laser UV (354 nm). Foram usados os seguintes parâmetros experimentais: potência de microondas 1 mW, amplitude do campo de modulação 0,2 mT, frequência de modulação 100 kHz e campo central de 337 mT.

### **2.2.7 Dispersão eletroforética de luz**

A dispersão eletroforética de luz é uma técnica usada para medir a mobilidade dos coloides em dispersão. Esta técnica permite conhecer a carga neta sobre a superfície das partículas o potencial Z. As medições de potencial Z foram feitas usando um equipamento Zetasizer ZS Nanoseries, Malvern instruments, usando cubetas de poliestireno (DTS 0112). Foram preparadas dispersões nas concentrações 0,1 mg·mL<sup>-1</sup> a 0,05 mg·mL<sup>-1</sup> em água Milli-Q.

### **2.2.8 Microscopia eletrônica de transmissão**

A forma e tamanho das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) foram analisados usando microscopia eletrônica de transmissão. Foram tomadas microfotografias com um microscópio Tecnai G2-20 SuperTwin 200 kV do centro de microscopia da UFMG. As amostras foram preparadas usando dispersões de nanopartículas numa concentração de 0,05 mg·mL<sup>-1</sup> em álcool etílico que foram depositadas em grades de cobre com ajuda de uma micropipeta. As microfotografias obtidas foram analisadas usando o software para análise de imagem Gatan.

### **2.2.9 Testes de adsorção e desorção de doxiciclina**

Os testes de adsorção e desorção de doxiciclina foram feitos seguindo a metodologia descrita por Banerjee com modificações (Banerjee and Chen, 2007). Foram usadas diferentes concentrações (4 mg·mL<sup>-1</sup>; 3 mg·mL<sup>-1</sup>; 1 mg·mL<sup>-1</sup>) de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelas sínteses de sol-gel, hidrotérmico com amostras reduzidas e não reduzidas. Em seguida foram misturadas 500 µL de cada uma das dispersões de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com 500 µL de soluções de doxiciclina nas concentrações de (2 mg·mL<sup>-1</sup>; 1 mg·mL<sup>-1</sup>; 0,5 mg·mL<sup>-1</sup>) em tubos eppendorf de 2 mL, sob agitação num shaker orbital a 200 rpm durante 48 h. Depois as amostras foram centrifugadas usando uma ultra centrifuga a 13000 rpm. O sobrenadante foi coletado e quantificado por espectroscopia de UV a 273 nm usando uma curva de calibração de doxiciclina. A curva de calibração foi preparada nas concentrações

0,05 mg·mL<sup>-1</sup> – 0,01 mg·mL<sup>-1</sup> com R= 0,993. A porcentagem adsorvida de doxiciclina foi calculada usando a seguinte equação:

$$\frac{I_c}{I_c+WI} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

$I_c$  = Massa de doxiciclina adsorvida

$WI$  = Massa da nanopartícula de óxido de zinco (ZnO).

Os testes de desorção foram feitos utilizando 3 mg das nanopartículas ZnO-doxiciclina previamente liofilizadas, foi acrescentado 1 mL de água Milli-Q. A mistura foi deixada em agitação constante a temperatura ambiente. Foram retiradas alíquotas em diferentes intervalos de tempo e substituindo o volume retirado por 1 mL de água Milli-Q. Os sobrenadantes foram quantificados usando a absorção UV-Vis em 273 nm. Os experimentos foram feitos em triplicata.

### 2.2.10 Testes microbiológicos

Com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano dos materiais sintetizados foi usado o teste de susceptibilidade de difusão em ágar, subculturas das bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *E. carotovora* e *Pantoeia sp* foram crescidas em ágar Tripticosa Soja (TSA); Muller Hinton durante 12 h a 37°C. A concentração bacteriana foi ajustada numa densidade ótica  $O_D$  0,08-0,1 ( $1 \times 10^8$  células/mL). Foram depositadas sobre as placas de ágar dispersões de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) em poços circulares de 5 mm de diâmetro com incubação por 24 h. Após este tempo foi medido o halo de inibição.

Também foram realizados testes de concentração mínima inibitória (MIC) seguindo a metodologia descrita por “The Clinical & Laboratory Standards Institute” (CLSI) (CLSI, 2011). Foram preparadas 9 diluições seriadas de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) em água Milli-Q, usando concentrações de 10 mg·mL<sup>-1</sup> a 0,05 mg·mL<sup>-1</sup>. Cada poço foi inoculado com 50 µL com suspensões da bactéria numa concentração  $1 \times 10^5$  UFC·mL<sup>-1</sup> e 50 µL de dispersão de nanopartícula. Após as placas foram colocadas numa câmara de irradiação com luz UV com duas lâmpadas (LF-206.LS UVlite Uvitec) com comprimento de onda de emissão em 365 nm (Barnes et al., 2013) durante 4 h. Após do tratamento de luz UV, foi acrescentado 20 µL do corante resazurina, incubados por 20 min a 37°C. A intensidade de fluorescência foi medida utilizando um comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{ex}$ ) em 570 nm e comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ) em 590 nm (Balouiri et al., 2016).

### **2.2.11 Atividade antimicrobiana e cinética de morte**

O método para avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) carregando doxiciclina foi realizado utilizando subculturas das bactérias fitopatogênicas *E. carotovora* e *Pantoea sp.* Foram preparadas suspensões bacterianas nas concentrações  $1 \times 10^6$  UFC·mL<sup>-1</sup> e  $1 \times 10^7$  UFC·mL<sup>-1</sup>. Para avaliar a cinética de morte foram usadas diferentes concentrações (5, 15 e 30 µg·mL<sup>-1</sup>) de doxiciclina carregadas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelo método hidrotérmico. Igualmente foi testado um tratamento branco de nanopartículas de zinco (ZnO) sem doxiciclina com 122 µg·mL<sup>-1</sup>. Foram acrescentadas diluições bacterianas nas dispersões das nanopartículas. Em seguida em diferentes intervalos de tempo foram tomada alíquotas e semeadas em placas de ágar para medir o número de unidades formadoras de colônia (UFC). Após 24 h foram contadas o número de UFC. Cada experimento foi feito em triplicata.

## **2.3 Métodos de preparo da solução sólida amido-curcumina**

### **2.3.1 Secagem por aspersão da solução sólida amido-curcumina**

Foram feitas dispersões contendo 100 mg de curcumina em 0,5 g de amido solúvel, a dispersão sólida foi preparada com uma mistura de água, álcool e “tween 20” a 0,5% P/V, numa proporção de 9:1:0,1 respectivamente. As dispersões foram homogeneizadas e aquecidas a 80 °C durante 15 min, em seguida foram transferidas a um equipamento de secagem por aspersão “Spray dryer” Büchi B-191 equipado com um atomizador interno de 0,5 mm, câmara de secagem de 44 cm de altura e 10,5 cm de diâmetro. As amostras foram atomizadas usando-se uma temperatura de entrada de 140°C, taxa de injeção 9 mL·h<sup>-1</sup> e 100% da capacidade de aspiração.

### **2.3.2 Preparação de nanopartículas alginato-quitosana carregando curcumina**

Neste trabalho foi implementada a metodologia descrita na literatura com algumas modificações. (Das et al., 2010).

Inicialmente foi disperso 1 g da solução sólida amido-curcumina em 117,5 mL de solução de alginato 0,06 % P/V, o produto da mistura foi deixado sob agitação e aquecido a 60 °C por 15 min. A essa mistura foram acrescentados 7,5 mL de uma solução CaCl<sub>2</sub> a 9 mmol·L<sup>-1</sup>. Finalmente sobre a mistura resultante foram gotejados 25 mL de solução quitosana 0,05 % P/V ou de poli-L-lisina 0,05 mol·L<sup>-1</sup>. Após formadas as nanopartículas as mesmas foram

centrifugadas durante 30 min a 17000 rpm. O sobrenadante foi coletado para quantificar a curcumina por meio de espectroscopia de UV-Vis. Para isso foi usada uma curva de calibração de curcumina com concentrações entre  $0,003 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $0,07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  com  $R = 0,97$ . As concentrações de curcumina foram dissolvidas numa mistura de água com Dodecil sulfato de sódio SDS 1 % P/V. O precipitado resultante das nanopartículas foi sonificado por 15 min.

### **2.3.3 Liofilização de amostras**

As amostras das nanopartículas amido-curcumina e alginato foram liofilizadas usando o equipamento Thermo savant, modelo Moduloyd com capacidade de 4 L.

### **2.3.4 Preparação nanofibras**

Foram preparadas fibras poliméricas uniaxiais e coaxiais (concêntricas) de policaprolactona (PCL), alginato (Alg) e gelatina (Gel).

Foram preparadas diferentes concentrações dos polímeros, a policaprolactona a 10%P/V, o alginato a 0,1% P/V e a solução de gelatina a 8% P/V.

A fibra uniaxial policaprolactona carregando curcumina foram preparados usando 10 mL de solução de policaprolactona a 10%P/V em 1:1 metanol-diclorometano, adicionando 100 mg de curcumina sob agitação a temperatura ambiente.

As fibras uniaxial e coaxial policaprolactona-alginato carregando curcumina foram preparadas misturando 8 mL de uma solução de policaprolactona a 10%P/V com 2 mL de uma solução alginato a 0,1%P/V em ácido acético glacial, acetato de etila e água numa proporção 3:2:1. A esta solução foram adicionados 100 mg de curcumina sob agitação a temperatura ambiente.

A fibra coaxial policaprolactona-gelatina carregando curcumina foi preparada misturando 8 mL de uma solução de policaprolactona a 10% P/V com 2 mL de uma solução gelatina a 8% P/V em ácido acético glacial, acetato de etila e água numa proporção 3:2:1. A esta solução foram adicionados 100 mg de curcumina sob agitação a temperatura ambiente. As nanofibras foram preparadas usando o gerador de voltagem Gamma High voltage Research ES40, uma bomba de injeção Harvard Apparatus pHD 2000 empregando uma agulha metálica de diâmetro interno 1 mm, com distância entre a ponta da agulha injetora e a placa coletora foi de 20 cm.

Na Tabela 1 estão apresentadas as porcentagens das soluções poliméricas usadas na preparação das nanofibras.

**Tabela 1 Condições usadas na preparação das nanofibras.**

Fibra	Porcentagem solução	Porcentagem	Porcentagem
	PCI	alginato	Gelatina
PCI- curcumina	100%	-	-
PCI-alginato	80%	20%	-
Concêntrica PCI- Alginato	80%	20%	-
Concêntrica PCI- Gelatina	50%	-	50%

## 2.4 Caracterização físicoquímica

Neste trabalho foram caracterizados os materiais poliméricos de partida. Os sistemas poliméricos preparados com diferentes técnicas foram caracterizados por espectroscopia de absorção na região de infravermelho, análise térmica e difração de raios X.

### 2.4.1 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho

Os espectros dos materiais de partida foram feitos em pastilhas de KBr, foram feitos 128 medidas por amostra usando um espectrofotômetro Perkin Elmer spectrum GX, na região 4000- 400  $\text{cm}^{-1}$  da infraestrutura do Departamento de Química da UFMG.

### 2.4.2 Análise térmica

Os experimentos de análise termogravimétrica (TG/DTG) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizados usando um equipamento SDT Q 600 TA Instruments com atmosfera de  $\text{N}_2$  com fluxo constante aproximado de  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  na faixa de temperatura de 25-800 °C. A massa das amostras variou entre 5-10 mg e pesada em cadinhos de alumina de 40  $\mu\text{L}$ , com uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ . Os dados obtidos foram analisados no software TA universal Analysis 2000.

### 2.4.3 Difração de raios X

O perfil cristalográfico dos materiais usados e dos sistemas poliméricos nanoparticulados obtidos foram avaliados usando a técnica de difração de raios X em pó,

usando um difractor Shimadzu XRD-700-X-Ray, equipado com um tubo de cobre e radiação  $\text{CuK}\alpha = 1,5405\text{\AA}$ , em ângulos de  $2\theta$  variando de 4 a 60 graus, e velocidade de varredura de  $4\theta/\text{min}$ .

#### **2.4.4 Medidas de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico**

As medidas de tamanho por espalhamento de luz DLS, foram feitas usando dispersões aquosas de nanopartículas numa concentração de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As nanopartículas foram sonicadas durante 15 min. Após a preparação das amostras as leituras foram medidas num equipamento Zetasizer ZS Nanoseries, Malvern instruments, usando cubetas de poliestireno (DTS 0112).

#### **2.4.5 Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia e tamanho das nanofibras preparadas foram estudados por microscopia eletrônica de varredura. As amostras foram preparadas depositando nanofibras diretamente sobre grades de cobre inserida dentro do equipamento de eletrofição em funcionamento por 30 s. As microfotografias foram registradas num microscópio eletrônico FEG-Quanta 200 Fei da infraestrutura do Centro de Microscopia da UFMG. Foi usada uma aceleração de 10 kV sob pressão reduzida, obtendo magnificações de 10000X até 30000X. A quantificação dos diâmetros das fibras foi estimada usando o software Image J.

#### **2.4.6 Espectroscopia na região UV-Vis**

Para determinar a concentração de curcumina dentro da solução sólida amido-curcumina, realizou-se uma curva de calibração de curcumina com concentrações entre  $0,003 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $0,07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  com  $R = 0,97$ . Os valores de absorvância foram registradas usando um espectrofotômetro no visível  $\lambda$  de 430 nm.

A porcentagem de curcumina carregada dentro do amido foi calculada usando a seguinte Fórmula:

$$\frac{C_f}{C_i} \times 100 \text{ Equação 8}$$

Onde:

$C_i$  = concentração de curcumina extraída da dispersão.

C<sub>i</sub>= concentração inicial de curcumina adicionada durante a preparação por secagem por aspersão.

Para determinar a porcentagem de carga de curcumina dentro das Nps alginato quitosana foi preparada uma dispersão, centrifugada a 15000 rpm por 15 min. A absorvância do sobrenadante foi medida a 427 nm. A porcentagem de carga foi calculada usando a seguinte equação:

$$\frac{CT-CL}{CT} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

**Onde: CT= curcumina Total; CL= curcumina livre.**

Para elaboração das cinéticas de liberação foram utilizados 5 mg das Nps de alginato- quitosana carregando curcumina dissolvida em 1 mL de água - SDS 1 % em pH 2,0 e 7,0. Foram tomadas alíquotas em diferentes tempos e o volume tirado substituído por água - SDS 1 %. A absorvância foi medida num comprimento de onda de 427 nm.

#### **2.4.7 Ensaios microbiológicos**

Com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano dos materiais preparados foi usado o método por difusão em ágar. Utilizando subculturas de bactérias *E. coli* e *S. aureus* em agar Tripticasa Soja (TSA); Muller Hinton durante 12 h numa temperatura de 37°C. Após a concentração das bactérias foi ajustada numa densidade ótica (O<sub>D</sub>) 0,08-0,1 (1 x 10<sup>8</sup> células/mL). Foram preparadas dispersões de curcumina, amido-curcumina e nanopartículas de alginato-quitosana carregando curcumina numa concentração 500 µg·mL<sup>-1</sup>. As dispersões foram pipetadas sobre orifícios de 5 mm. A clorexidina foi usada como controle positivo. A porcentagem de inibição foi calculada tomando como 100% o halo de inibição do controle positivo. No caso das nanofibras usou-se segmentos molhados de cada fibra em uma solução água-SDS 1% P/V.

# Capítulo 3 Síntese caracterização físicoquímica e avaliação microbiológica de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO)

## Resultados e discussão

A seguir serão apresentados os resultados de síntese, caracterização físicoquímicas e avaliação microbiológica das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO). Além disso foi estudado o efeito do tratamento térmico redutor nas características físico-químicas e na atividade microbiológica por efeito fotocatalítico. Por último foi avaliado a capacidade de adsorção e desorção de doxiciclina sobre as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO).

### 3.0 Caracterização físicoquímica

#### 3.1 Difração de raios X

Na Figura 4 estão apresentados os difratogramas das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de síntese sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.

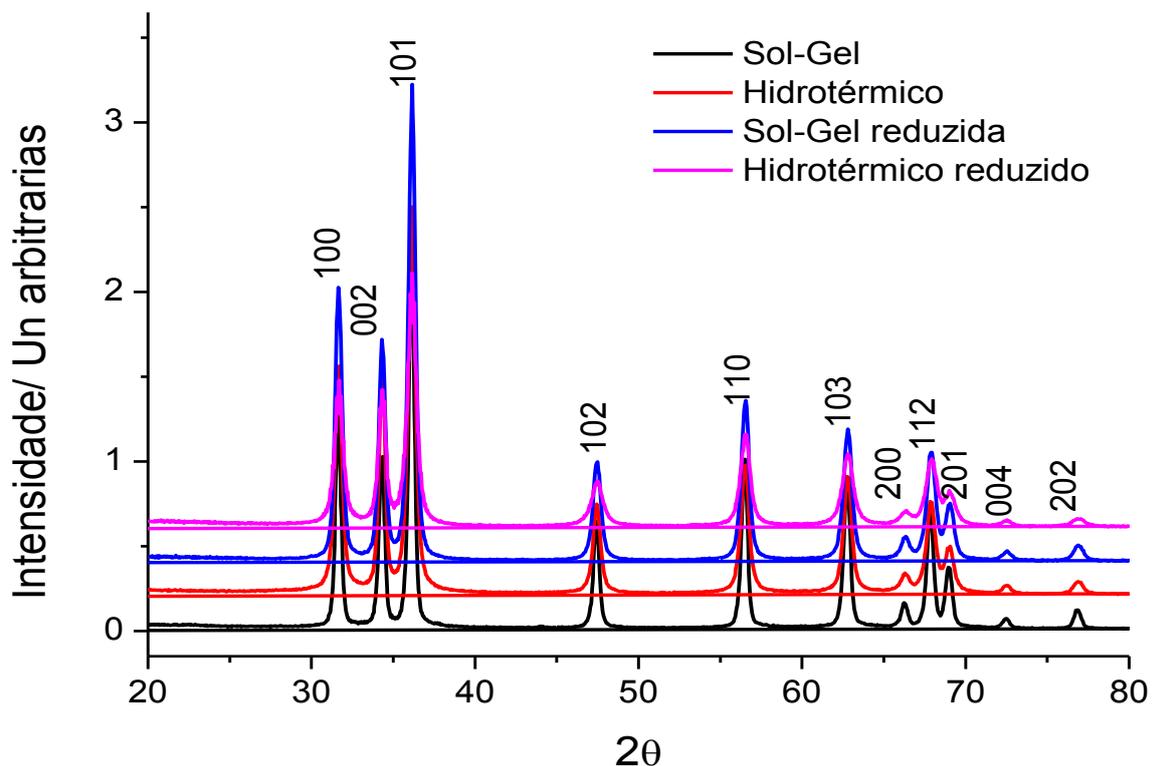


Figura 4 Difratograma de raios X de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico redutor.

Analisando os resultados verifica-se um padrão cristalino nos quatros materiais sintetizados, encontrando-se picos em 31,7, 34,4, 36,2, 47,5, 56,9, 62,8, 67,9, 69,0, 72,5, 76,4 graus que correspondem com os planos (hkl) 100; 002; 101; 102; 110; 103; 200; 112; 201; 004 e 202, os picos e a intensidades coincidem com a padrão cristalino de Wurtzita descrito na base de dados Match (JCPDS 36-1451) e pelo descritos em outros trabalhos (Pourrahimi et al., 2014; Khan et al., 2016).

Usando os picos dos difratogramas foram calculados os tamanhos dos cristalitos que são apresentados Tabela 2.

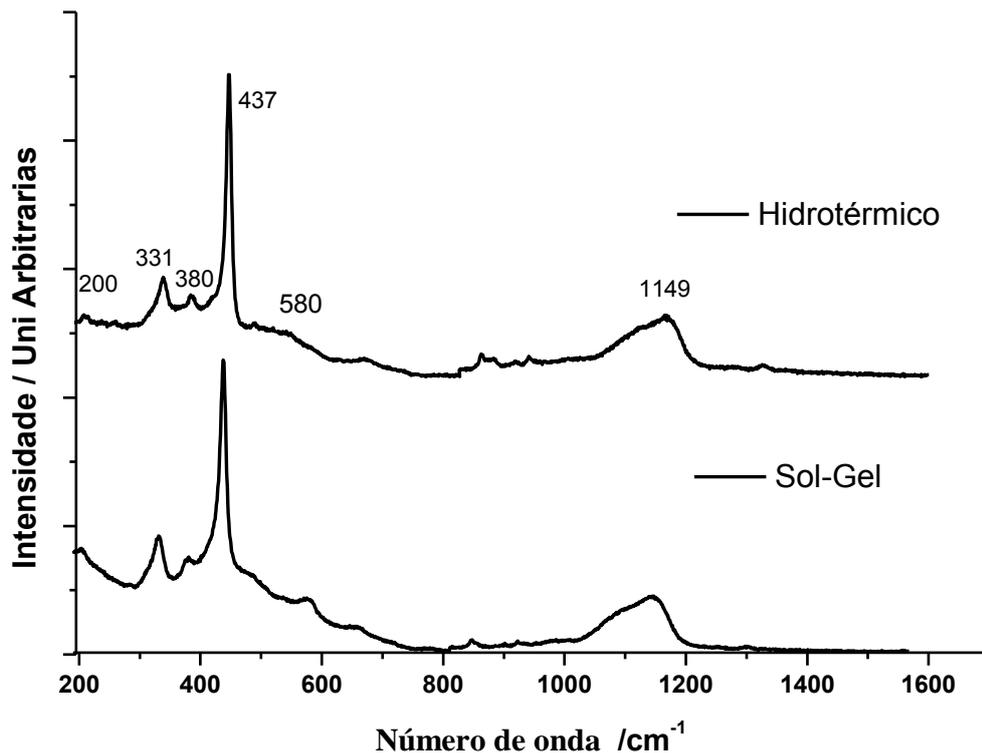
**Tabela 2 Tamanhos dos cristalitos de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico.**

<b>Tipo de síntese</b>	<b>Altura médio do plano hkl 110</b>	<b>Tamanho de cristalito</b>
<b>Sol-Gel</b>	0,01251	15,0 nm
<b>Sol-Gel reduzido</b>	$4,8583 \times 10^{-3}$	33,5 nm
<b>Hidrotérmico</b>	0,01411	3,5 nm
<b>Hidrotérmico reduzido</b>	0,01816	8,4 nm

Analisando os tamanhos dos cristalitos das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel , hidrotérmico com e sem tratamento térmico apresentados na Tabela 2, verifica-se um aumento no tamanho de partícula relacionado com tratamento redutor que leva a processos de sinterização e crescimento dos cristais, fenômeno também descrito por outros autores que relatam crescimentos entre 15-55% dos cristais óxido de zinco (ZnO) por efeito de sinterização (Søndergaard et al., 2011; Pourrahimi et al., 2015).

### **3.1.2 Espectroscopia Raman**

Na Figura 5 são apresentados os espectros Raman das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos sol-gel e hidrotérmico.



**Figura 5** Espectros Raman de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) dos métodos de síntese sol-gel e hidrotérmico.

Analisando a Figura 5 encontram-se picos semelhantes para ambos materiais obtidos pelos dois métodos de síntese estudados. Encontrou-se picos em  $200\text{ cm}^{-1}$ ;  $331\text{ cm}^{-1}$ ;  $380\text{ cm}^{-1}$ ;  $437\text{ cm}^{-1}$ ;  $580\text{ cm}^{-1}$  e  $1149\text{ cm}^{-1}$  que coincidem com os modos de vibração descritos para wurtzita unidade cristalina de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) (Jacobson T, 2010).

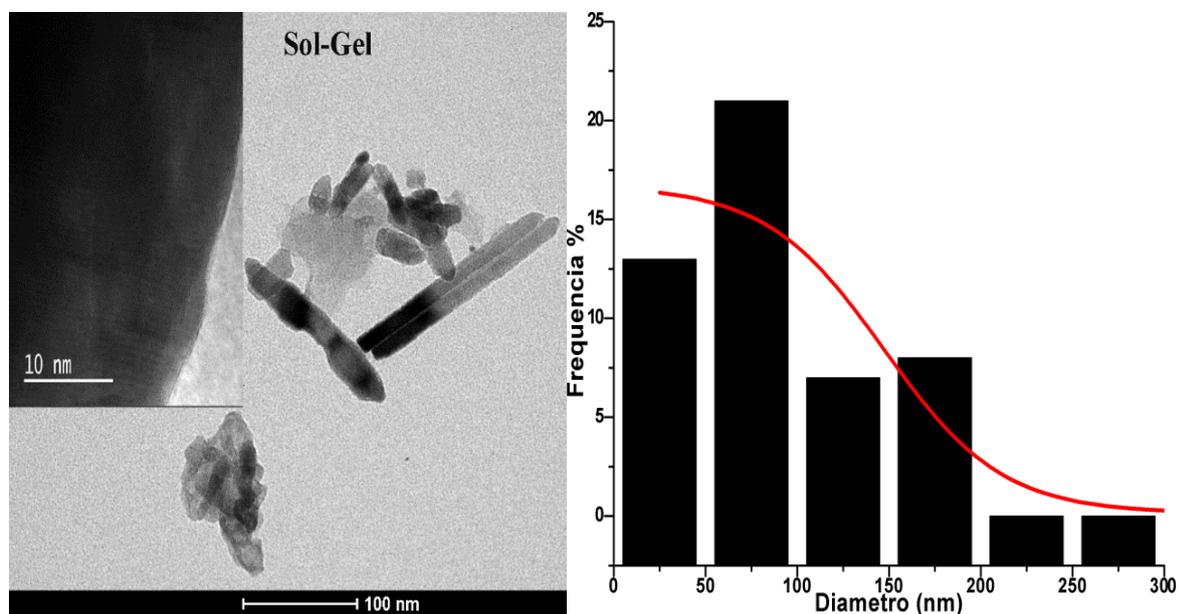
A teoria de grupos descreve oito diferentes modos vibracionais para Wurtzita como  $\Gamma = A_1 + A_2 + B_1 + B_2 + 2E_1 + 2E_2$ . Os modos  $A_1$  e  $A_2$  representam fônons polares ativos em Raman, estes modos estão divididos em modo ópticos transversal (TO),  $A_1(T)$  e  $E_1(T)$  e modo ópticos longitudinal (LO) ( $E_1(L)$  e  $A_1(L)$ ). O modo  $E_2$  é considerado um modo não polar e tem dois modos de fônons de alta e baixa frequência ( $E_2(\text{alta})$  e  $E_2(\text{baixa})$ ). O modo ( $E_2(\text{alta})$ ) é associado a ânions de oxigênio em quanto o modo ( $E_2(\text{baixa})$ ) é relacionado com o cátion de zinco na rede (Jacobson T, 2010; Muñoz, 2013).

Comparando os modos de Raman para Wurtzita com os resultados experimentais, encontrou-se uma banda em  $333\text{ cm}^{-1}$  associado a modos polares  $A_1$ ,  $E_1$  de alta e baixa frequência, uma banda de alta intensidade em  $438\text{ cm}^{-1}$  está relacionada com fônons óticos característico da fase hexagonal de wurtzita em óxido de zinco (ZnO).

Também foi observada uma banda larga de baixa intensidade em  $580\text{ cm}^{-1}$  associada a um modo assimétrico polar longitudinal  $A_1(\text{LO})$  paralelo no eixo C do cristal de Wurtzita. Por último se observou uma banda em  $1149\text{ cm}^{-1}$  identificada como modos polares transversais (TO) e longitudinais (LO)  $A_1$  (Cuscó et al., 2007; Schumm, 2010; Muñoz, 2013). Estes resultados mostram a alta qualidade dos cristais, que se comprova pela presença dos modos vibracionais característicos de Wurtzita que coincide com os resultados de difração de raios X que mostraram padrões cristalinos em todos os materiais sintetizados.

### 3.1.3 Tamanho e morfologia

Continuando com a caracterização físico-química na Figura 6 estão apresentadas as características morfológicas e de distribuição de tamanho de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) preparadas pelo método de sol-gel.

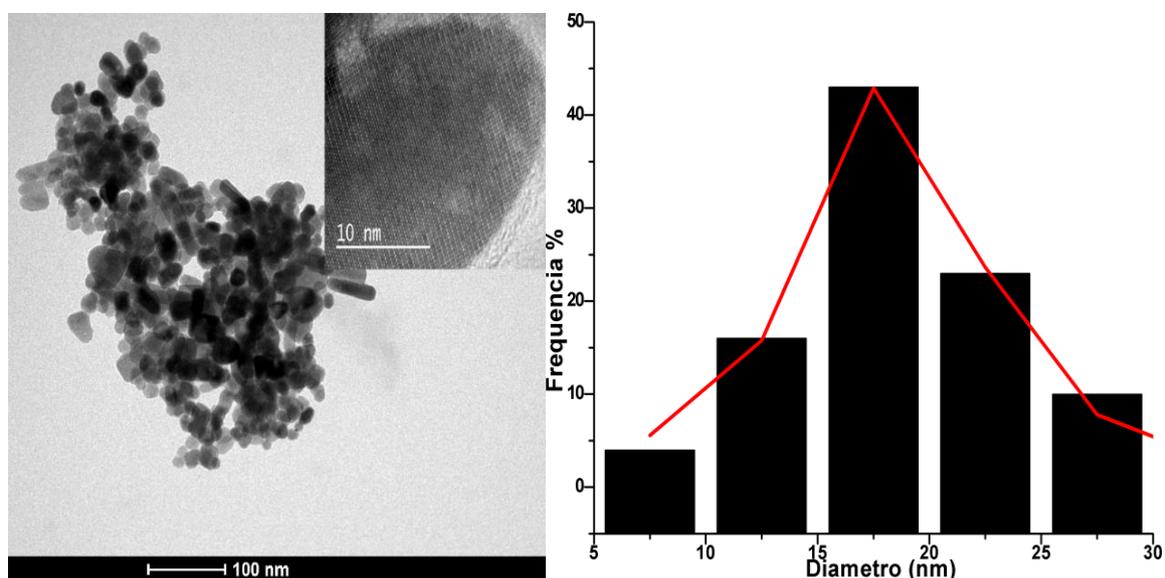


**Figura 6** Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelo método de sol-gel.

As nanopartículas sintetizadas pelo método sol-gel mostraram formas irregulares variando entre bastonetes e agregados de prismas em forma de cone, com tamanhos numa

faixa entre a entre 60 nm - 300 nm, encontrando-se maior frequência de nanopartículas entre 80 - 200 nm. Esta variação de morfologia e tamanho está influenciada por fatores próprios da síntese tais como tipo do reagente usado, razão molar usada dos reagentes, pH e temperatura de reação. Assim por exemplo variações na razão molar de  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  e NaOH de 1:1 até 1:2 mudam o tamanho e morfologia. Outro dos parâmetros que afeta o tamanho da partícula é o tipo de sal usado como precursor, partículas formadas usando  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  mostram tamanhos superiores a 200 nm de comprimento com forma de cone como consequência da condensação de partículas em forma de prisma no eixo C (Pourrahimi et al., 2014). Outro fator que também afeta o tamanho é o pH da síntese, segundo o descrito no trabalho de Wahab et al., valores de pH maiores a 10 favorecem a formação de partículas com variadas morfologias desde cluster ou agregados de prismas até agregados com forma de flores (Wahab et al., 2009).

Na Figura 7 estão apresentadas as microfotografias com as características morfológicas e distribuição de tamanho de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelo método hidrotérmico.



**Figura 7** Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelo método hidrotérmico.

Analisando a Figura 7 verifica-se nanopartículas com formas de bastonetes e esféricas com tamanhos na faixa de 12-32 nm. De igual forma que na síntese sol-gel parâmetros tais como, razão molar dos reagentes e a temperatura usada influenciam o tamanho final da

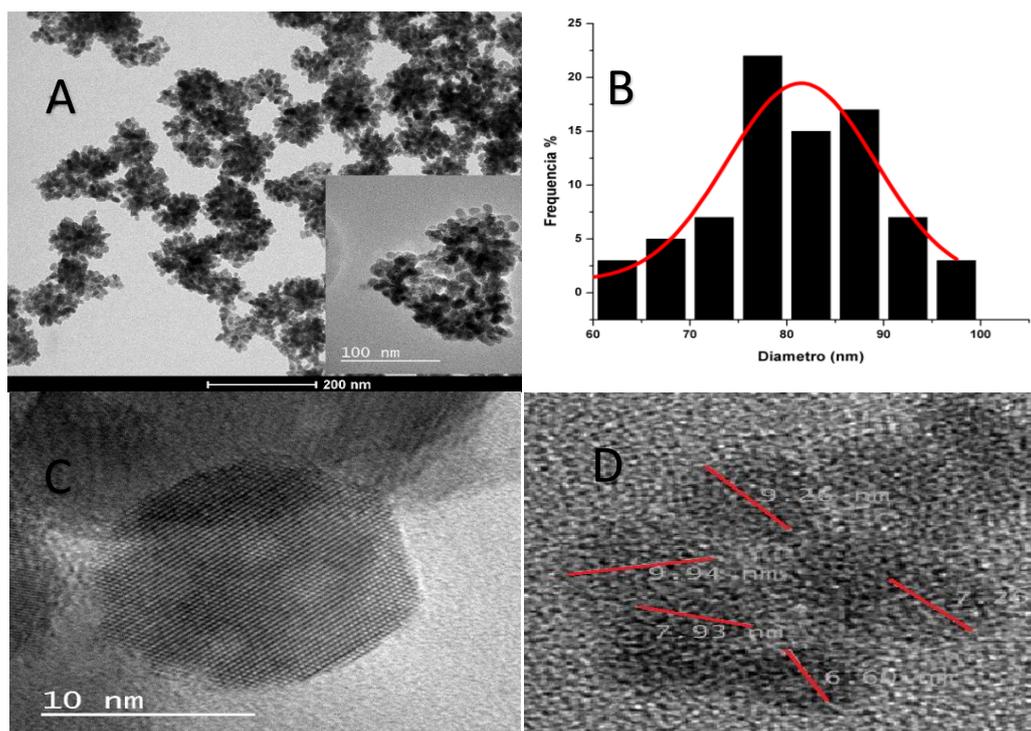
partícula no método hidrotérmico. De acordo com os relatos de literatura sínteses hidrotérmicas com condições de temperatura na faixa de 100-150 °C permitem formar bastonetes anisotropicos com tamanhos de 30 nm de comprimento (Søndergaard et al., 2011).

A formação do cristal de óxido de zinco (ZnO) em sínteses hidrotérmicas é controlado pelas características polares inerentes ao cristal composto por um plano polar positivo com cations de  $Zn^{2+}$  (0001) e um plano polar negativos com átomos de oxigênio ( $000\bar{1}$ ) (Shi et al., 2012). Estes planos polares se comportam como dipolos termodinamicamente instáveis que procuram diminuir a energia de superfície permitindo o crescimento do cristal ao longo do eixo C. Durante o processo hidrotérmico grupos hidroxila se unem preferencialmente no plano (0001) através de coordenações e interações eletrostáticas com os cátions de zinco, formando o composto  $Zn(OH)_4^{2-}$  conhecido como precursor do cristal, que por processos de desidratação formará as nanopartículas de ZnO (Shi et al., 2012; Ludi and Niederberger, 2013).

A molécula precursora é importante porque define a morfologia dos núcleos cristalinos. Variações na razão molar e concentração da base afeta diretamente o processo de formação dos núcleos cristalinos junto com a morfologia final das nanopartículas formadas (Ludi and Niederberger, 2013).

Quando comparados os dois métodos de síntese se encontram grandes diferenças no tamanho de partícula os quais podem ser explicadas pelas diferenças nos mecanismos de síntese. Assim, o processo de formação de nanopartículas depende de vários processos como a nucleação, a colisão, o crescimento e o amadurecimento Ostwald que acontecem de forma simultaneamente determinando a cinética da formação das partículas (Thanh et al., 2014). Na síntese hidrotérmica o aumento da temperatura e pressão permitem uma queda da constante dielétrica da água permitindo a precipitação de metal-hidróxidos que aumentam a concentração da dispersão; supersaturando o sistema.

A saturação do sistema permite a formação de núcleos de menor tamanho preferencialmente núcleos monodispersos (Layek et al., 2012; Dunne et al., 2015). Resultados diferentes foram observados na sínteses de sol-gel que mostrou partículas com formas irregulares e distribuições com tamanhos maiores. Na Figura 8 estão apresentadas as microfotografias com os detalhes de morfologia e distribuição de tamanho de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelo método hidrotérmico assistida por microondas.



**Figura 8 Microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelo método hidrotérmico assistido por microondas.**

gados com tamanhos entre 70-100 nm ver Figuras 8A-8B. Os agregados foram conformados por nanopartículas hexagonais e esféricas com tamanhos entre 7-10 nm Figuras 8C-8D. Este método permitiu formar agregados de nanopartículas com uma distribuição de tamanho uniforme, em um tempo menor comparado com os dois métodos anteriores. Como consequência das diferenças do modo de aquecimento que permite um processo de supersaturação rápido, nucleação rápida e uniforme, permitindo manter a uniformidade na morfologia e tamanho (Rana et al., 2016).

Além das variações no processo de aquecimento outro fator que afetou foi o tipo de solvente que neste caso foi usado uma mistura de água com etileno-glicol. A capacidade de aquecimento por microondas de um solvente, e materiais dispersos no solvente em condições específicas de temperatura e frequência é chamada perda de tangente (Galema, 1997) representado pela equação 9:

$$\delta = \frac{\delta''}{\delta'} \quad \text{Equação 9}$$

$\delta''$  = É definido como a perda dielétrica que representa a eficiência de conversão da radiação eletromagnética em calor.  $\delta'$  = Faz referência a constante dielétrica que descreve a capacidade de polarização da moléculas em presença de um campo elétrico. A perda de

tangente para políeis como etilenoglicol é uma das mais altas com valor de 1,35 permitindo uma maior eficiência do processo de aquecimento e porém uniformidade no processo de nucleação e tamanho de partícula (Baghbanzadeh et al., 2011). Embora o uso de etilenoglicol favoreceu obter uniformidade, nesta síntese não foram usadas bases como contra-ions, que levou a uma baixa eficiência na formação de material, levando a não continuar usando esta metodologia nas seguintes fase deste trabalho.

### 3.1.4 Área específica BET

A área de superfície das nanopartículas sintetizadas foi estudada usando a técnica de adsorção e dessorção de nitrogênio. Na Figura 9 estão apresentados os resultados de área de superfície das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico antes e depois do tratamento térmico redutor.

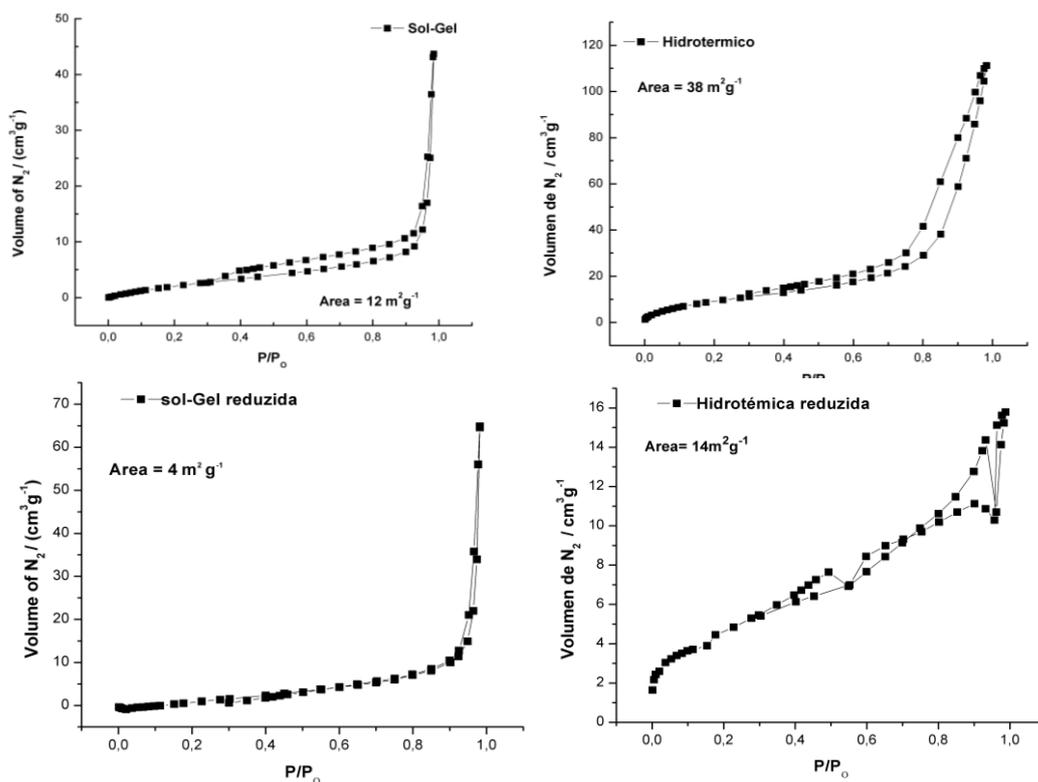


Figura 9 Isothermas de adsorção e dessorção de nitrogênio de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.

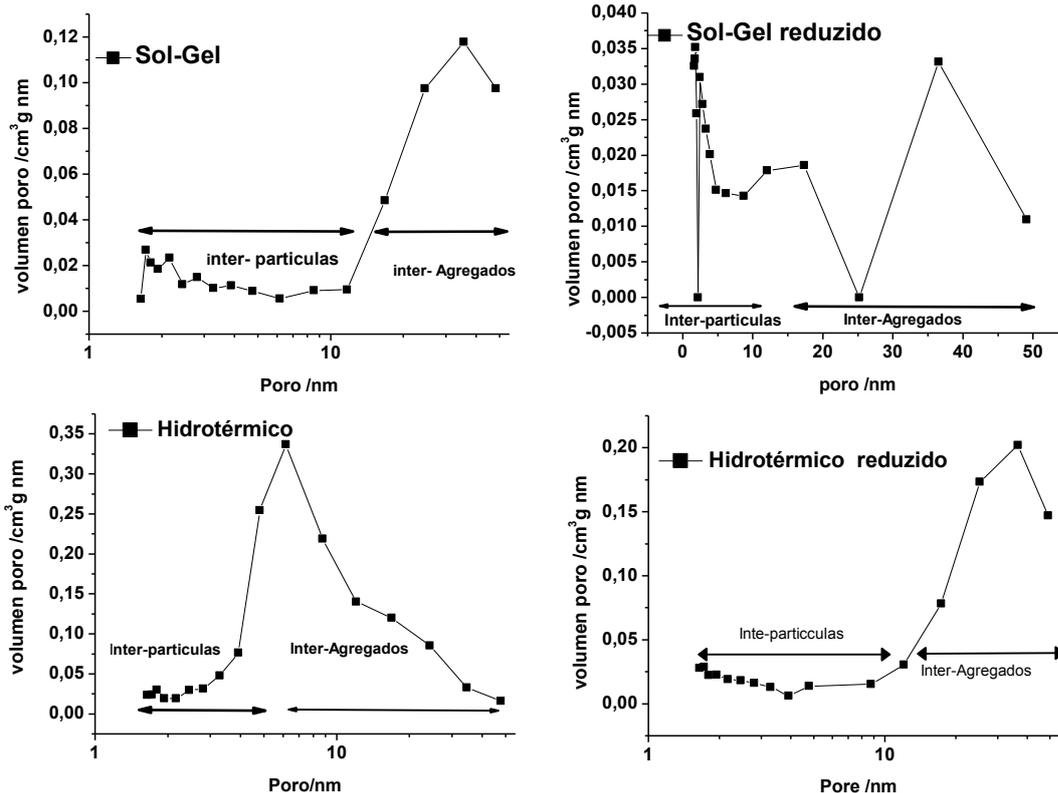
Analisando a Figura 9 encontrou-se o mesmo padrão de isotermas nas nanopartículas avaliadas. As isotermas coincidem com o padrão tipo II de acordo a classificação IUPAC, caracterizando-se pela adsorção em monocamada e multicamadas com valores altos de  $(P/P_0)$  específicos de sólidos não porosos ou macroporosos (Thommes et al., 2015). Foram observadas diferenças nas áreas específicas encontrando-se valores baixos de  $12 \text{ m}^2\cdot\text{g}$  nas nanopartículas sintetizadas pelo método sol-gel contrastando com valores três vezes maiores observados nas nanopartículas obtidas pelo método hidrotérmico, resultados que são coerentes com os tamanhos de partícula observados anteriormente.

Verifica-se ainda uma redução na área específica nas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) submetidas ao efeito térmico; encontrando uma redução de três vezes o valor da área, como consequências de eventos de sinterização que promoveu a união entre partículas adjacentes, acompanhado por aumento da densidade (German, 2016).

A diminuição de área de superfície por sinterização está de acordo com os resultados de difração de raios X que mostraram aumento de tamanho nos cristais em nanopartículas de ZnO submetido ao processo térmico redutor discutido na Tabela 2.

### **3.1.5 Distribuição de poros**

Na Figura 10 estão apresentados os resultados de porosidade de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.



**Figura 10** Perfil de porosidade de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de síntese sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.

De acordo ao tamanho do poro, estes podem ser classificados segundo a IUPAC em poros intra-partícula, poros inter-partícula e poros inter-agregados. Poros intra-partícula são típicos de cristais com largura menor a 2 nm; poros inter-partícula são definidos como poros formados entre partícula primarias com diâmetro 2-50 nm. Os poros inter-agregados são poros maiores que se formam entre agregados irregulares com diâmetros superiores a 20 nm- 500 nm (Sing, 1989).

Os resultados mostraram um padrão de porosidade similar em todas as nanopartículas avaliadas com poros inter-partícula na faixa de tamanho de 2-20 nm e poros inter-agregados 10-50 nm (S.J Gregg, 1982). Cabe ressaltar que embora os materiais estudados apresentaram poros inter partícula e poros inter-agregados, pelos valores baixos de área de superfície encontrados seriam clasificados como sólidos não porosos (Thommes et al., 2015) .

O efeito térmico redutor ocasionou uma diminuição no volume dos poros, encontrando-se volumes três vezes menores no material sol-gel reduzido comparado com o

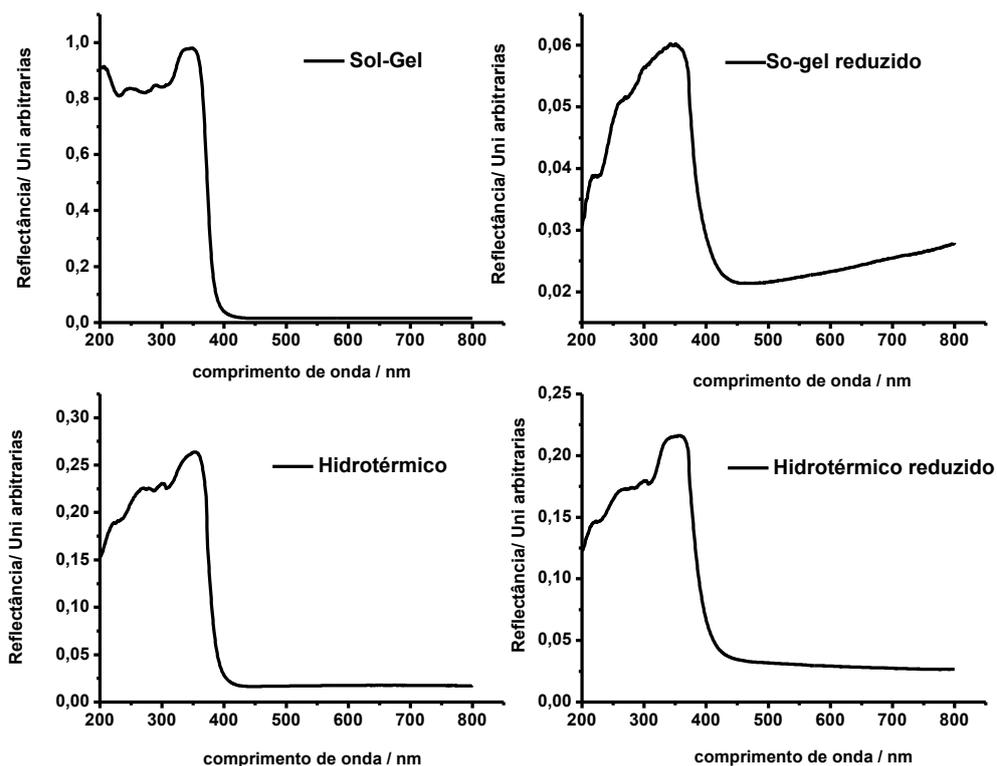
sol-gel sem tratamento térmico. Os resultados coincidem com a diminuição de área de superfície e aumento do cristalito.

### **3.1.6 Espectroscopia de reflectância difusa**

O valor de “band gap” é uma característica importante dos semicondutores que incide nas propriedades fotocatalíticas. Com o objetivo de conhecer as propriedades óticas foram calculados os valores de band gap dos materiais estudados.

A espectroscopia de absorção na região UV-Vis é uma ferramenta comumente usada para calcular o band gap em filmes finos conhecendo a espessura do filme. Mas em amostras coloidais como nanopartículas, esta metodologia apresenta diversos problemas como a precipitação das amostras em dispersão o que dificulta as medidas. Para evitar estas dificuldades metodológicas em amostras sólidas como nanopartículas usa-se metodologias indirectas baseadas no uso de medidas espectroscópicas de reflectância difusa, estes valores são transformados pelo uso da equação Kubelka Munk (Equação 5) que permite o calculo do “band gap”(Morales et al., 2007)

Na Figura 11 estão apresentados os espectros de reflectância difusa das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.



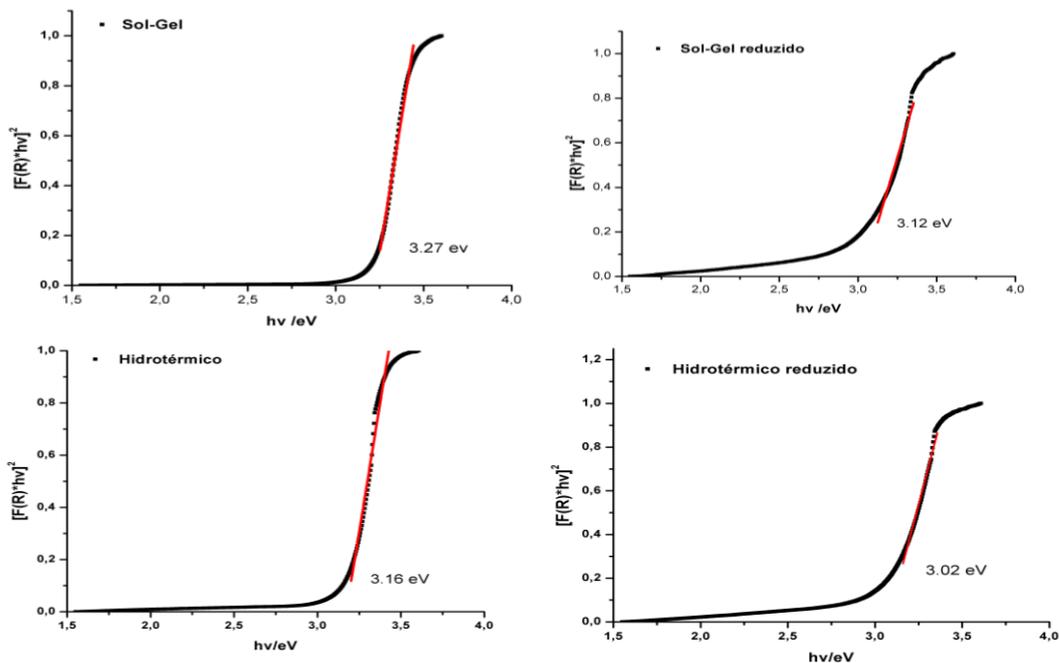
**Figura 11** Espectros de reflectância difusa de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico, com e sem tratamento térmico.

Analisando a Figura 11 observou-se um padrão similar em todos os materiais estudados, encontrou-se uma alta absorção na região do ultravioleta, fenômeno característico de materiais semicondutores como óxido de zinco (ZnO)(Morales et al., 2007; Cimitan et al., 2009).

Com os valores de reflectância foi calculada a Função Kubelka Munk (Equação 3) que foi substituída na Função de Tauc-Davies (Equação 4) para encontrar os valores dos “band gap” de cada uma das nanopartículas estudadas.

### 3.1.7 Cálculo dos “band gaps”

Na Figura 12 estão apresentados os gráficos de Tauc-Davies das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizados pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico e seu respectivo “band gap”.



**Figura 12 Função Tauc-Davies e valores de “band gap” de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.**

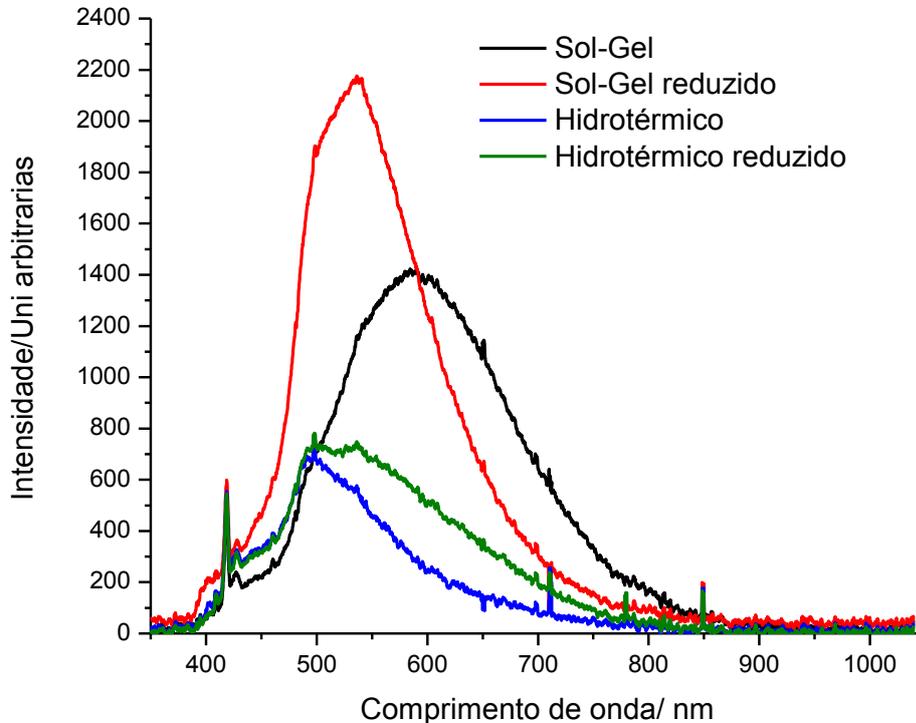
Analisando a Figura 12 verificam-se valores maiores de “band gap” nos materiais sintetizados pela síntese sol-gel seguido das nanopartículas preparadas pelo método hidrotérmico com valores de 3, 27 eV e 3, 16 eV respectivamente.

Verifica-se ainda uma diminuição nos valores de “band gap” das nanopartículas submetidas ao tratamento térmico encontrando valores de 3,12 e 3,02 eV nas nanopartículas sol-gel e hidrotérmico reduzidos. A diminuição no “band gap” em nanopartículas de ZnO é devido à presença de defeitos superficiais como vacâncias de oxigênio próximo da banda de condução como consequência do processo de sinterização. Na literatura encontram-se resultados similares aos descritos (Zak et al., 2011; Wang et al., 2012).

É bem conhecido na literatura que nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) apresentam o fenômeno de fotoluminescência, que está relacionado com a presença de defeitos de superfície. Neste trabalho foi usada a espectroscopia de fotoluminescência como ferramenta para caracterizar de forma rápida e eficiente os defeitos superficiais presentes nos materiais sintetizados com e sem tratamento térmico.

### 3.2 Estudo de fotoluminescência

Na Figura 13 estão apresentados os espectros de fotoluminescência das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.



**Figura 13** Fotoluminescência de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.

Analisando a Figura 13 se observa que as nanopartículas obtidas pelo método de sol-gel tiveram uma banda larga de emissão na região de 400-700 nm com maior intensidade na região do vermelho. As nanopartículas obtidas pelo método de sol-gel com tratamento térmico também mostraram uma banda larga de emissão na região 400-700 nm, a banda de emissão mostrou maior intensidade e um deslocamento na região do verde.

Os espectros de fotoluminescência das nanopartículas sintetizadas pelo método hidrotérmico com e sem tratamento térmico mostraram o mesmo padrão com uma banda larga de emissão na região de 400-700 nm e uma intensidade levemente maior do material que foi reduzido.

A emissão na região do verde está relacionada com a presença de defeitos na superfície como vacâncias de oxigênio e zinco intersticial. O oxigênio apresenta três estados de carga,  $V_O$ ,  $V_O^+$ ,  $V_O^{+2}$  as vacâncias estão localizadas a pouca profundidade na banda de condução (BC), que promovem processos de foto geração reduzindo transições não radiantes,

permitindo a emissão na região do verde até deslocamento na região do vermelho (Djurišić et al., 2004; Jay Chithra et al., 2015).

O deslocamento da emissão na região do vermelho também está influenciado pelo parâmetros de síntese como por exemplo o pH, onde condições de pH 10- 11 promovem a formação de vacâncias de oxigênio  $V_0^+$  e por tanto deslocamentos na banda de emissão (Sharma et al., 2009).

O aumento dos defeitos de superfície está relacionado com o aumento na intensidade da fotoluminescência e diminuição do “band gap”, resultado coerente com os apresentados anteriormente na Figura 13. A diminuição do “band gap” se dá como resultado da sobreposição dos defeitos de superfície com a banda de valência. Resultados similares são descritos nos trabalhos de Wang e Hongyan (Wang et al., 2012; Hongyan Liu 2013).

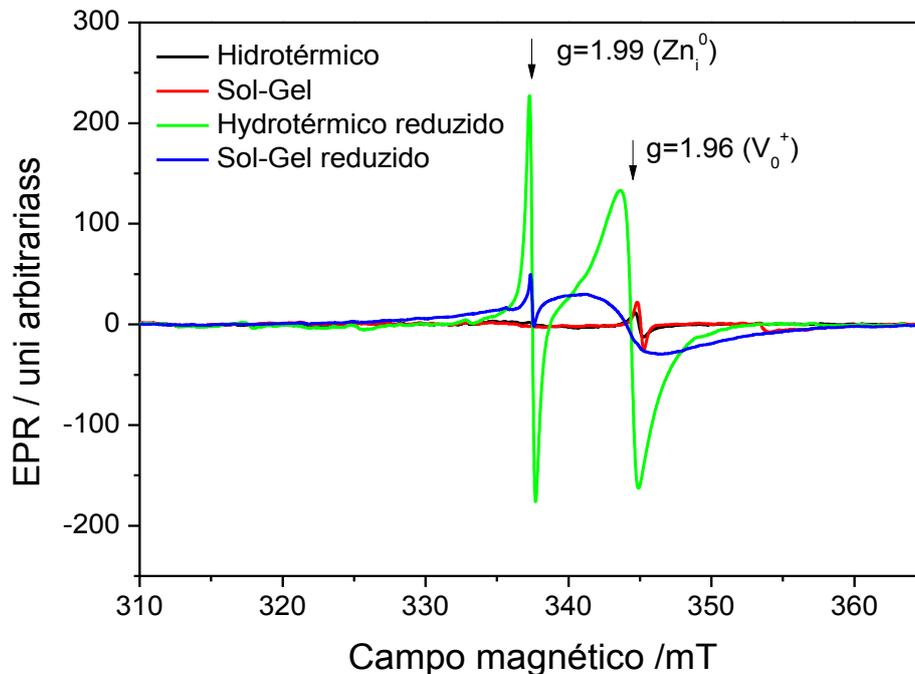
As vacâncias de oxigênio são definidas como defeitos na superfície de um cristal, a presença destes defeitos está relacionada com o aumento na capacidade fotocatalítica em óxidos metálicos e até mudanças de cor no caso de óxido de magnésio. Os defeitos podem atuar como doadores ou receptores de carga. Esta capacidade esta sustentada na natureza própria dos óxidos metálicos. Por exemplo o estado de oxidação do oxigênio em vários óxidos metálicos é de -2, se o oxigênio for retirado do cristal seus dois elétrons sairiam e em seu lugar ficaria uma vacância com uma carga de positiva de +2, que poderia puxar um elétron da banda de condução para ficar com uma carga de +1.

Ademais das mudanças nos estados de oxidação também se podem alocar elétrons desemparelhados nas cavidades das vacâncias que fornece a característica paramagnética (Anderson Janotti and Chris, 2009; Pacchioni, 2015). Essa característica paramagnética permite usar técnicas espectroscópicas como ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

Esta técnica baseia-se na absorção de radiação eletromagnética na região de microondas de materiais de moléculas com elétrons desemparelhados (Brandão, 2008). O EPR quantifica a densidade de vacâncias (defeitos) pela alta resolução da ordem ( $10^{12}$  spins) assim como alta sensibilidade e fácil uso em materiais semicondutores.

### 3.3 Ressonância paramagnética eletrônica

Na Figura 14 estão apresentados os espectros de ressonância paramagnética eletrônica de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.



**Figura 14** Espectros de ressonância paramagnética eletrônica de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.

O espectro de ressonância paramagnética das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelo método de sol-gel mostrou um sinal de ressonância de baixa intensidade em  $g=1,96$ ; que contrasta com as nanopartículas sintetizadas pelo método sol-gel com tratamento térmico redutor que mostraram duas sinais de ressonância em  $g=1,99$  e  $g=1,96$  de maior intensidade.

O espectro também mostrou que as nanopartículas sintetizadas pelo método hidrotérmico não tiveram sinal de ressonância em  $g=1,99$  mas mostrou uma sinal de baixa intensidade em  $g=1,96$ . Verificou-se ainda que as nanopartículas da síntese hidrotérmica reduzidas mostraram dois sinais de ressonância com maior intensidade quando comparada aos materiais não reduzidos.

A origem dos sinais de EPR para óxido de zinco (ZnO) é um tema de controvérsia na literatura, porém existe consenso em definir os sinal de  $g=1,96$  relacionado à vacância de

oxigênio (Djurišić et al., 2004; McCluskey and Jokela, 2009) e  $g= 1,99$  relacionado à zinco intersticial (Zhang et al., 2009).

O tratamento térmico redutor mostrou um efeito sobre os dois tipos de sínteses, aumentando a intensidade dos sinais de ressonância definidas para vacâncias de oxigênio e zinco intersticial, resultados que coincidem com os estudo de fotoluminescência, onde os materiais reduzidos mostraram maior intensidade, relacionada com maior densidade de defeitos de superfície, resultados similares são descritos na literatura (Drouilly et al., 2012).

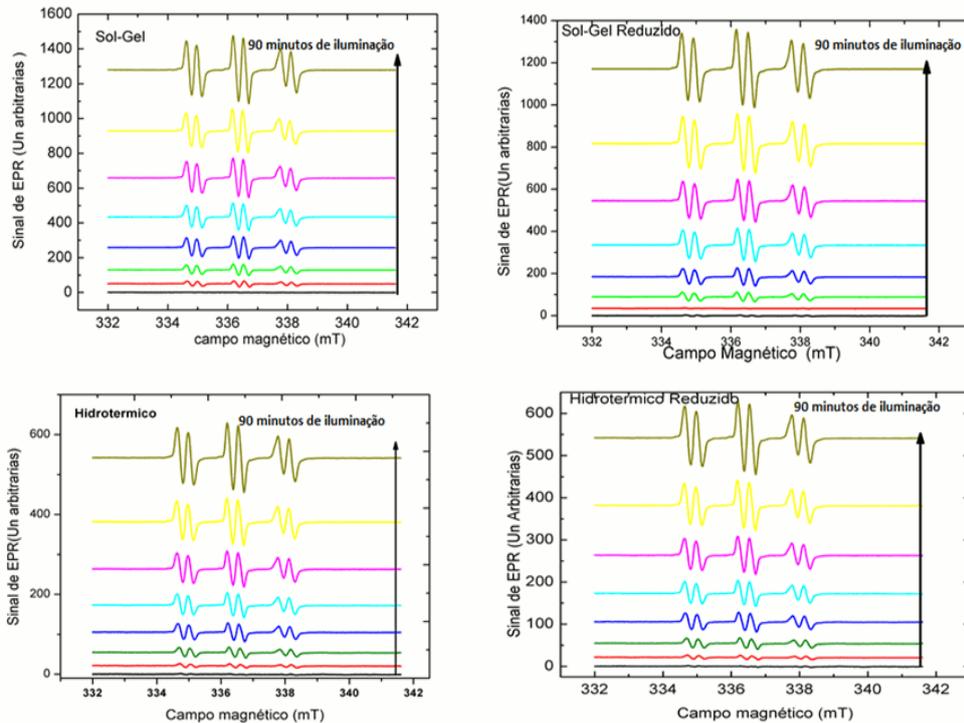
A literatura relata que a presença desses defeitos na superfície das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ZnO melhora a capacidade de produção de diferentes espécies reativas de oxigênio tais como radical hidroxila  $\bullet\text{OH}$ , oxigênio singlete  $^1\text{O}_2$  e peróxido de hidrogênio  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Sirelkhatim et al., 2015).

### 3.4 EPR- “Spin Trap”

Além do estudo de ressonância foram avaliadas também as propriedades fotofísicas e fotoquímicas das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico usando a técnica de EPR “spin-trap”.

“Spin-trap” é uma técnica de alta sensibilidade e eficácia usada na detecção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio se caracterizam pela alta reatividade e tempo de vida média curto, dificultando as medições em solução. Para solucionar este problema têm sido usados moléculas diamagnéticas como armadilhas que reagem com as espécies radicais formando um produto paramagnético conhecido como “spin adduct” ou aduto de “spin”. O “aduto de spin” pode ser medido por espectroscopia de ressonância magnética eletrônica (EPR). Existem diferentes moléculas armadilha como  $\alpha$ -fenil-N-terbutil nitrona PBN, 4 hidroxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina TEMP, 5,5 dimetil-1-pirrolina-N-óxido DMPO que são compostos com grupos funcionais nitro e nitroso.

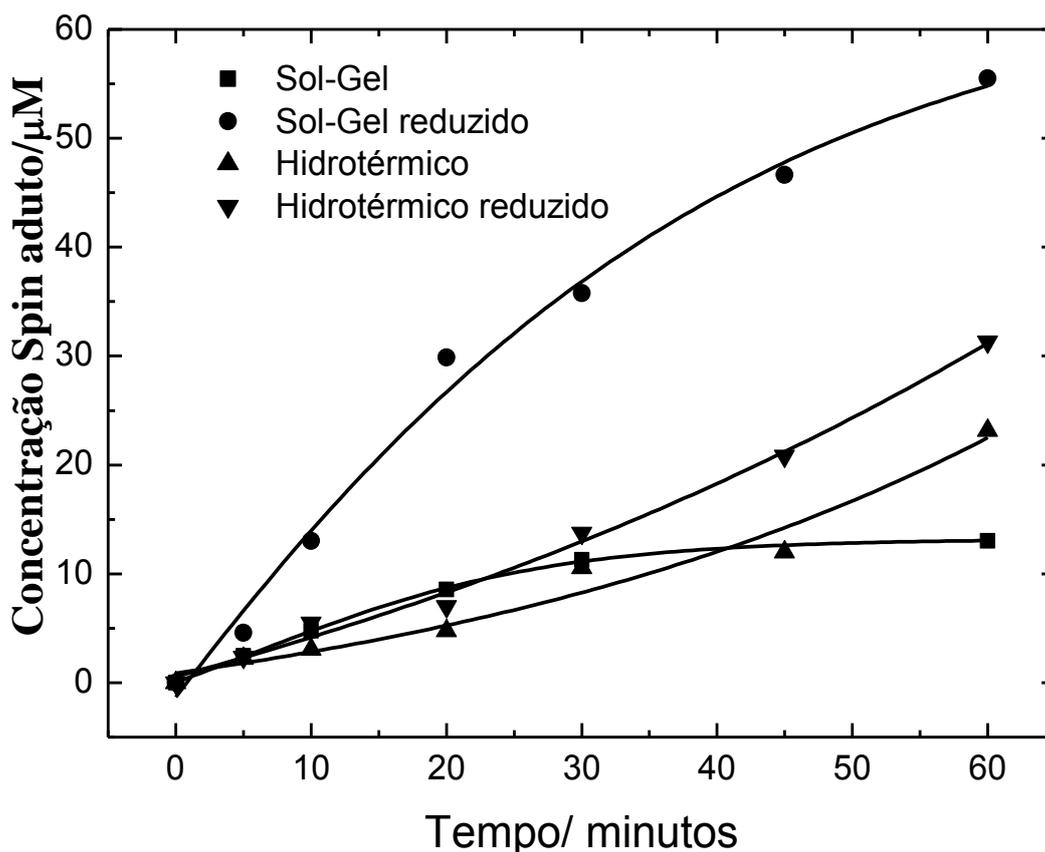
Neste estudo foram usadas moléculas armadilhas como PBN para detectar radical hidroxila, e TEMP para detectar a presença de oxigênio singlete. Na Figura 15 estão apresentados os espectros de EPR “spin-trap” com PBN para as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel e hidrotérmico com e sem tratamento térmico.



**Figura 15** Espectro de EPR das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico em água-etanol e PBN em diferentes tempo de iluminação.

Analisando a Figura 15 observou-se um padrão similar nos espectros composto por 6 linhas que se originam a partir do acoplamento hiperfino do “spin” eletrônico e do “spin” nuclear com o núcleo  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ ). Contudo cada um dos tripletos hiperfinos  $S = 1$  é dividido ainda mais, por uma interação hiperfina com o “spin” nuclear do próton adjacente  $\text{H}\beta$  ( $I = 1/2$ ). Foram feitas simulações dos espectros usando os seguintes parâmetros  $g = 2,005(1)$  e  $a_N = 1,59(2)$  mT e  $a_H = 0,35(5)$  mT. Esses Hamiltonianos de “spin” são típicos para o aduto de hidroxilo-PBN  $\text{PBN}\cdot\text{OH}$  (Buettner, 1987).

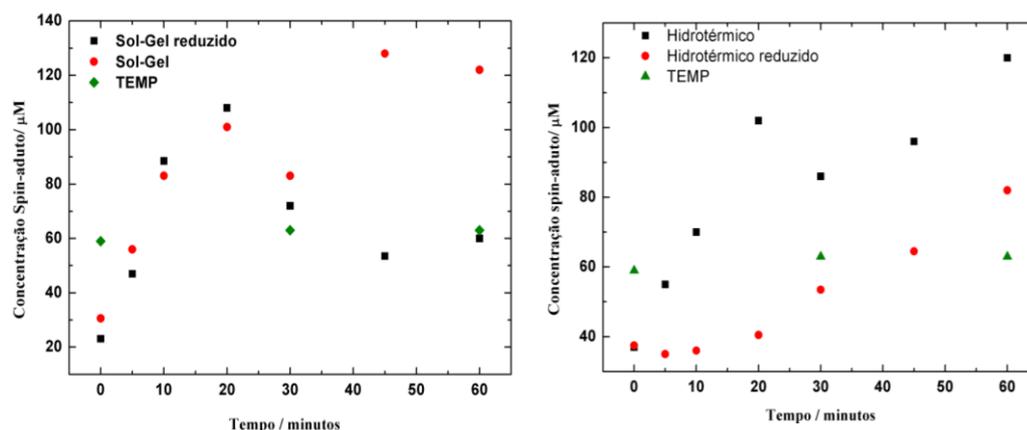
Com objetivo de mostrar mais detalhes de produção de radicais livres em função do tempo de iluminação foram feitos os gráficos das cinéticas de produção de radical hidroxila. Na Figura 16 estão apresentadas as cinéticas de produção de radical hidroxila das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel e hidrotérmico com e sem tratamento térmico usando a molécula armadilha PBN.



**Figura 16** Cinética de produção de aduto PBN-OH• em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico.

A Figura 16 mostrou os adutos de “spin-trap” PBN-OH• para as diferentes nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) quantificados por dupla integração dos espectros de EPR e comparados com amostras padrões conhecidos. Verificou-se uma maior intensidade com o aumento do tempo de iluminação em todas as amostras. Destacando-se maior intensidade nas amostras reduzidas especialmente no material sol-gel reduzido.

Experimentos similares foram feitos com a molécula armadilha TEMP específica para oxigênio singleto. Na Figura 17 são apresentadas as cinéticas de produção de oxigênio singleto por nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos de sol-gel e hidrotérmico com e sem tratamento térmico em diferentes tempos de iluminação.



**Figura 17** cinética e produção do aduto TEMP-<sup>1</sup>O<sub>2</sub> de nanopartículas de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico.

Analisando a cinética de produção de oxigênio singleto observou-se que adutos formados pela interação TEMP-<sup>1</sup>O<sub>2</sub> não mostraram uma relação direta com o tempo de iluminação. A concentração dos adutos não aumentou uniformemente com o tempo de iluminação, sugerindo que <sup>1</sup>O<sub>2</sub> não é produzido por este processo (Rosenthal et al., 1987).

A partir dos resultados de EPR “spin-trap” pode-se inferir claramente o domínio do processo fotofísico de tipo II, que está baseada na formação de espécies reativas de oxigênio pelo processo elétron-buraco, preferencialmente de radical hidroxila. Destacando-se maior produção de radicais nos materiais reduzido especialmente nos materiais produzidos pelo método sol-gel, corroborando os resultados dos estudos de fotoluminescência e EPR (Figuras 13 e 14).

### 3.5 Avaliação microbiológica

Visando avaliar as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizadas pelos métodos sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico, foram feitos testes antimicrobianos frente as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *E. carotovora* e *Pantoea sp*. Na tabela 3 estão apresentados os resultados do teste antimicrobiano qualitativo usando a metodologia de difusão em ágar.

**Tabela 3** Halo de inibição (mm) das bactérias *E coli*, *S aureus*, *E carotovora* e *Pantoea sp* usando nanopartículas de óxido zinco (ZnO) (25 mg.ml<sup>-1</sup>)

Nanopartícula	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. Carotovora</i>	<i>Pantoea sp</i>
Sol-Gel	11,0± 0,6	15,0 ± 2,0	30,0 ± 3,6	27,3± 2,5
Hidrotérmico	9,3± 1,4	13,0 ± 0,9	28,0± 2,6	29,0± 4,0

Na tabela 3 observou-se formação de halos de inibição nas bactérias testadas. O tamanho dos halos de inibição variou com o tipo de bactéria, evidenciando-se uma maior susceptibilidade nas duas bactérias fitopatogênicas quando comparadas com *E. Coli* e *S. aureus* as quais mostraram formação de halos de inibição menores. Esses resultados estão de acordo com a literatura (Azam et al., 2012; Navale et al., 2015).

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) é atribuída a diferentes processos como o efeito abrasivo das nanopartículas sobre as paredes bacterianas e membranas plasmáticas que afetam a fluidez da membrana produzindo ruptura e extravazamento do conteúdo intracelular (Liu et al., 2009). A eficiência antimicrobiana destas dispersões depende de vários fatores como tipo de bactéria, tempo de exposição e tipo de médio de cultura onde é feita a dispersão (Pasquet et al., 2014).

O efeito tóxico do  $Zn^{2+}$  está dado pela capacidade de substituir e quebrar os clusters de Fe-S que fazem parte das proteínas de transporte de elétrons afetando o processo de respiração em células procariotas. Além de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (Lemire et al., 2013).

Os resultados obtidos demonstraram a susceptibilidade das bactérias às nanopartículas de óxido de zinco (ZnO). Também foi avaliado o efeito antimicrobiano por ação da atividade fotocatalítica, foram feitos ensaios de concentração mínima inibitória usando dispersões dos dois métodos de síntese com e sem tratamento térmico usando concentrações entre  $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a  $0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

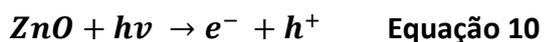
Na Tabela 4 são apresentados os resultados do teste da concentração inibitória mínima das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico com 4 h de iluminação com luz UV. A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada pelo método colorimétrico de resazurina (Manzoor et al., 2016)

**Tabela 4** Concentração mínima inibitória (MIC) de óxido de zinco (ZnO) em mg·mL<sup>-1</sup> por efeito fotocatalítico frente as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *E. carotovora* e *Pantoea sp.*

Tipo de síntese	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. carotovora</i>		<i>Pantoea sp</i>	
	Concentração ZnO mg·mL <sup>-1</sup>	Inibição do crescimento %	Concentração ZnO mg·mL <sup>-1</sup>	Inibição do crescimento %	Concentração ZnO mg·mL <sup>-1</sup>	Inibição do crescimento %	Concentração ZnO mg·mL <sup>-1</sup>	Inibição do crescimento %
<b>Sol-Gel</b>	1,5	65	1,5	83	1,5	78	1,0	88
<b>Hidrotérmico</b>	1,0	85	1,5	90	1,0	90	1,0	96
<b>Sol-Gel reduzido</b>	0,1	90	0,1	90	0,1	90	0,1	90
<b>Hidrotérmico reduzido</b>	0,1	84	0,1	87	0,1	90	0,1	89

Analisando os resultados da Tabela 4 foram encontradas altas porcentagens de inibição de crescimento nas bactérias testadas que variou pelo tipo de bactéria e tipo de sínteses. As nanopartículas obtidas pelo método hidrotérmico mostraram uma ligeira eficiência na inibição do crescimento das baterias comparado com o método sol-gel. Possivelmente influenciado pelo menor tamanho e maior área de superfície, resultados similares são descrito na literatura (Lakshmi Prasanna and Vijayaraghavan, 2015).

Comparando os MIC das nanopartículas com e sem tratamento térmico, encontrou-se uma maior eficiência nos materiais reduzidos, conseguindo inibir o crescimento das bactérias usando 15 vezes menos massa quando comparado com as nanopartículas oxidadas. A capacidade antimicrobiana por efeito fotocatalítico de óxidos metálicos nanoparticulados como óxido de zinco (ZnO) está sustentada na competência destes materiais de fornecer espécies reativas de oxigênio em presença de luz UV. Neste processo elétrons da banda de valência são transferidos para banda de condução produzindo elétrons-buracos com capacidade oxidante-redutora respectivamente como se apresenta na equação 10.



Onde

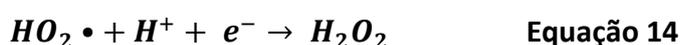
hv= luz na região ultravioleta

e= eletrons com capacidade redutora

h+= buracos com capacidade oxidante.

A capacidade fotocatalítica, ademais de ser influenciada por características físicas como mencionadas acima, também é afetada por outros parâmetros, como a quantidade de defeitos doadores de superfície que tem alta influencia na atividade antimicrobiana.

Mesmo que nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) reduzidas tenham menor área superficial, em compensação apresentaram uma concentração maior de defeitos superficiais como vacâncias de oxigênio e zinco intersticial, porém maior capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio, explicada pelo aumento de núcleos fotocatalíticos na superfície das partículas, permitindo a formação de diferentes tipos de espécies reativas de oxigênio como mostrado nas equações 11, 12, 13 e 14.



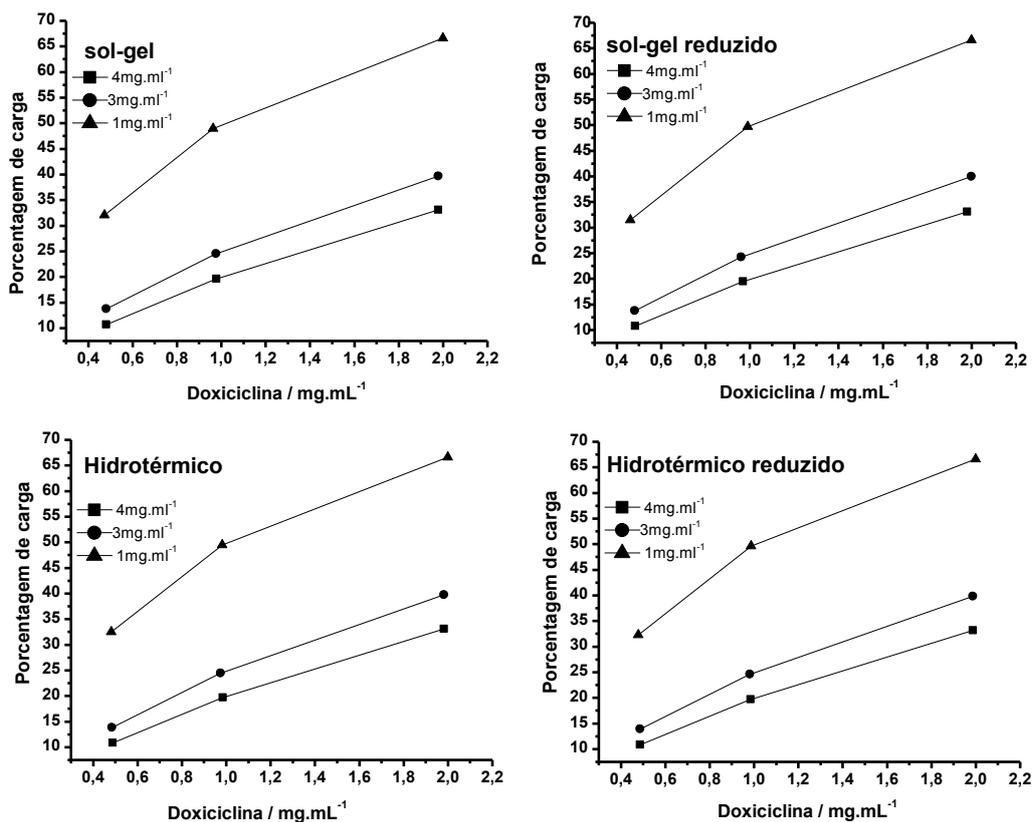
Essa hipótese foi confirmada com os experimentos de PBN e luz UV (Figura 16), que mostraram claramente maior eficiência na produção de radicais hidroxila nas nanopartículas reduzidas, sem excluir completamente a formação de outras espécies radicais, como por exemplo oxigênio singlete não é diretamente produzido por processo fotofísico de tipo II, sua formação pode ser explicada por um mecanismo intermediário que envolve a formação inicial do radical hidroxila como intermediário.

Estudos recentes relatam a formação de outras espécies reativas de oxigênio em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) como  $\bullet\text{O}_2^-$  com rendimentos superiores de 10 e 17 vezes ao próprio radical  $\bullet\text{OH}$  (Li et al., 2012), como a formação de outras espécies oxidantes, como a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Xu et al., 2013). Os quais são responsáveis pelos processos de oxidação de biomoléculas como DNA, proteínas e ácidos nucleicos que promovem peroxidação lipídica e vazamento de conteúdo intracelular em células procarióticas (Li et al., 2012) (Liu et al., 2013). Além do efeito antimicrobiano das nanopartículas de óxido de Zinco (ZnO) por efeito fotocatalítico também foi avaliada a capacidade de adsorção e tempo de desorção de doxiciclina nas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO).

### **3.6 Adsorção e dessorção de Doxiciclina**

Na Figura 18 estão apresentados os resultados de adsorção de doxiciclina em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.

Analisando a Figura 18 encontrou-se o mesmo padrão de adsorção em todas as nanopartículas avaliadas, encontrando-se maior eficiência na adsorção de doxiciclina nos tratamentos com menor massa de nanopartículas dos métodos de síntese de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.



**Figura 18** Curvas de adsorção de doxiciclina em nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com e sem tratamento térmico.

A literatura reporta uma variada lista de materiais cerâmicos usados como sistemas de liberação controlada como hidroxiapatita, partícula de sílica mesoporosa, óxidos metálicos e nanopartículas de carbonato de cálcio. Diferentes parâmetros incidem na capacidade de carregamento de fármaco destes sistemas, como o alto volumen de poro, alta área de superfície, funcionalização de superfície e no caso específico da sílica mesoporosa alta periodicidade dos tamanhos nos poros (Vallet-Regí et al., 2007).

Analisando os resultados de área de superfície e porosidade das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) Figuras (9 e 10), esperava-se maior capacidade de adsorção em nanopartículas da síntese hidrotérmica por sua maior área e maior volume de poro; uma menor adsorção nos materiais submetido a tratamento térmico pelo efeito da sinterização que diminui a área de superfície e volumen do poro, mas todos os materiais mostraram o mesmo padrão de adsorção sem importar as diferenças de tamanho, porosidade e área de superfície.

Esses resultados podem ser explicados pelas interações de par iônico entre as cargas negativas das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e as cargas positivas de doxiciclina.

Com o objetivo de demonstrar essas hipóteses foram feitos experimentos de titulação das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) com a doxiciclina usando os valores de potencial Z como apresentado na Tabela 5.

**Tabela 5 Potencial Z de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) antes e depois da carga de doxiciclina.**

Método de síntese	Potencial Z /(mV)	
	ZnO	ZnO-DOX
Sol-Gel	-27,8	-2,75
Hidrotérmico	-33,9	-21,1
Sol-Gel reduzido	-33,8	-10,4
Hidrotérmico reduzido	-35,3	-9,31
Doxiciclina	15,1	

Analisando os resultados da Tabela 5, verifica-se valores negativos de potencial Z em todas as nanopartículas avaliadas com e sem tratamento térmico. Valores que foram se tornando menos negativos mostrando uma diminuição da carga nos compósitos Zn-doxiciclina. É bem conhecido que o ponto isoelétrico de óxido de zinco (ZnO) está em torno de pH 9,0 esta condição proporciona uma carga negativa na superfície das nanopartículas. O resultado pode ser explicado pela presença de grupos hidroxila na superfície, como se descreve no seguintes equilíbrios (Bahnemann et al., 1987).



A presença dos grupos hidroxila proporciona cargas negativas encontradas nas nanopartículas que junto com a carga positiva da doxiciclina, permite interações eletrostáticas entre ZnO-doxiciclina, refletindo na diminuição da carga nos compósitos ZnO-doxiciclina quando comparadas com as nanopartículas puras. Essas diferenças de carga permitiram as nanopartículas se comportarem como esponjas com alta capacidade de adsorver eficientemente fármacos catiônicos como doxiciclina, o que explica uma maior influência do

potencial Z no processo de adsorção de doxiciclina sobre outras varáveis como tamanho, área de superfície e porosidade.

Na Figura 19 são apresentados os perfis de liberação de doxiciclina usando como matrizes nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) sintetizados pelos métodos de sol-gel e hidrotérmico com e sem tratamento térmico.

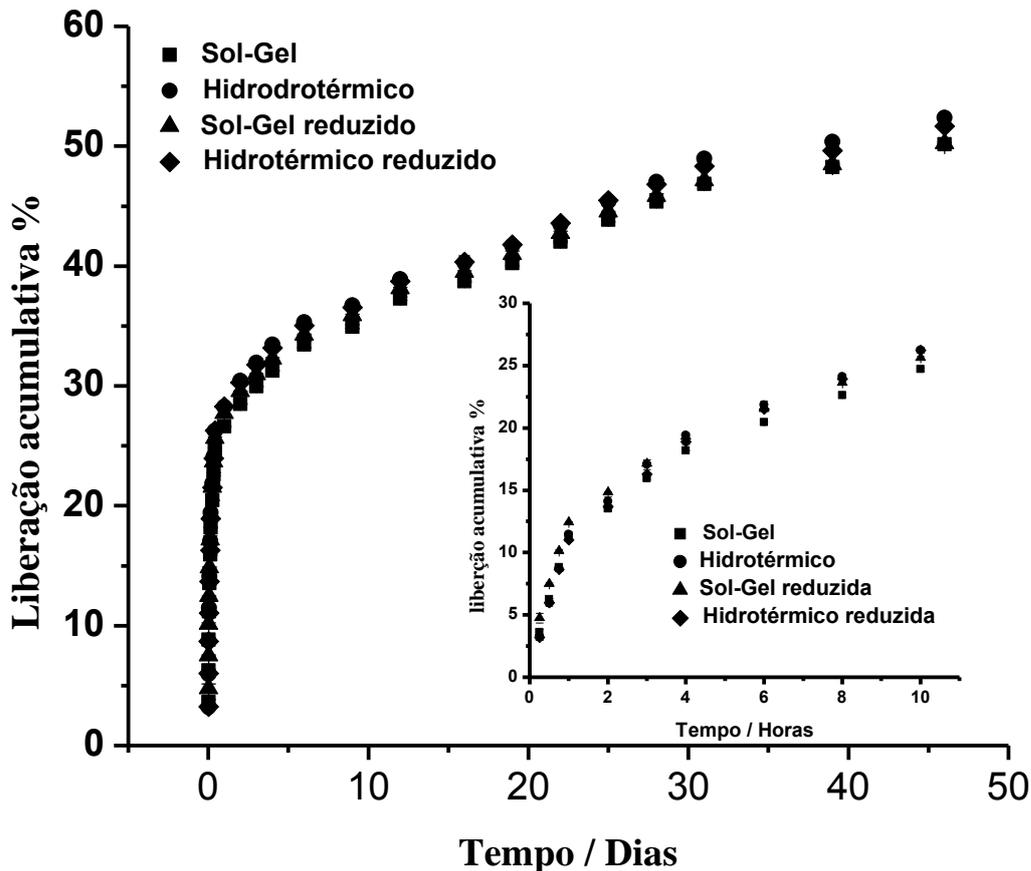
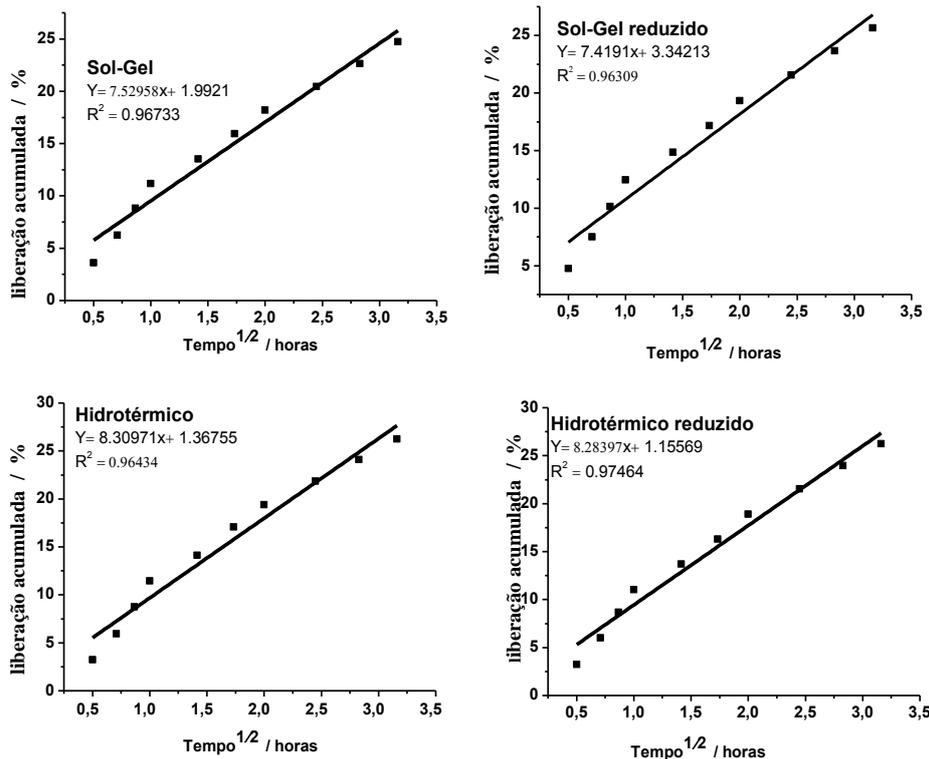


Figura 19 Curvas de liberação de doxiciclina usando como matrizes nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de síntese sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.

Analisando a Figura 19 verifica-se o mesmo padrão de liberação em todos os materiais testados indiferentemente do tipo de síntese. A curva mostra dois domínios, o primeiro aconteceu nas primeiras 10 horas de avaliação onde foi liberado 25% do fármaco (Ver Recuadro Figura 20); seguido pelo segundo domínio que estendeu até o dia 47 liberando aproximadamente 50% do fármaco. Os resultados obtidos podem ser explicados pelas interações eletrostáticas entre a superfície aniônica das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e a natureza catiônica da doxiciclina, os quais coincidem com a diminuição do potencial

Z observados nos compósitos ZnO-doxiciclina sugerindo um comportamento de nano-esponja dos materiais.

Com os dados das cinéticas durante as primeiras 10 horas de liberação foram estudados os possíveis modelos de liberação de doxiciclina. Na Figura 20 são apresentados os modelos de ajuste dos dados de liberação de doxiciclina usando como matrizes nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) obtidas pelos métodos de sol-gel, hidrotérmico com e sem tratamento térmico.



**Figura 20 Perfis de liberação de doxiciclina de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) ajustado com o modelo de Higuchi.**

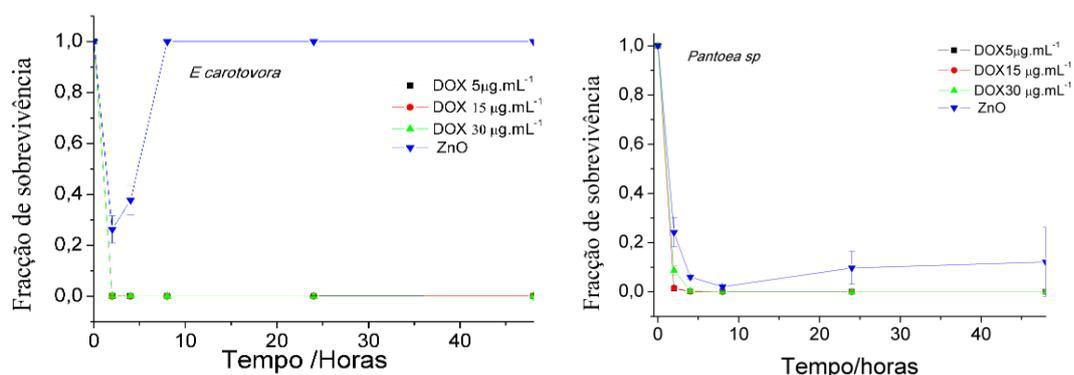
Analisando os resultados da cinética de liberação os materiais se ajustaram melhor ao modelo de Higuchi. Este modelo assume uma distribuição uniforme do fármaco sobre a superfície das nanopartículas conhecidas como sistemas monolíticos. O processo de liberação acontece por processo de difusão dos poros do sistema para o meio de liberação; processo baseado no modelo de Fickian que descreve um perfil de liberação linear de primeira ordem característica de matrizes porosa. Esse modelo tem sido descrito para outras matrizes inorgânicas como sílica mesoporosa e nanopartículas de ZnO-MgO (Kumar et al., 2015; Bouchoucha et al., 2016).

### 3.7 Cinética antimicrobiana

Comprovada a capacidade das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) como matriz de liberação de doxiciclina, realizou-se um teste para relacionar o controle na liberação por largos períodos de tempo de doxiciclina com a atividade antimicrobiana frente as bactérias fitopatogénicas como *E. carotovora* e *Pantoea sp.*

Para realizar o ensaio de cinética antimicrobiana das nanopartículas carregando doxiciclina foram utilizadas 3 concentrações a partir da concentração mínima inibitória encontrada que foi  $5,93 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  que são menores aos relatados na literatura (McManus and Jones, 1994; Medina et al., 2004).

Na Figura 21 são apresentados os resultados de sobrevivência das bactérias avaliadas durante 48 horas com nanopartículas de ZnO-doxiciclina.



**Figura 21** Curvas de morte das bactérias *E. carotovora* e *Pantoea sp* usando nanopartículas de ZnO-doxiciclina.

Analisando a Figura 21 verifica-se uma alta atividade antimicrobiana nas duas bactérias testadas, nas três concentrações testadas. A porcentagem de sobrevivência foi baixa em torno de 1% nas três concentrações durante o período avaliado. Observou-se uma maior sensibilidade no tratamento em *Pantoea sp* quando comparada com *E. carotovora*. O tratamento com óxido de zinco (ZnO) puro sem doxiciclina também mostrou maior atividade antimicrobiana em *Pantoea sp* em comparação a *E. carotovora*. Os resultados confirmam que as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) carregando doxiciclina conseguem manter o efeito antimicrobiano mais tempo em torno do MIC. Este tipo de matriz evitaria aplicações periódicas do fármaco (Gao et al., 2011), como também eventos de resistência e intoxicação das plantas tratadas (Zhang et al., 2014).

## **Capítulo 4**

# **Preparação e caracterização físico-química de nanopartículas poliméricas carregadoras de curcumina**

## **Resultados e Discussão**

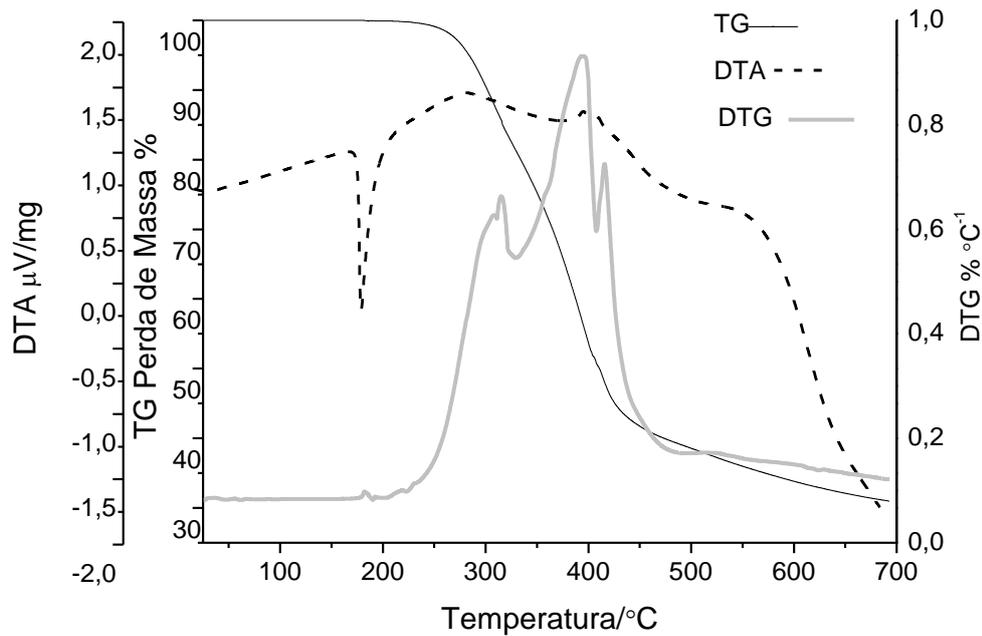
Serão apresentados os resultados da dispersão sólida amido-curcumina e do sistema nanoparticulado alginato-quitosana carregando amido-curcumina. Inicialmente foram preparadas dispersões sólidas de amido-curcumina usando a técnica de secagem por aspersão para melhorar a solubilidade da curcumina em água. Esse material foi usado como matéria prima na preparação de nanopartículas poliméricas de alginato-quitosana carregando curcumina. Os materiais de partida e os sistemas obtidos foram caracterizados usando diferentes técnicas físico-químicas como análise térmica, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, difração de raios X e espalhamento de luz dinâmico. A eficiências de encapsulamento e as cinéticas de liberação foram estudadas por espectroscopia na região do UV. Finalmente foi avaliada a atividade antimicrobiana usando a metodologia de dispersão em ágar.

### **4.0 Caracterização Físico-química dos materiais de partida**

A seguir serão apresentados os resultados de análise termogravimétrica, espectroscopia de absorção na região de infravermelho e difratogramas de raios X.

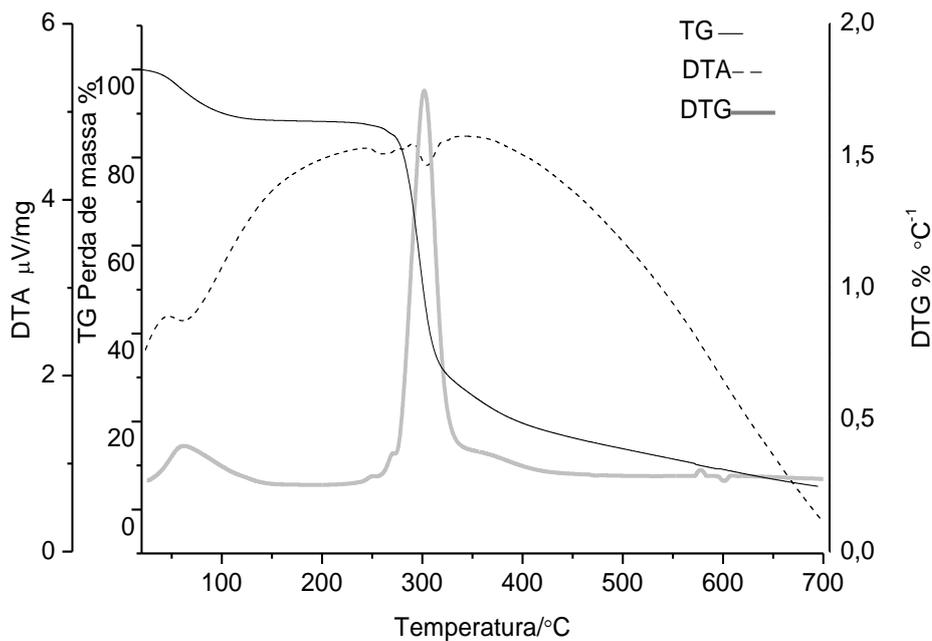
#### **4.1.1 Análise térmica**

Na Figura 22 estão apresentadas as curvas TG, DTG e DTA da curcumina. Analisando a curva TG verifica-se um patamar de estabilidade térmica no intervalo 25°C até aproximadamente 204°C.



**Figura 22** Curvas TG, DTG e DTA de curcumina em N<sub>2</sub>.

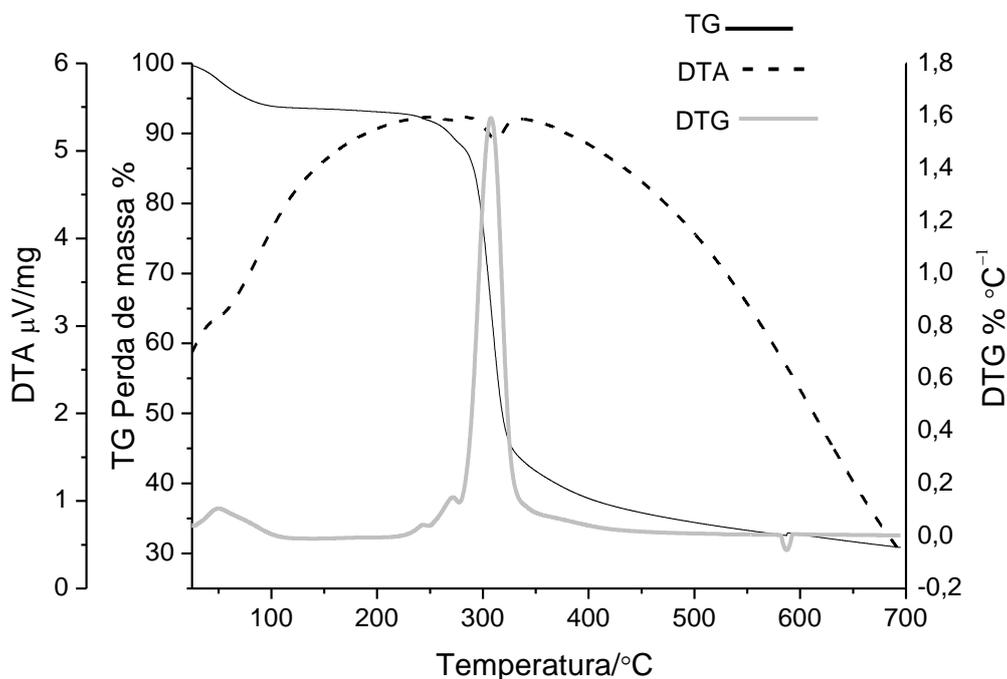
Na curva TG observa-se um evento de perda de massa entre 204°C – 700 °C associado à decomposição da molécula (Chen et al., 2014). A curva DTA da curcumina mostra um pico endotérmico em 188 °C associado ao ponto de fusão da curcumina (Jasim and Talib, 1992). Na Figura 23 estão apresentadas as curvas TG, DTA e DTG do amido (Am). Analisando a curva TG verifica-se um evento de perda de massa de 10% entre 25°C- 113°C. Na curva DTA a a 60°C observa-se um pico exotérmico atribuído a eventos de desidratação.



**Figura 23** Curvas TG, DTG e DTA de amido em N<sub>2</sub>.

Seguido de um patamar de estabilidade térmica até 227°C. Observou-se um segundo evento de perda de massa a 296°C associado a degradação da amilase e amilopectina. (Beninca et al., 2008). O terceiro evento de perda de massa corresponde a degradação de 97% da massa original resultado da oxidação total da matéria orgânica. Esses resultados coincidem com outros trabalhos relatados na literatura (Biliaderis et al., 1986; Colman et al., 2014).

Na Figura 24 estão apresentadas as curvas TG, DTA e DTG da solução sólida amido-curcumina (Am-Cur). Analisando a curva TG verifica-se um perfil semelhante ao encontrado no amido solúvel. A curva TG mostra uma pequena perda de massa de 6,2% entre 25-108°C. Verifica-se um patamar de estabilidade térmica 108°C a 231°C, similar ao que foi encontrado na curva TG do amido.

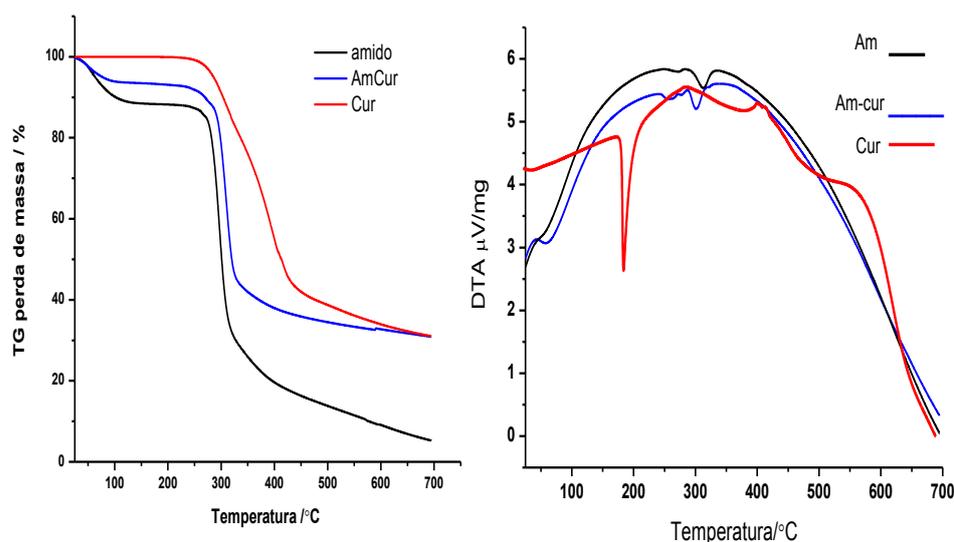


**Figura 24** Curvas TG DTG e DTA de amido-curcumina em N<sub>2</sub>.

Na curva TG de amido-curcumina observa-se um fenômeno de perda de massa aproximadamente de 47% entre 231°C - 407°C, associado ao fenômeno de termo decomposição da solução sólida. Na curva DTA verificou-se um evento exotérmico a 307°C que coincide com a degradação do matriz amido.

Na Figura 25 são comparadas as curvas TG e DTA de amido (Am), solução sólida amido-curcumina (Am-Cur), e curcumina. Analisando as curvas TG se encontrou um padrão semelhante dos materiais de partida. Verificou-se um evento de perda de massa de 15% entre 25°C-130°C associado com perda de umidade. Seguido por um patamar de estabilidade térmica na faixa de 130°C -213°C. Verifica-se um segundo evento de perda de massa a 260 °C

que corresponde aproximadamente a 70 % do material. As curvas DTA mostraram padrões similares tanto para amido e solução sólida amido-curcumina. Com dois eventos endotérmicos nas temperaturas de 301°C e 310°C, respectivamente.

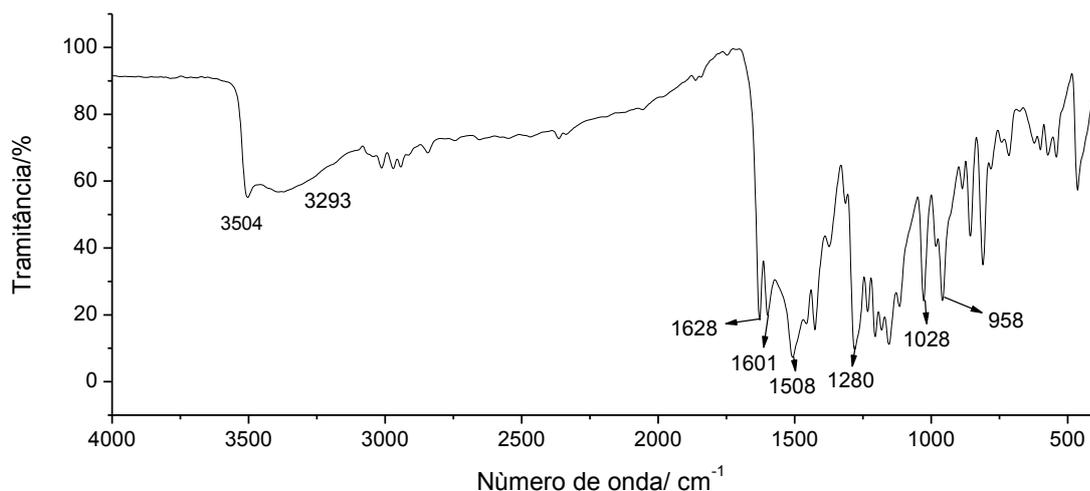


**Figura 25** Comparação das curvas TG e DTA de amido (Am), Amido-curcumina (Am- Cur) e curcumina pura (Cur).

A curva DTA de curcumina mostrou um pico endotérmico característico a 188°C relacionado com o ponto de fusão, o qual não foi observado na solução sólida amido-curcumina. Este resultado sugere uma completa dispersão da curcumina dentro da matriz amido.

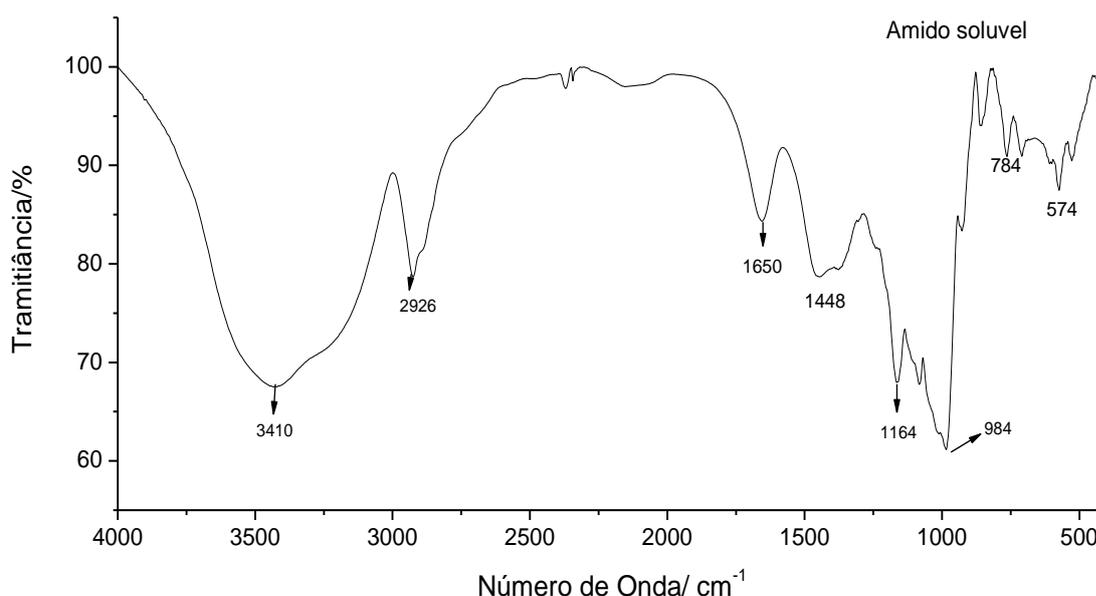
#### 4.1.2 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho

Na Figura 26 é apresentando o espectro de infravermelho da curcumina. Analisando o espectro observam-se a banda em 3504  $\text{cm}^{-1}$  atribuída ao grupos hidroxila  $\nu(\text{O-H})$  (Yallapu et al., 2010). Verifica-se a bandas de absorção em 1628  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem a vibração do grupo  $\nu(\text{C=O})$  (Kolev et al., 2005). Em 1601  $\text{cm}^{-1}$  a banda atribuída a ligações  $\nu(\text{C=C})$  dos anéis aromáticos. A banda em 1508  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada a vibrações  $\nu(\text{C=O})$  e ligações  $\nu(\text{C=C})$ . Em 1028 e 950  $\text{cm}^{-1}$  encontra-se as bandas referentes aos grupos  $\nu(\text{C-O-C})$  e  $\nu(\text{C-H})$  dos anéis aromaticos respectivamente (Kolev et al., 2005; Mohan et al., 2012).



**Figura 26 Espectro de absorção na região infravermelho de curcumina.**

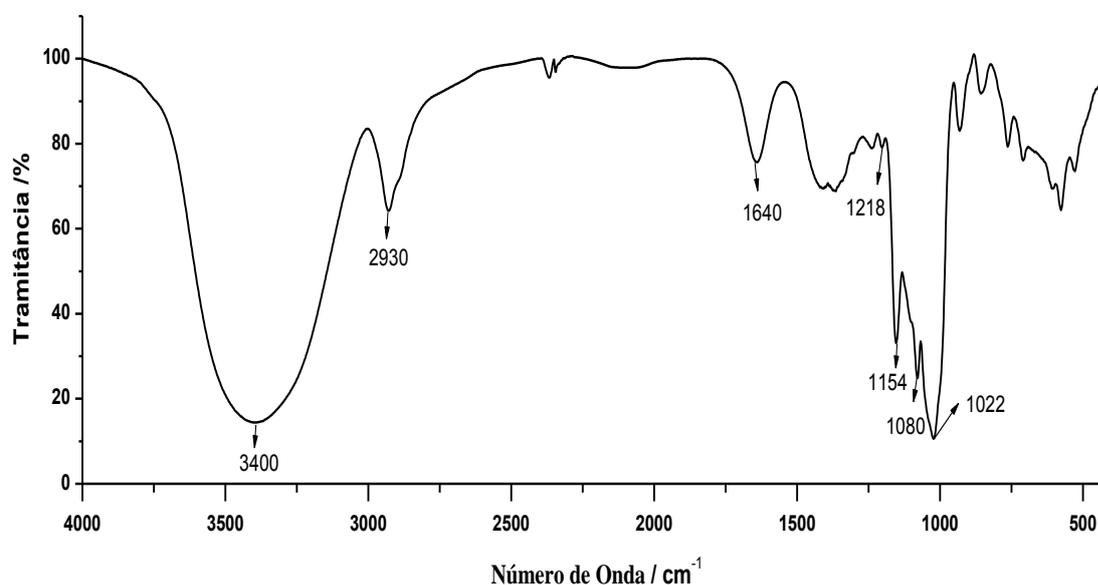
Continuando com a caracterização físico-química dos materiais de partida apresenta-se na Figura 27 o espectro de absorção na região de infravermelho do amido.



**Figura 27 Espectro de absorção na região de infravermelho de amido.**

O espectro de infravermelho dos polissacarídeos, apresentam três regiões importantes, a primeira região compreendida entre 3600-3000  $\text{cm}^{-1}$  correspondente a vibrações dos grupos  $\nu(\text{O-H})$ . Entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  observa-se estiramentos do grupo  $\nu(\text{C-H})$ . A banda observada em 1650  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a moléculas de água. A banda em 1448  $\text{cm}^{-1}$  está relacionada aos estiramentos de grupos  $\nu(\text{CH}_2)$  e estiramentos dos grupos  $\nu(\text{C-O-O})$  do aneu de piranose. Em 984 e 784  $\text{cm}^{-1}$  observam-se as vibrações dos grupos  $\nu(\text{C-O-C})$  (Kizil et al., 2002; Pereira et al., 2013).

Na Figura 28 é apresentado o espectro na região de infravermelho da solução sólida amido-curcumina.

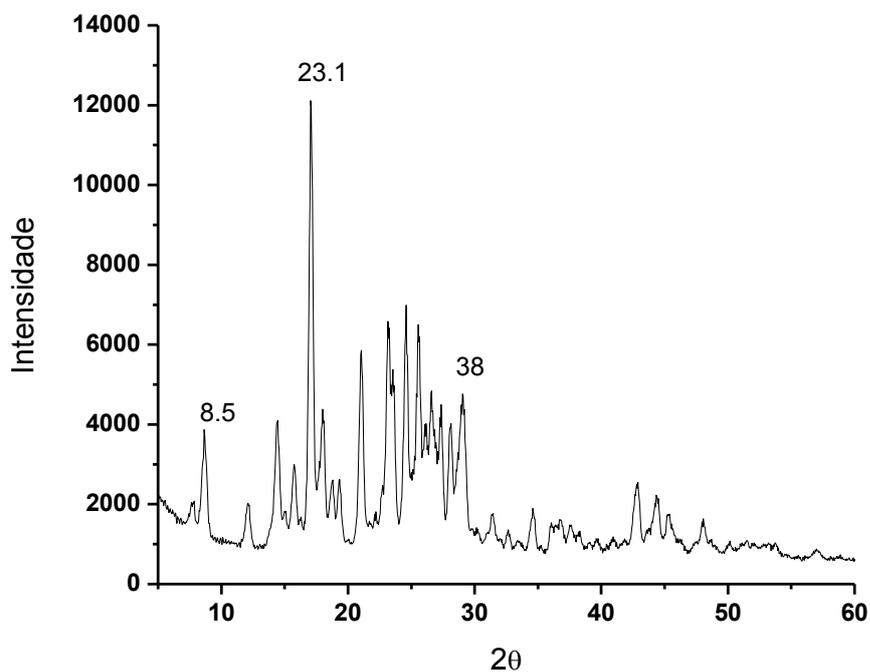


**Figura 28** Espectro de absorção na região de infravermelho amido-curcumina.

Observou-se as bandas características do amido e da curcumina. O espectro mostrou bandas na região entre 3400 e 2930  $\text{cm}^{-1}$  referentes aos grupos hidroxila e deformações  $\nu$  (C-H). Foram observadas bandas da curcumina em 1218  $\text{cm}^{-1}$  do estiramentos  $\nu$ (C-O-H). Em 1154  $\text{cm}^{-1}$  a banda do estiramentos  $\nu$ (C-O-H). Em 1022  $\text{cm}^{-1}$  bandas do estiramentos dos grupos  $\nu$ (C-O-C) e  $\nu$ (CH<sub>3</sub>) (Kolev et al., 2005). Estes resultados confirmam a presença de curcumina dentro da dispersão.

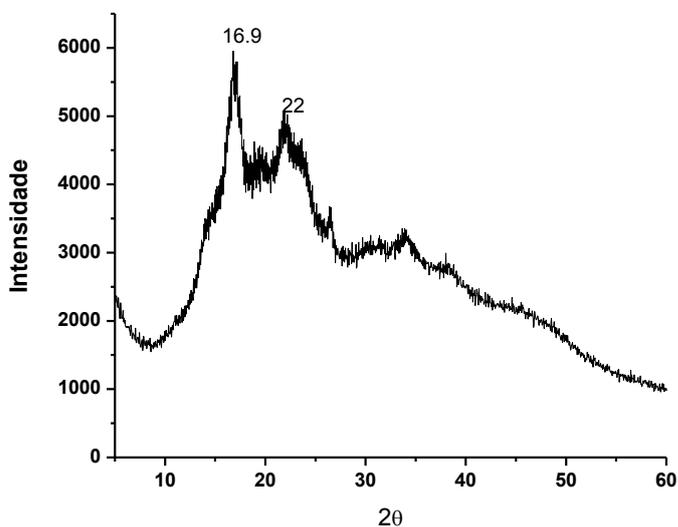
#### 4.1.3 Difração de raios X

Na Figura 29 apresenta-se o difratograma de raios X da curcumina. Verificou-se um padrão poli-cristalino característico desse material. Apresenta picos em 8,5, 17,05, 23,1, e 38 graus coincidindo com os resultados relatados na literatura (Yallapu et al., 2010).



**Figura 29 Difratoograma de raios X de curcumina.**

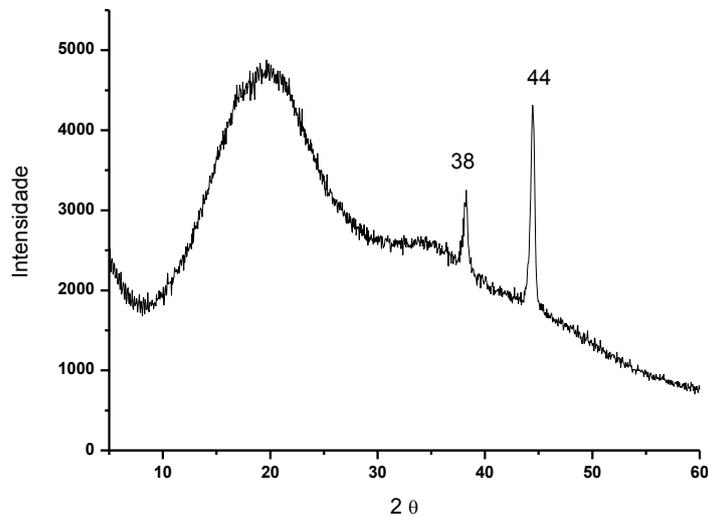
Na Figura 30 está apresentando o difratograma de raios X de amido com um padrão semi-cristalino. Encontrando-se dois picos em 16,9 e 22,0 graus (Allah et al., 1987).



**Figura 30 Difratoograma de raios X de amido.**

Na Figura 31 é apresentado o difratograma de raios X da solução sólida amido-curcumina. Observa-se um padrão semi-cristalino com a presença de dois picos em 38 e 44 graus característicos de curcumina. Estes resultados sugerem uma distribuição uniforme da

curcumina dentro do matriz amido, o qual é verificado na análise térmica e no espectro de infravermelho.



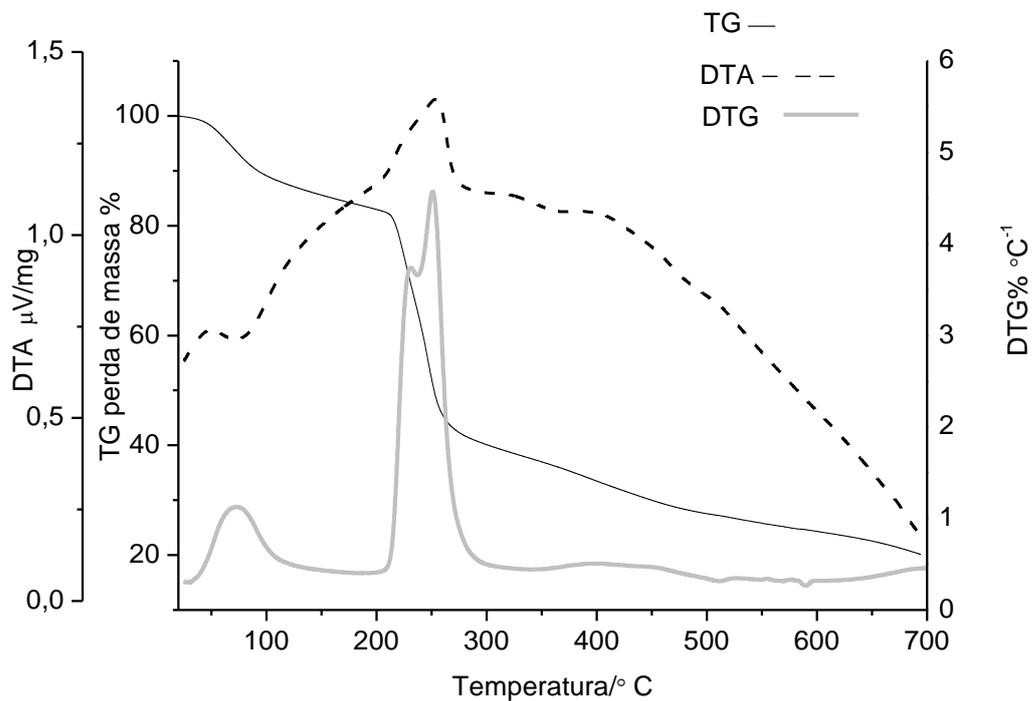
**Figura 31** Difratograma de raios X de amido-curcumina.

Outro estudo realizado na solução sólida amido-curcumina foi a quantificação de curcumina dentro do matriz amido utilizando a espectroscopia de absorção de UV-Vis. A concentração de curcumina dentro da solução sólida amido-curcumina foi de 90% da concentração inicial de curcumina. Com esse material foram feitos ensaios de solubilidade encontrando um aumento na solubilidade de curcumina em água de 12 vezes passando de  $7,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para  $92 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Kurien et al., 2007).

## **4.2 Sistema nanoparticulados alginato-quitosana carregando amido-curcumina**

### **4.2.1 Análise térmica**

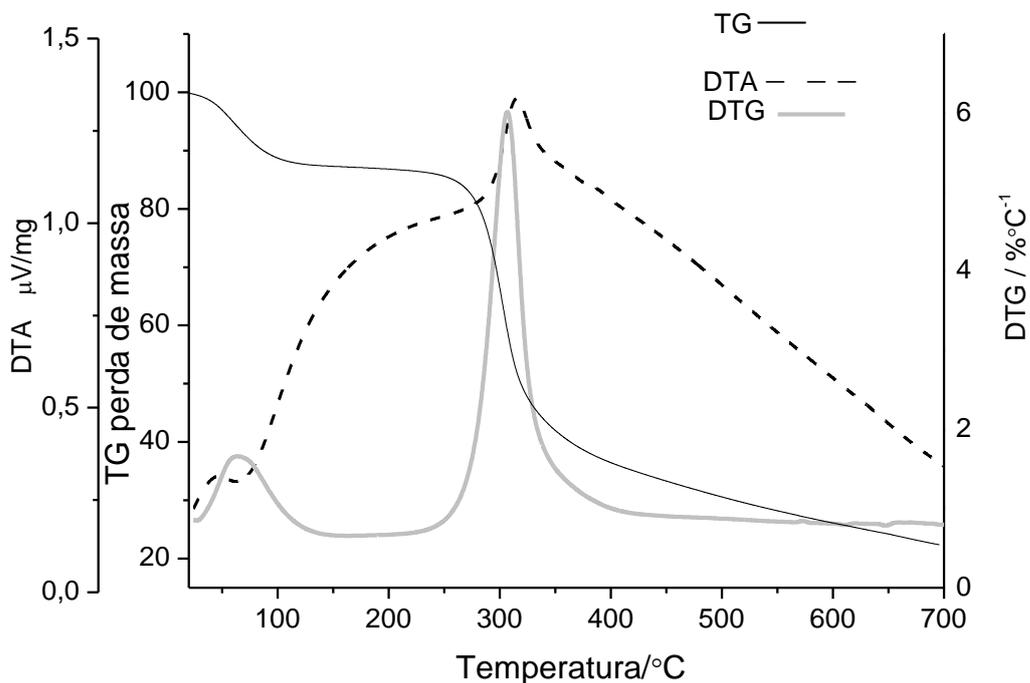
A seguir serão apresentados os resultados de caracterização dos materiais de partida e do sistema nanoparticulado alginato-quitosana. Na Figura 32 estão apresentadas as curvas TG, DTG e DTA de alginato de sódio.



**Figura 32** Curvas TG, DTG e DTA de alginato de sódio em N<sub>2</sub>.

Analisando a curva TG observa-se um processo de perda de massa 15% entre 25°C-180°C que corresponde a desidratação (Soares et al., 2004). Entre 178°C-305°C observa-se um evento de degradação térmica. Na curva DTA a 248°C encontra-se um pico exotérmico atribuído a eventos de despolimerização do alginato (Swamy et al., 2010)

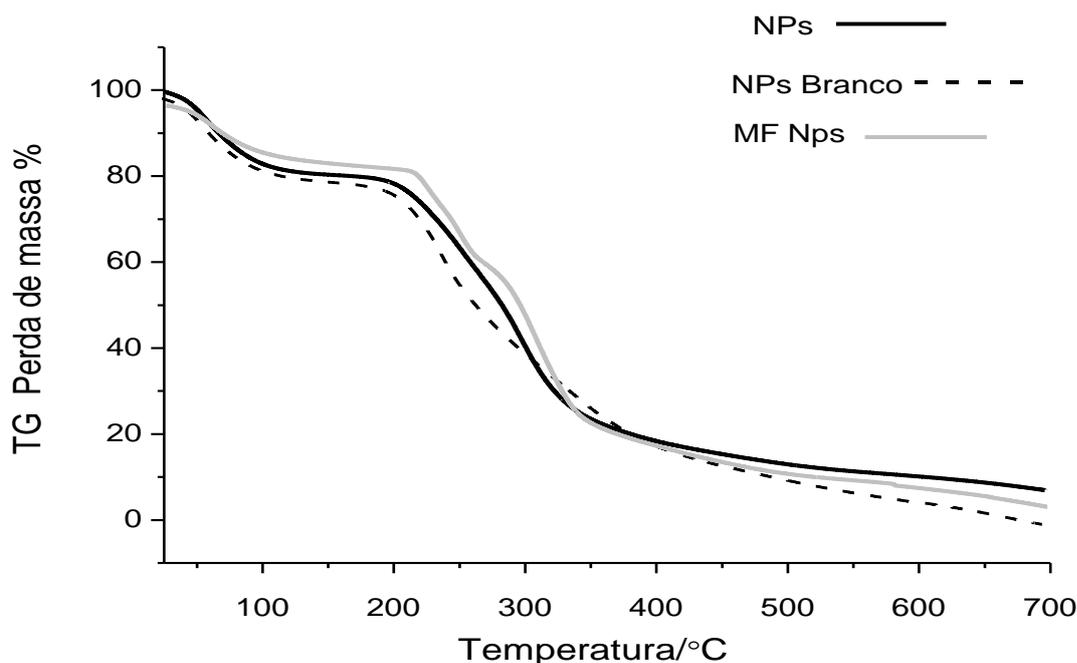
Na Figura 33 estão apresentadas as curvas TG, DTA e DTG da quitosana.



**Figura 33** Curvas TG, DTG, DTA de quitosana em atmófera de N<sub>2</sub>.

Analisando a curva TG pode-se observar uma perda de massa de 6 % associada a um evento endotérmico a 62°C relacionada a perdas de moléculas de água. Na curva TG observou-se um segundo evento a 301°C com perda de 32% de massa associada a degradação das moléculas do polímero quitina-quitosana (Pereira et al., 2013).

Na Figura 34 apresenta-se as curvas TG, das nanopartículas alginato-quitosana (Nps), nanopartículas branco (Nps branco) e mistura física do sistema (MF).



**Figura 34** Curvas TG, das nanopartículas alginato-quitosana (Nps), nanopartículas branco (Nps branco) e mistura física (MF).

Analisando as três curvas TG observou-se um padrão similar. A 57°C observou-se um evento de perda de massa de 6,2%, devido à perda de moléculas de água. Esse resultado coincide com o perfil termogravimétrico da quitosana. Verificou-se um evento de perda de massa entre 170°C-420°C com perda de massa aproximada de 63%, 56% e 55% para nanopartículas alginato quitosana, nanopartículas branco e mistura física respectivamente. A Tabela 5 resume os principais eventos térmicos dos sistemas nanoparticulados alginato-quitosana (Nps) nanopartículas branco (Nps branco) e mistura física (MF).

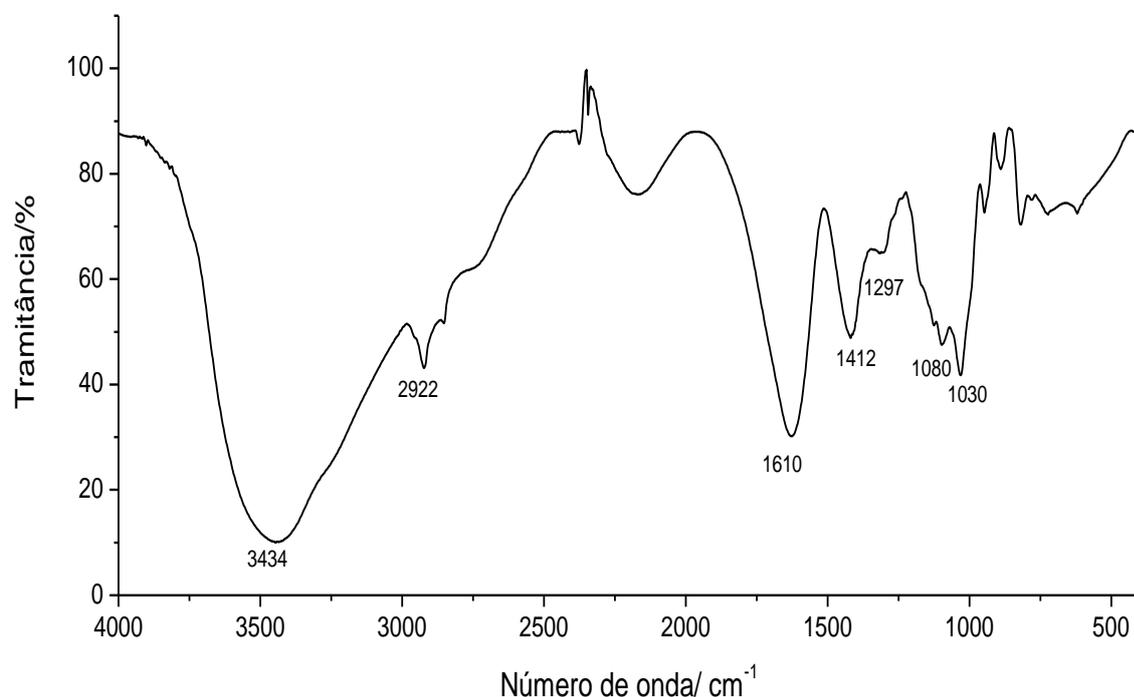
**Tabela 6** Eventos térmicos de nanopartículas e alginato-quitosana (Nps), nanopartículas branco (Nps branco), mistura física (MF).

Material	$\Delta m_1$ (água) /%	Temperatura de degradação $T_d$ (°C)	Resíduo após 700°C / %
Nanopartículas alginato-quitosana (Nps)	7,0	251,0°C e 296,0°C	8,0
Nanopartículas branco (Nps Branco)	6,2	240,0°C e 343,0°C	8,0
Mistura Física (MF)	3,7	248,0°C e 308,0°C	10,0

Na Tabela 5 pode-se observar as diferentes temperaturas máximas de degradação de Nps, Nps branco e MF. Dos resultados na Tabela 5 conclui-se: a presença da solução sólida amido-curucmina aumentou a estabilidade térmica das Nps quando comparadas com as Nps branco devido à formação de blendas entre alginato e amido (Siddaramaiah et al., 2008).

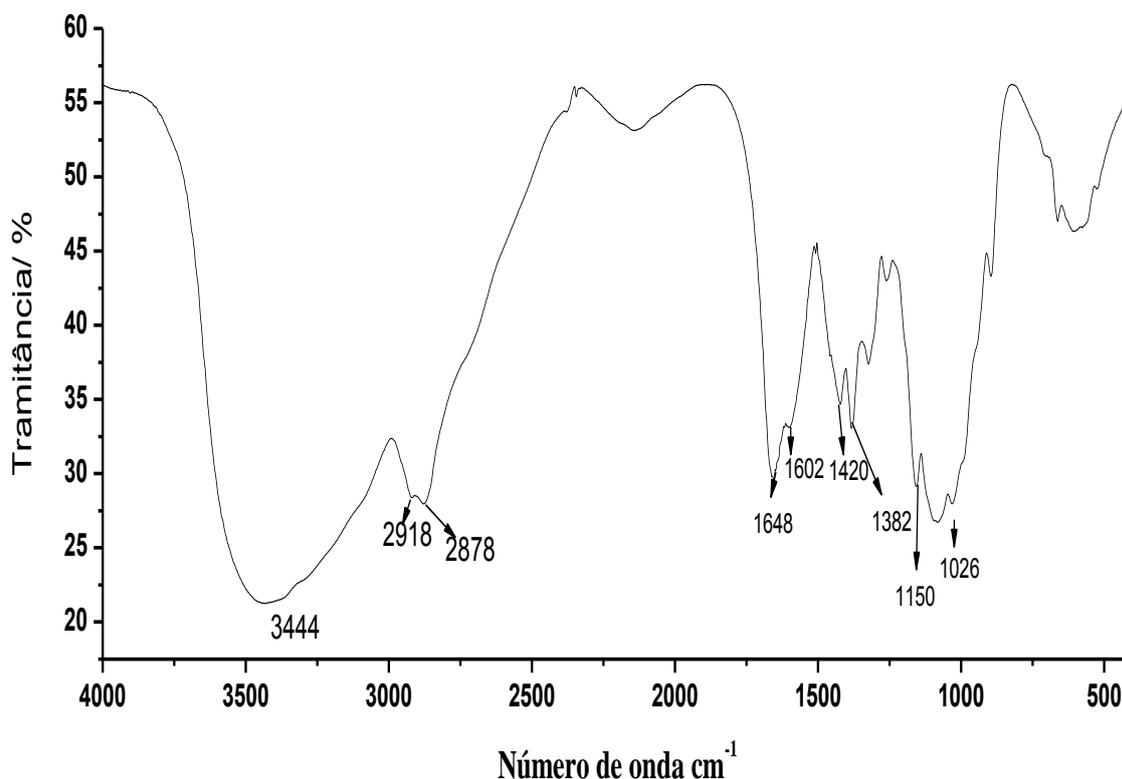
#### 4.2.2 Espectroscopia de absorção na região de infravermelho

Na Figura 35 é apresentado o espectro de absorção na região de infravermelho de alginato de sódio. Observou-se as bandas características descritas na literatura (Dupuy et al., 1994). O alginato apresenta bandas em  $3434\text{ cm}^{-1}$  associadas aos grupos hidroxila, em  $2922\text{ cm}^{-1}$  a banda característica de deformações assimétricas de grupos  $\nu(\text{C-H})$ . Em  $1610\text{ cm}^{-1}$  observa-se a banda referente ao grupo funcional  $\nu(\text{C-O-O})$  (Sartori, 1997). Na região de  $1297\text{ cm}^{-1}$  verifica-se a banda referente a deformações assimétricas de grupos  $\nu(\text{C-H})$ . Em  $1080$  e  $1030\text{ cm}^{-1}$  encontram-se as bandas dos grupos  $\nu(\text{C-O})$ ,  $\nu(\text{C-C})$  e  $\nu(\text{C-H-O})$  (van Hoogmoed et al., 2003).



**Figura 35** Espectro de absorção na região de infravermelho de alginato de sódio.

Na Figura 36 é apresentado o espectro de absorção na região de infravermelho da quitosana.



**Figura 36 Espectro de absorção na região de infravermelho de quitosana.**

Foram observadas as bandas do grupo amida em  $1648\text{ cm}^{-1}$  (Cárdenas and patricia, 2004). Em  $1584\text{ cm}^{-1}$  as bandas atribuídas ao  $\nu(\text{N-H})$  dos grupos amida e amina (Cárdenas and patricia, 2004; Lawrie et al., 2007). Em  $1420\text{ cm}^{-1}$  encontra-se a banda associadas a deformações do grupo  $\nu(\text{CH}_2)$ . Em  $1382\text{ cm}^{-1}$  encontra-se as deformações assimétricas de grupos  $(\text{CH}_3)$ . Na região de  $1150$  e  $1026\text{ cm}^{-1}$  são observadas as bandas referentes a deformações assimétricas

dos grupos  $\nu(\text{C-O-C})$  e  $\nu(\text{C-O})$  (van Hoogmoed et al., 2003).

Na Figura 37 são comparados os espectros na região de infravermelho de Nps alginato-quitosana, Nps branco e dispersão sólida amido-curcumina.

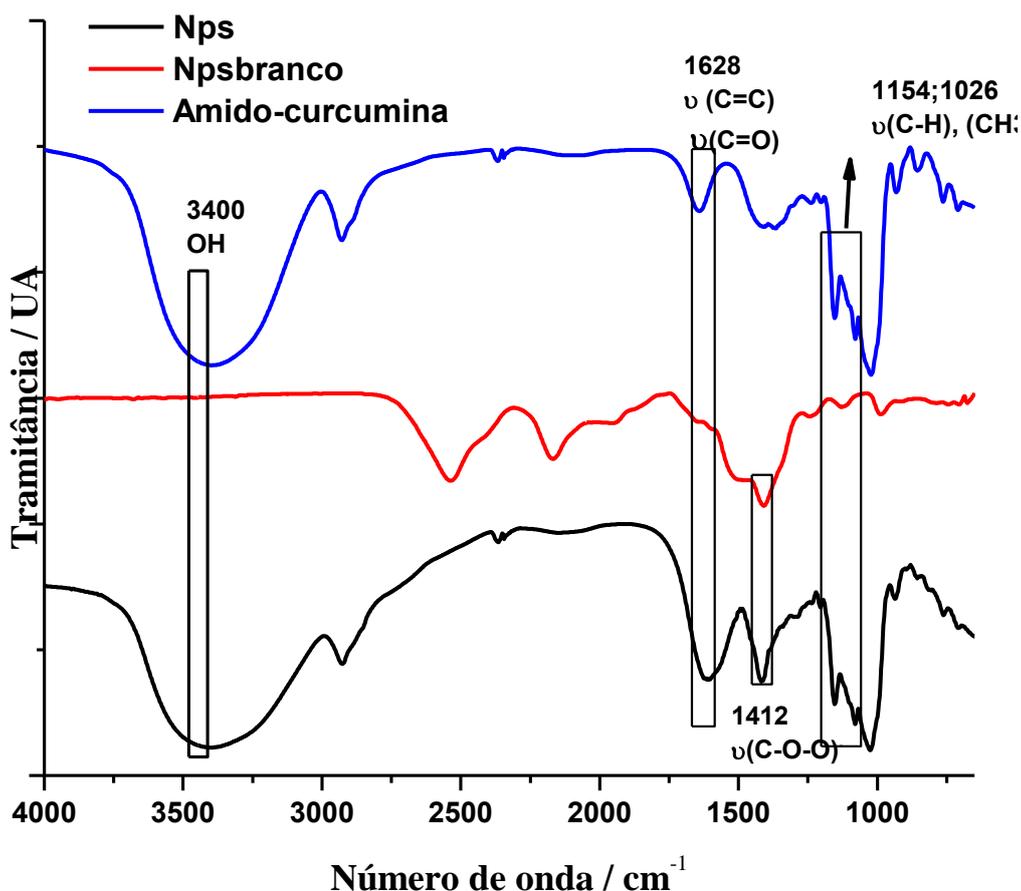


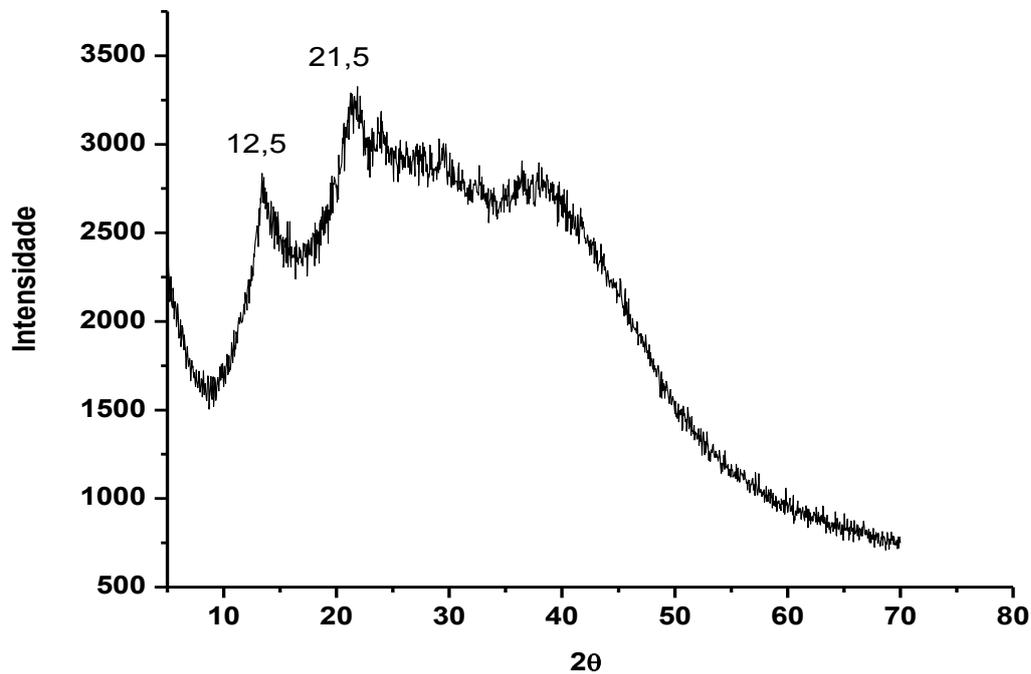
Figura 37 Comparação dos espectros de absorção na região de infravermelho de nanopartículas alginato-quitosana (Nps), nanopartículas branco (Nps branco) e solução solida amido-curcumina (Am-Cur).

Analisando o espectro mostrado na Figura 38. Pode-se observar bandas em  $1628\text{ cm}^{-1}$  referentes a vibrações dos grupos  $\nu(\text{C}=\text{O})$  e  $\nu(\text{C}=\text{C})$  da curcumina. Em  $1154, 1026\text{ cm}^{-1}$  as bandas das vibrações  $\nu(\text{CH})$  e  $\nu(\text{CH}_3)$  da curcumina, encontram-se nos espectros de infravermelho de amido-curcumina como das nanopartículas. Estes resultados sugerem a presença de curcumina dentro do sistema nanoparticulado. Foi observada uma banda em  $1412\text{ cm}^{-1}$  no espectro das Nps branco como Nps alginato-quitosana, que pode ser atribuída às as vibrações simétricas e anti-simétricas dos grupos carboxilato (Simsek-Ege et al., 2003; Douglas and Tabrizian, 2005).

#### 4.2.3 Difração de raios X

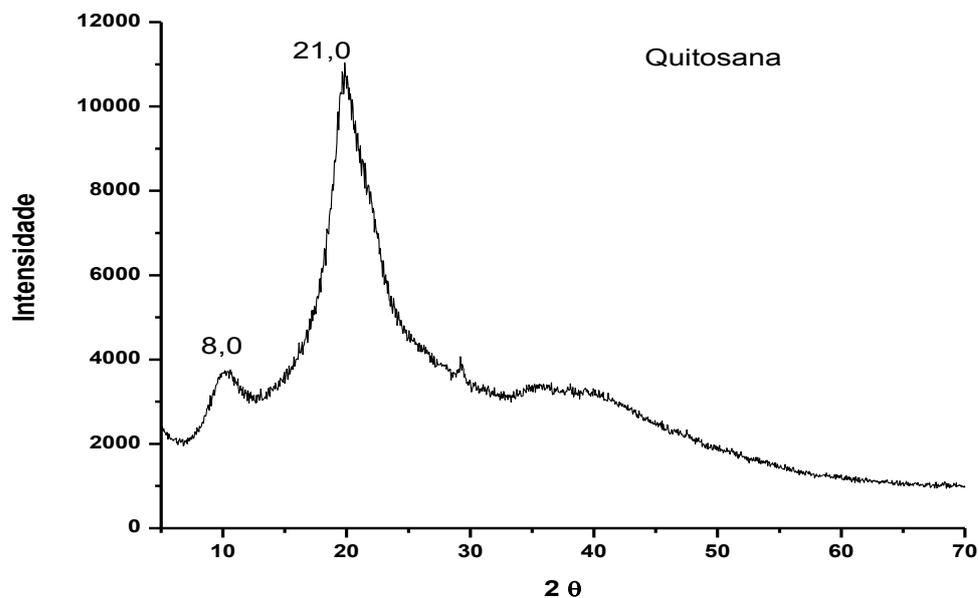
Na Figura 38 apresenta-se o difratograma de raios X do alginato de sódio no qual , pode-se observar um padrão amorfo junto com dois picos largos o primeiro a  $12,5$  graus, que

segundo a literatura corresponde ao empacotamento entre cadeias poliméricas, e o pico a 21,5° graus referente ao espaço entre as cadeias moleculares (Li et al., 2007).



**Figura 38** Difratograma de raios X de alginato de sódio.

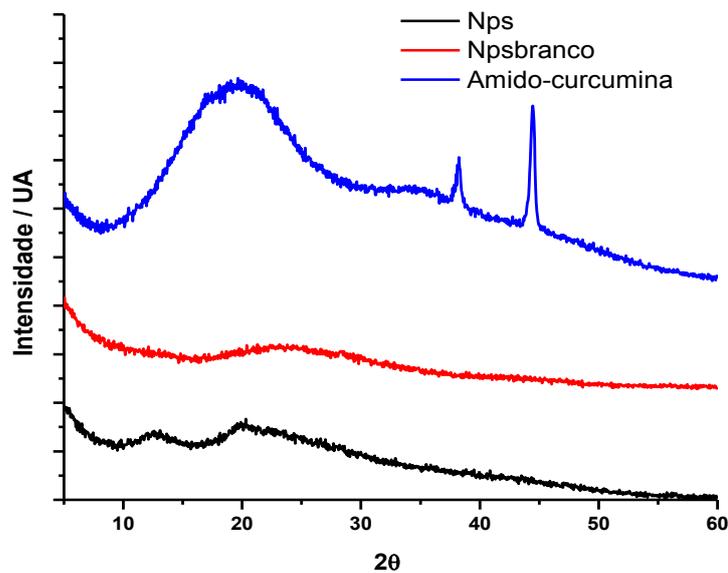
Na Figura 39 é apresentado o difratograma de raios X das quitosana, mostrando um perfil semicristalino. Verificou-se picos em 8,8 e 21,0 graus que são relatados como cristal I e cristal II (Rinaudo, 2006).



**Figura 39** Difratograma de raios X de quitosana.

Na Figura 40 são comparados os difratograma das Nps de alginato-quitosana, Nps branco e a solução sólida amido curcumina. Os três difratograma comparados mostraram um

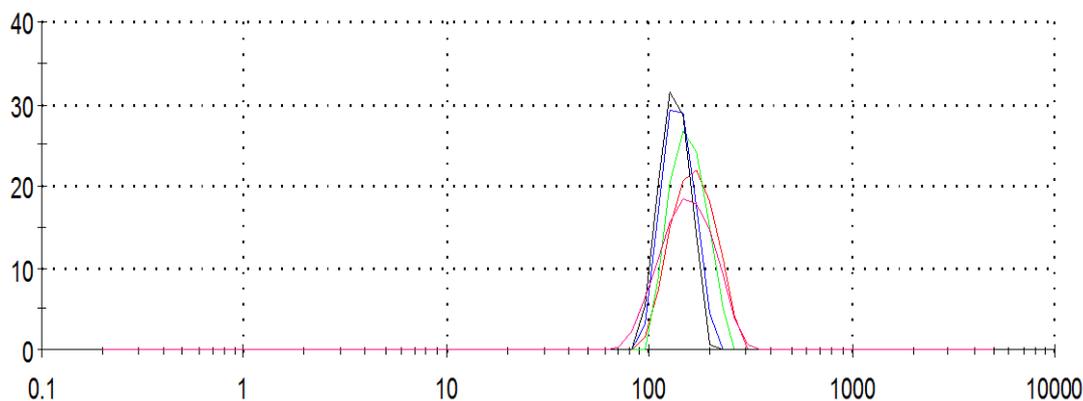
padrão semi-cristalino, o difratograma das Nps branco mostrou um pico largo entre 16-31 graus como consequência da sobreposição de picos característicos de alginato e quitosana. O difratograma das nanopartículas carregando curcumina mostrou dois picos largos em 12 e 21 graus que coincidem com os picos característicos dos materiais de partida, o deslocamento dos picos sugere a presença da solução sólida amido-curcumina que mostrou picos largos na faixa de 9-25 graus sugerindo a incorporação de curcumina dentro das Nps, que foi corroborado no espectro de absorção na região de infravermelho e análise térmica.



**Figura 40 Comparação difratograma de raios X de nanopartículas de alginato-quitosana Nps, nanopartículas branco Nps branco e solução sólida amido-curcumina Am-Cur.**

### **4.3 Estudos de tamanho de partícula por espalhamento de luz Dinâmico**

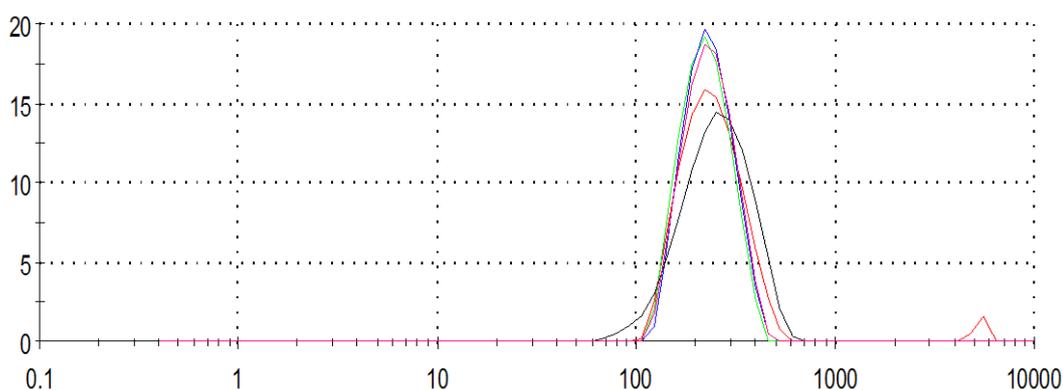
Foram feitas medidas de espalhamento de luz dinâmico com o objetivo de obter a distribuição de tamanho das nanopartículas de alginato-quitosana carregando a solução sólida amido-curcumina (Nps). Foram preparados dois diferentes tipos de nanopartículas de alginato: na primeira foi usado poli-L-lisina como polieletrólito para estabilizar a dispersão de nanopartículas Figura 41. A segunda foi preparada substituindo a poli-L-lisina por quitosana.



**Figura 41 Distribuição do tamanho das nanopartículas branco alginato- $\text{CaCl}_2$ + Poli-L-Lisina.**

Na Figura 41 pode-se observar que as nanopartículas preparadas como poli-L-lisina tiveram um tamanho promedio de 129 nm, com uma distribuição de tamanho uniforme que sugere ausência de agregação. Esses resultados estão na mesma faixa de tamanho em sistemas nanoparticulados carregadores de antibióticos (Cover et al., 2012) e vitamina B<sub>2</sub> (Azevedo et al., 2014).

Um segundo grupo de nanopartículas foi preparado substituindo poli-L-lisina por quitosana deacetilado, como estratégia para evitar toxicidade e diminuir os custos de preparação. Foi escolhido quitosana por ser considerado um polieletrólito catiônico barato e biodegradável (Il'ina and Varlamov, 2005), (Luo and Wang, 2014). Na Figura 42 é apresentada a distribuição de tamanho das nanopartículas.

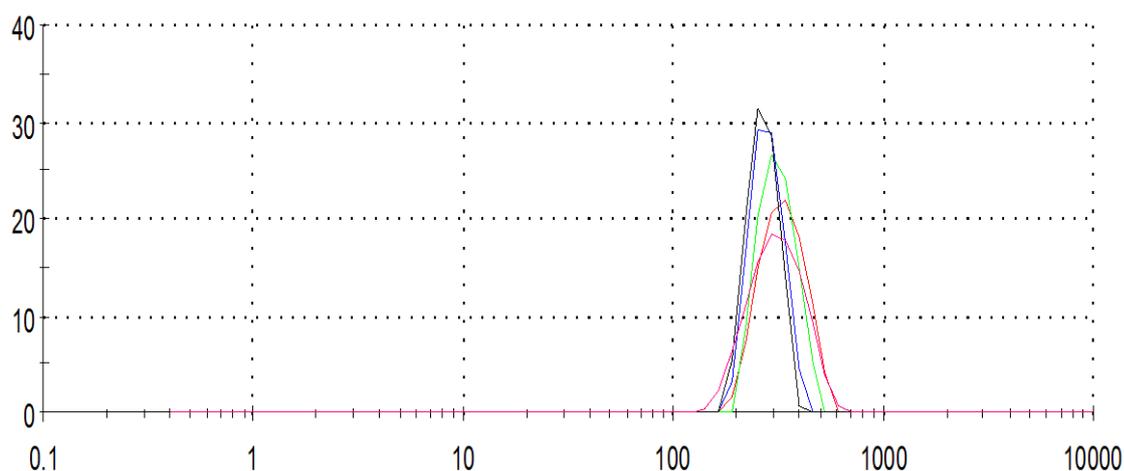


**Figura 42 Distribuição do tamanho das Nanopartículas branco alginato- $\text{CaCl}_2$  + quitosana.**

Analisando a Figura 42 se observou um aumento no tamanho em comparação ao sistema (Figura 41) anterior passando de 129 nm para 250 nm, mantendo um índice de polidispersão baixo de 0,2 que sugere uniformidade no tamanho e ausência de eventos de agregação.

Uma das principais variáveis que influenciam no tamanho de partícula nos compostos polieletrólitos é a concentração dos reagentes e proporções da dispersão (Douglas and Tabrizian, 2005). No presente estudo foram preparadas nanopartículas seguindo a metodologia de Das et al. (Das et al., 2010). Foram utilizadas baixas concentrações de alginato e cloreto de cálcio para formar estados pré-gel, procurando evitar a formação de aglomerados. Nossos resultados mostraram um aumento do dobro em comparação com os resultados mostrados no protocolo modelo. Este aumento de tamanho pode ser explicado pelo uso de quitosana. As diferenças em tamanho quando foi substituído a poli-L-lisina pela quitosana são explicadas pela maior afinidade entre o complexo alginato- $\text{CaCl}_2$  por quitosana que promove o aumento de tamanho mantendo fixas a proporções dos reagentes (De and Robinson, 2003).

Finalmente padronizados os métodos de preparação de nanopartículas de alginato- $\text{CaCl}_2$  foram preparadas nanopartículas carregando a solução sólida amido-curcumina usando quitosana como polieletrólito Figura 43.



**Figura 43 Distribuição do tamanho das NPs alginato- $\text{CaCl}_2$  + amido-curcumina+ quitosana.**

Analisando a Figura 43 se encontrou um aumento de tamanho em comparação com as nanopartículas branco discutidas na Figura 42. Esse aumento pode ser explicado pelo

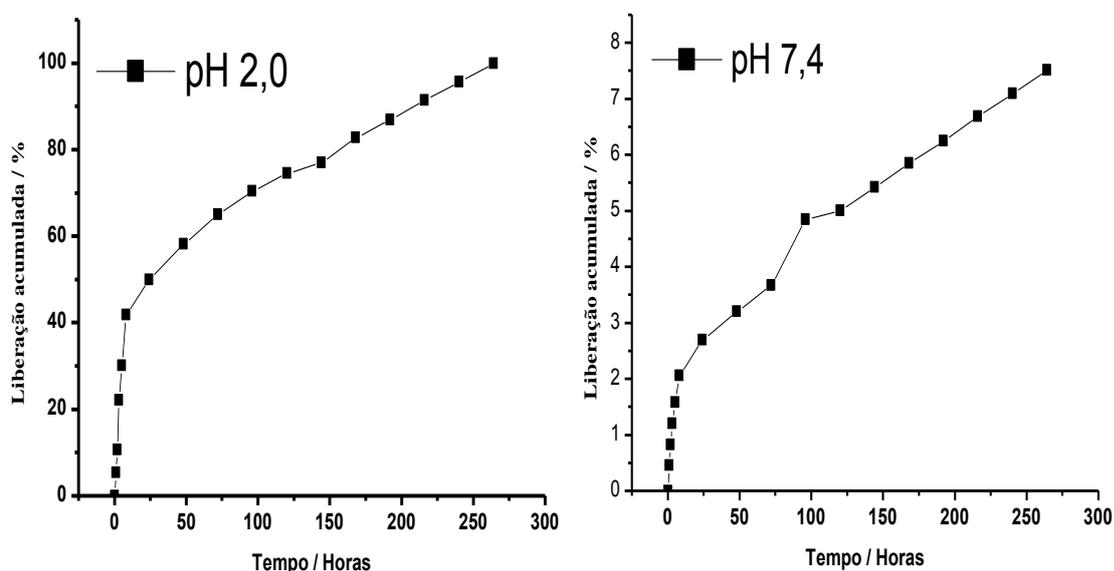
encapsulamento da dispersão sólida amido-curcumina. Esse fenômeno tem sido relatado em sistemas usados na liberação controlada de herbicidas (Maruyama et al., 2016).

#### 4.4 Encapsulamento de curcumina

O aumento na solubilidade de curcumina em água permitiu obter 28% de encapsulamento de curcumina dentro das nanopartículas, a porcentagem foi superior comparada com outros trabalhos que relatam porcentagens de 5-9% (Das et al., 2010)

#### 4.5 Cinéticas de liberação

Com objetivo de conhecer a cinética de liberação da curcumina encapsulada nas nanopartículas, foram feitos dois experimentos de liberação em duas condições de pH 7,4 e 2,0 que são apresentados na Figura 44.



**Figura 44 Cinéticas de liberação de curcumina de nanopartículas de alginato-quitosana em pH ácido e neutro.**

Analisando as cinéticas de liberação de curcumina em pH 7,4 observou-se dois domínios de liberação. O primeiro durante as primeiras 8 h no qual foi liberado aproximadamente 2% de curcumina e um segundo que se estendeu durante 264 h alcançando 7 % do teor total de curcumina. Os resultados poderiam ser explicados em função de forças de atração eletrostática entre a matriz quitosana carregada positivamente em pH neutro, de potencial Z em torno de 16 mV (Saied Noura, 2014) e a curcumina que inicia o processo de desprotonação ceto-enol com negativos de potencial Z em torno de -15 mV (Tønnesen and Karlsten, 1985; Vyas et al., 2013; Singh et al., 2014).

Um resultado diferente foi observado nas condições ácidas que mostrou liberação total de curcumina. A cinética em condições ácidas também mostrou dois domínios. No primeiro foi liberado 30% da curcumina durante as primeiras 5 h de tratamento, comportamento que pode ser explicado pela quantidade de curcumina aderida nas superfícies das nanopartículas (Al-Helw et al., 1998). O segundo domínio liberou o restante da curcumina até o final do experimento.

Em geral, os sistemas baseados em hidrogéis são controlados por processo de difusão, processos de enchimento da matriz e por último por processo de erosão (Agnihotri et al., 2004). A capacidade de enchimento da matriz está afetada por outros parâmetros, como nível de reticulação da matriz que conseqüentemente dependem das concentrações de polímeros usadas durante a preparação. Neste estudo foram usadas baixas concentrações de alginato e quitosana visando formação de nanopartículas com tamanhos menores, por tanto maiores áreas de superfície que facilitam os processos de liberação (Al-Helw et al., 1998).

Embora, o sistema tenha sido testado com as mesmas características de tamanho, as diferenças nas porcentagens de liberação poderiam ser explicadas exclusivamente pelas condições de pH usadas. Em meio ácido os grupos amino da quitosana são protonados permitindo o processo de erosão junto com a transformação do alginato de sódio para ácido algínico, que aumenta o processo de erosão do sistema (Murata et al., 1993; Østberg et al., 1994; Simsek-Ege et al., 2003).

Os sistemas nanoparticulados poliméricos podem apresentar diferentes mecanismos de liberação. Os dados obtidos das curvas de liberação foram previamente analisados para escolher o modelo mais adequado.

Neste trabalho foi escolhido o modelo Higuchi (Figura 45). O modelo de Higuchi se baseia em processo de difusão assumindo uma distribuição homogênea do composto dentro do sistema com maior concentração e comparação ao meio de liberação, sem incluir eventos de erosão da matriz. Os resultados mostraram um bom ajuste com o modelo de Higuchi incluindo eventos de erosão pelo menos no tratamento em condições ácidas. As cinéticas de liberação com o ajuste do modelos de Higuchi tem sido relatados para outros sistemas baseados em hidrogéis usando alginato e quitosana (Maruyama et al., 2016); (Li et al., 2008; Emami et al., 2014).

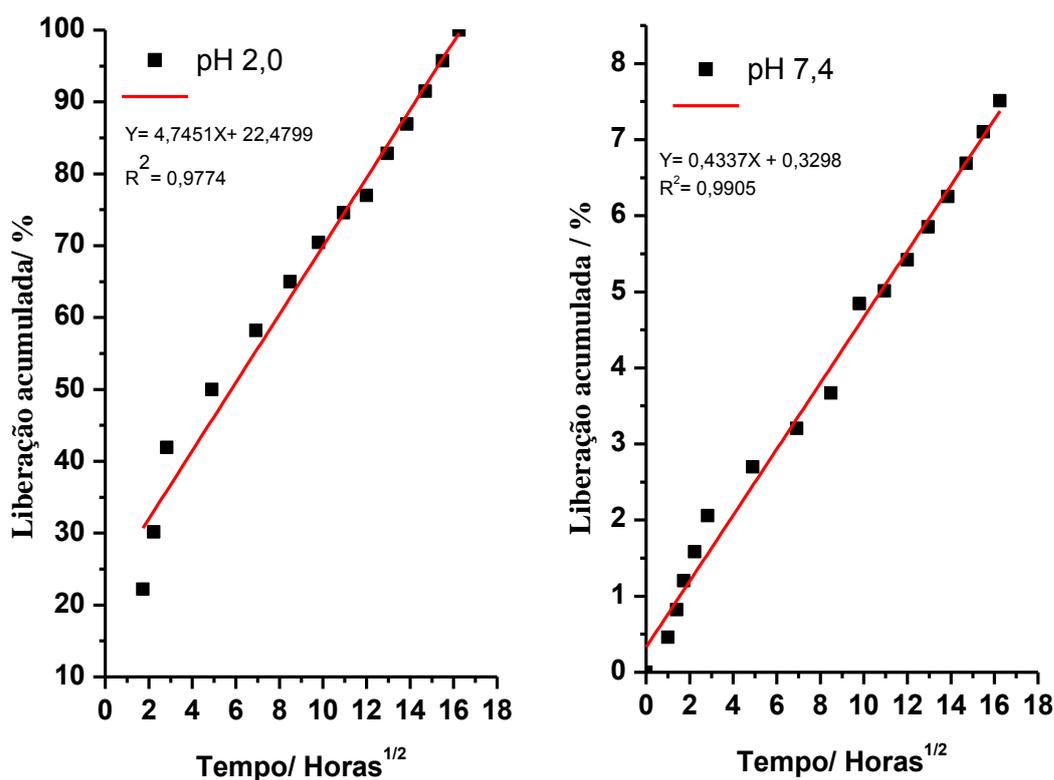


Figura 45 Cinéticas de liberação de Nps de alginato-quitosana ajustadas ao modelo de Higuchi.

#### 4.6 Avaliação microbiológica

Na Figura 46 são apresentados os resultados de avaliação antimicrobiana usando os testes qualitativo de dispersão em agar dos materiais de partida como das nanopartículas obtidas. Analisando a Figura 46 verifica-se porcentagens baixas de inibição da curcumina pura como do material amido-curcumina e das nanopartículas alginato-quitosana carregando curcumina.

Esses resultados não coincidem pelo reportado em outros trabalhos que demonstram uma diminuição do crescimento das bactérias superior a 50% e valores de concentrações mínimos inibitórias entre 200-300  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Negi et al., 1999).

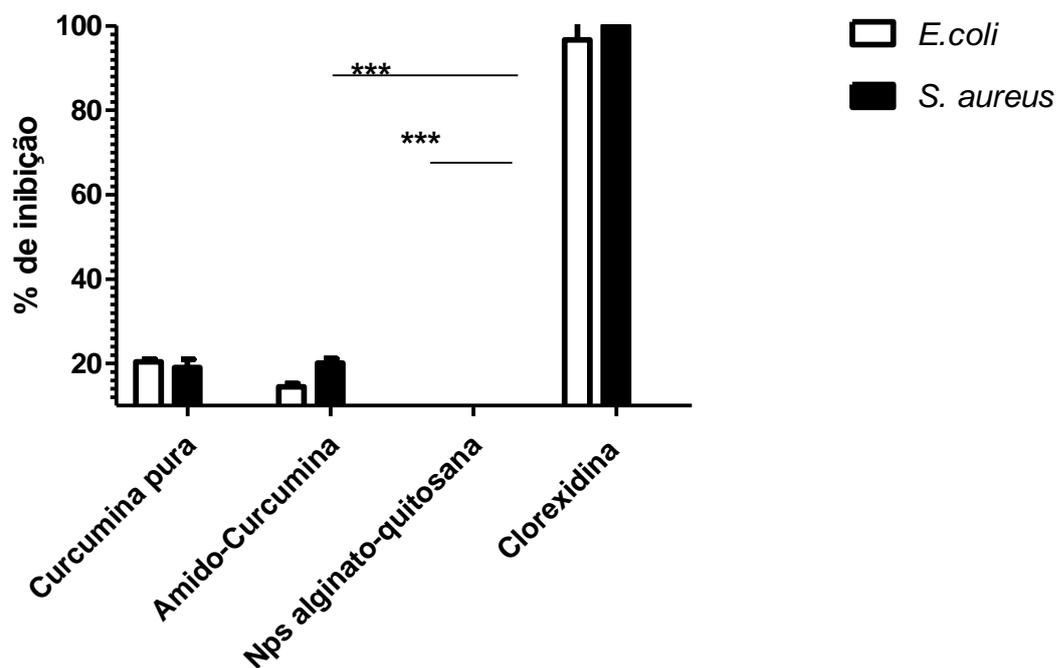


Figura 46 Porcentagem de inibição de crescimento das bactérias *E. Coli* e *S. aureus* usando curcumina, Amido-Curcumina e Nps carregando Amido -Curcumina a concentração  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Essas diferenças encontradas podem ser explicadas pelas baixas taxas de liberação de curcumina em condições de meio neutro, que impediu o contato da curcumina com as bactérias, porém a baixa eficiência como antimicrobiano. O uso sódio dodecil sulfato SDS como surfactante melhorou a liberação de curcumina, mas não conseguiu a ação biológica esperada. Outro fator que pode ter influenciado são diferenças nas metodologias usadas. Diferentes relatos na literatura descrevem a alta atividade antimicrobiana usando extratos alcoólicos com alta concentração de curcumina ( $17 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )(Zorofchian Moghadamtousi et al., 2014).

## Capítulo 5

# Preparação, caracterização físico-química e avaliação microbiológica de nanofibras poliméricas carregando curcumina

## Resultados e Discussão

Serão apresentados os resultados obtidos da preparação, caracterização físico-química de nanofibras poliméricas carregando curcumina.

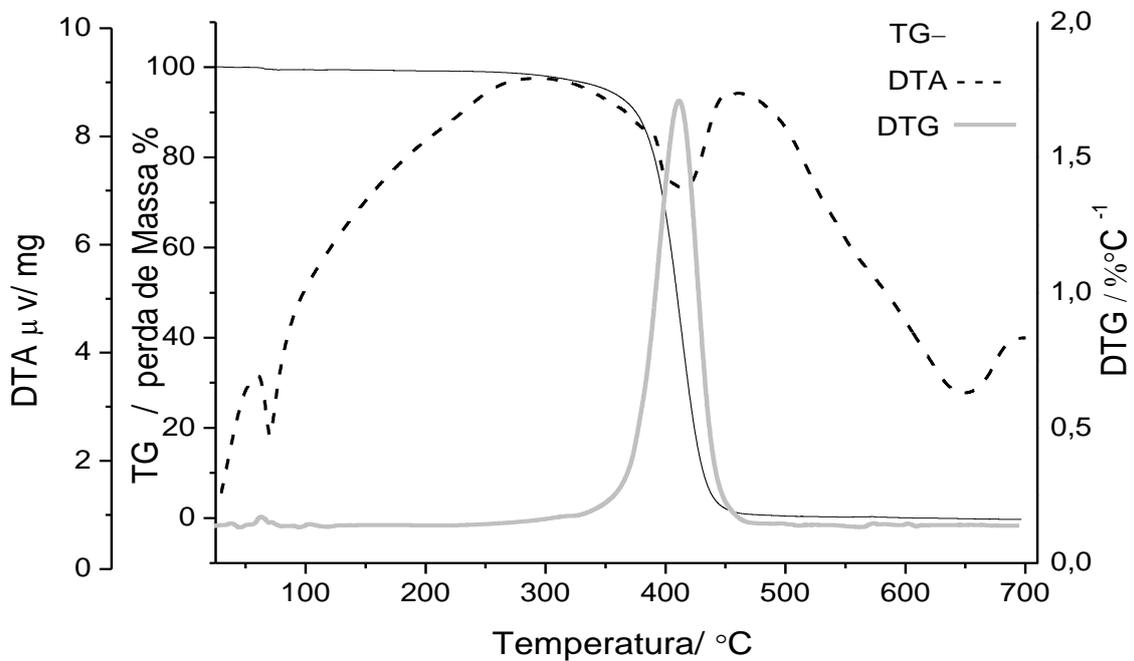
As nanofibras poliméricas foram preparadas usando soluções de polímero biodegradáveis como policaprolactona, alginato e gelatina. Foram preparadas fibras uniaxiais e fibras coaxiais (concêntricas) visando avaliar o efeito do recobrimento na cinética de liberação. Os materiais de partida e as nanofibras poliméricas obtidas foram caracterizadas usando diferentes técnicas físico-química como análise térmica, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e difração de raios X por policristais. A morfologia e o tamanho foram estudados por microscopia eletrônica de varredura. Foram avaliadas as cinéticas de liberação *in vitro* e atividade antimicrobiana usando o teste qualitativo de difusão em ágar.

### 5.0 Caracterizações físico-químicas dos materiais de partida

#### 5.1 Caracterização físico-química de policaprolactona

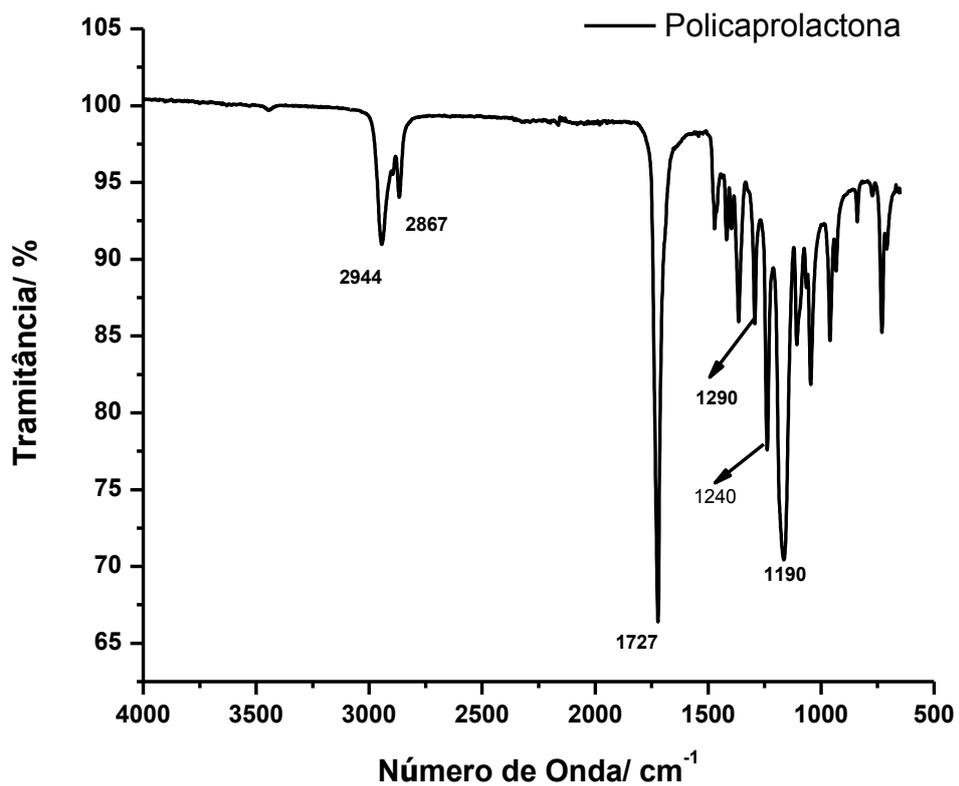
Na Figura 47 estão apresentadas as curvas TG, DTA e DTG da policaprolactona (PCL). Analisando a curva TG observa-se um patamar de estabilidade entre 25°C a 355°C. A 413°C observou-se um processo de decomposição, observado também na curva DTG. Analisando a curva DTA observa-se um pico exotérmico a 66°C, que corresponde a transição vítrea, seguido

um evento endotérmico, que correspondem à degradação do polímero. Esses resultados estão de acordo com a literatura (Kaloustian et al., 1991).



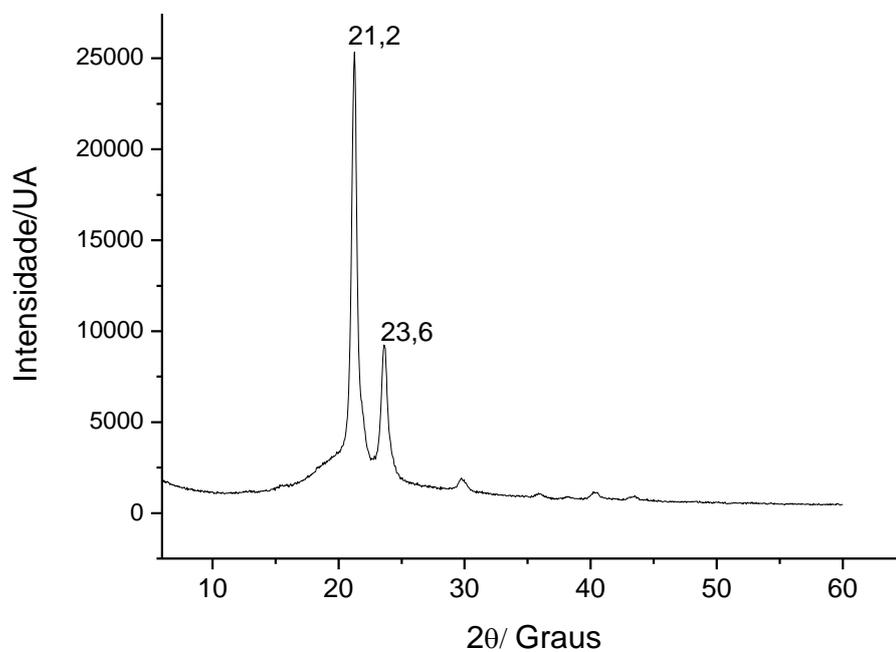
**Figura 47** Curvas TG, DTG e DTA policaprolactona em atmosfera de N<sub>2</sub>.

Na Figura 48 apresenta-se o espectro de absorção na região de infravermelho da policaprolactona. Observa-se na região entre 2944 e 2867 cm<sup>-1</sup> as bandas características de estiramentos assimétricos e simétricos do grupo (CH<sub>2</sub>). Na região em 1727 cm<sup>-1</sup> encontra-se a banda atribuída ao grupo (C=O). Em 1190 cm<sup>-1</sup> observa-se a banda característica de deformações dos grupos (C-O) e (C-C) da fase amorfa (Elzein et al., 2004).



**Figura 48** Espectro de absorção na região de infravermelho da policaprolactona.

Na Figura 49 apresenta-se o difratograma de raios X da policaprolactona.

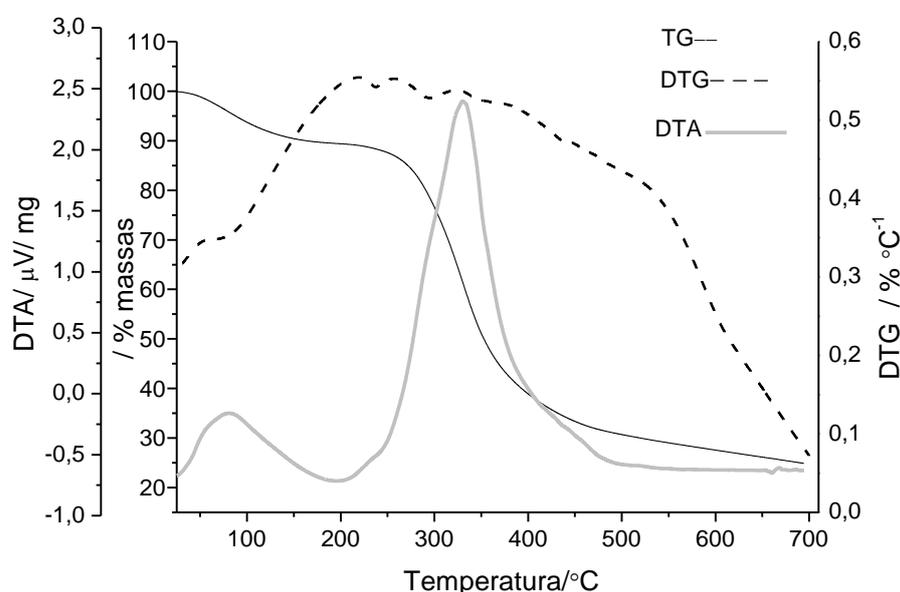


**Figura 49** Difratograma de raios X de policaprolactona.

Analisando a Figura 49 observa-se dois picos intensos em 21,2 graus e 23,6 graus específicos dos planos (110) e (200) de estruturas cristalinas ortorrômbicas, da policaprolactona (Baji et al., 2007).

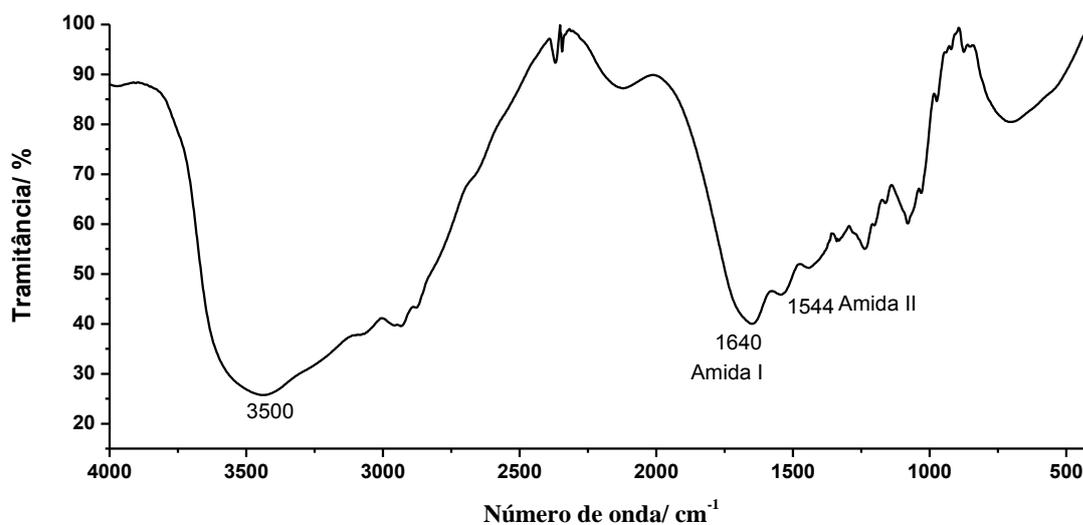
## 5.2 Caracterização físico-química de gelatina

Na Figura 50 apresentam-se as curvas TG, DTA e DTG da gelatina. Analisando as curvas TG pode-se observar um evento de perda de massa na faixa 25°C -150°C, seguido por um patamar térmico até uma temperatura de 242°C. Verifica-se um segundo evento de perda de massa na faixa 242°C -500°C, que coincide com a máxima temperatura de termo decomposição em 330°C, resultados similares são descritos na literatura (Mishra et al., 2011).



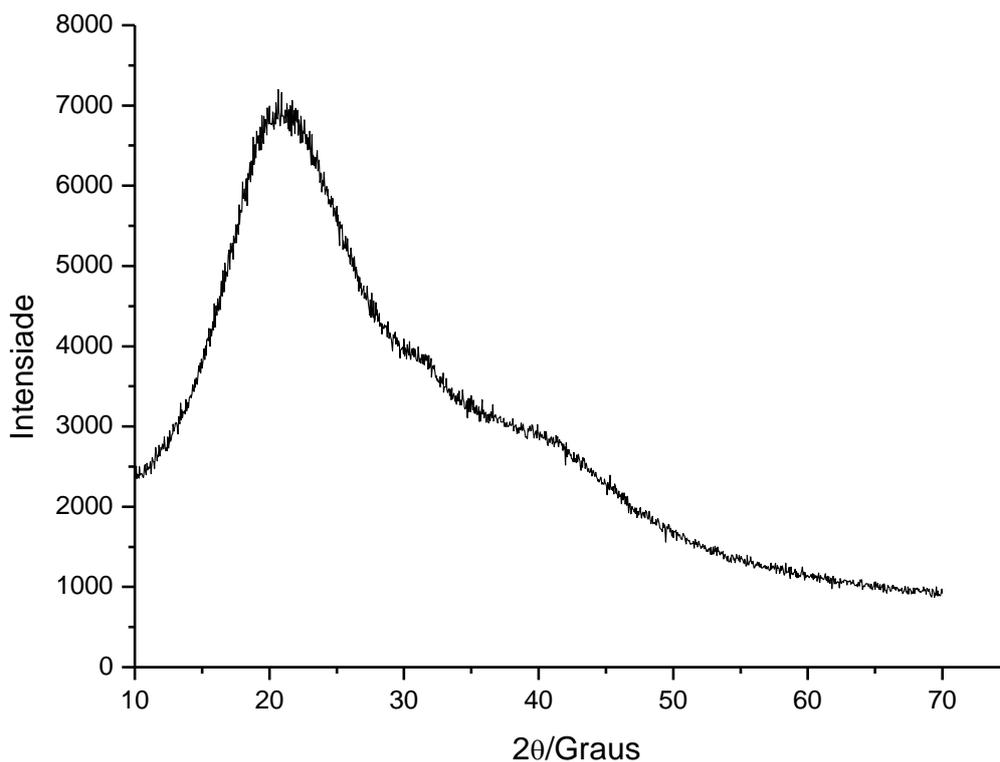
**Figura 50** Curvas TG, DTA e DTG da gelatina em atmosfera de N<sub>2</sub>.

Na Figura 51 é apresentado o espectro na região de infravermelho da gelatina. Analisando espectro verifica-se uma banda larga na região 3100-3500 cm<sup>-1</sup> atribuída à presença de moléculas de água livre dentro da cadeia polimérica. Observou-se em 1640 cm<sup>-1</sup> a banda características do grupo amida I. Em 1544 cm<sup>-1</sup> observou-se a banda referente ao grupo amido II atribuídas a deformações dos grupos carbonila (C=O), dos grupos (N-H) e (C-N) (Prystupa and Donald, 1996), (Ki et al., 2005).



**Figura 51 Espectro de absorção na região de infravermelho da gelatina.**

Na Figura 52 é apresentado o difratograma de raios X da gelatina, que mostrou um padrão amorfo característico de estruturas helicoidais e  $\alpha$  hélice (Ki et al., 2005).

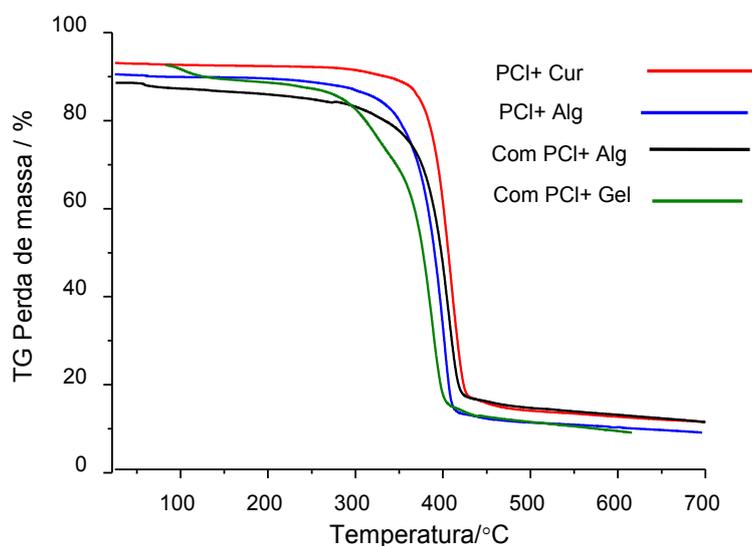


**Figura 52 Difratograma de raios X de gelatina.**

### 5.3 Caracterização físico-química de nanofibras poliméricas

Na Figura 53 estão apresentadas as curvas TG, das nanofibras policaprolactona-curcumina (PCI-Cur), policaprolactona-alginato (PCI-Alg), fibra coaxial (concêntrica)

policaprolactona-alginato (Con PCI-Alg) e fibra concêntrica policaprolactona-gelatina (Con PCI-Gel). As fibras PCI-Cur e PCI-Alg, mostraram um patamar de estabilidade entre 25°C- 323°C. As fibras concêntricas (Con PCI-Alg) e (Con PCI-Gel) mostraram estabilidade térmica entre 25°C - 274°C e 255°C respectivamente. Verifica-se um evento de perda de massa nas fibras PCI-Cur e PCI-Alg na faixa 323°C-441°C.



**Figura 53** Curvas TG de PCI-curcumina (PCI-Cur), PCI-alginato (PCI-Alg), fibra concêntrica PCI-Alginato (Con PCI-Alg), fibra concêntrica PCI-gelatina (PCI-Gel).

Na Tabela 7, estão apresentadas algumas diferenças nas temperaturas transição de fase encontradas nas fibras avaliadas.

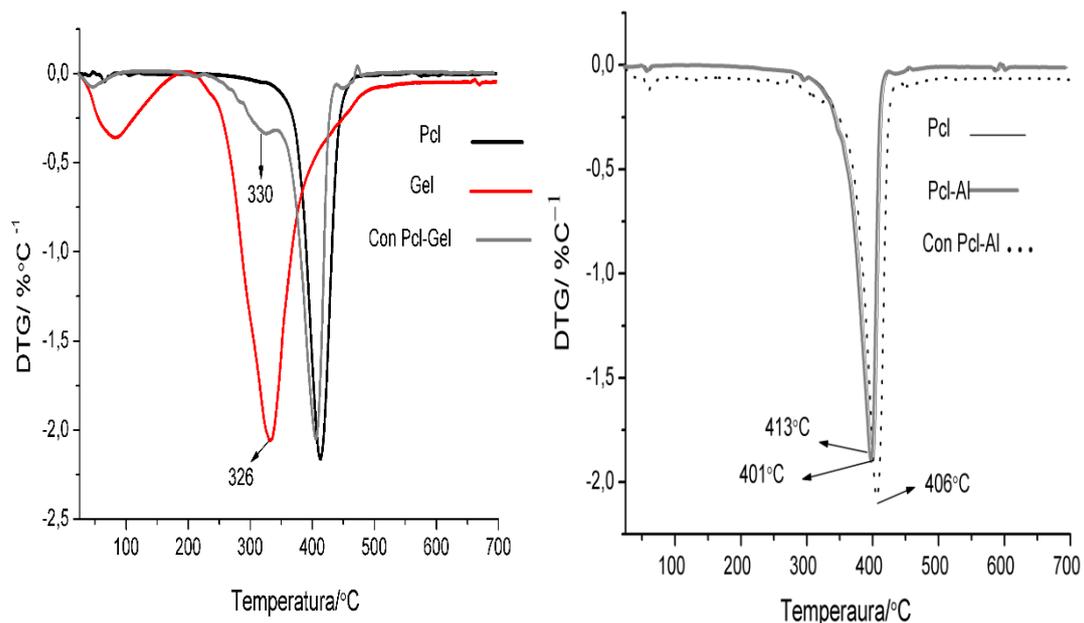
**Tabela 7** Eventos térmicos das fibras obtidas por eletrofiação.

Fibra	Tm PCI/ °C	$\Delta m_1$ (Água)/ %	Residuo	Td °C
PCI-Curcumina	61,4	-	11,0	408
PCI-alginato	60,8	2,8	8,0	401
Concêntrica PCI-alginato	62,4	2,7	23,5	406
Concêntrica PCI- gelatina	58,8	6,7	7,4	330 e 408

TM= Temperatura de fusão,  $\Delta m_1$ = Porcentagem de água, Td= Temperatura de degradação

Analisando a Tabela 6 observa-se temperaturas menores do ponto de fusão das fibras quando comparada com PCI pura. Observa-se mudanças na temperatura máxima de degradação das nanofibras quando comparada com a matriz PCI. Esse resultado indica que a adição de alginato e gelatina diminui a estabilidade térmica. Não foram observados eventos de perda de massa associados à curcumina, indicando a completa dispersão da curcumina dentro das matrizes poliméricas.

Na Figura 54 são comparadas as curvas DTG dos materiais de partida PCI, gelatina, alginato e as fibras concêntricas PCI-Gel e PCI-Alg.

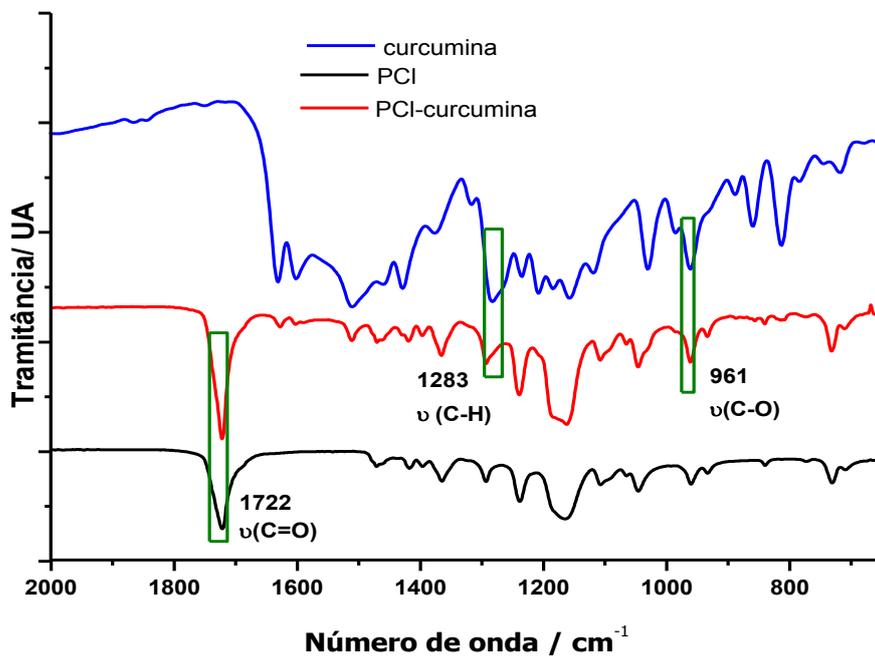


**Figura 54** Curvas DTG de PCI, gelatina, alginato e fibras concêntricas PCI gelatina e PCI alginato.

Analisando a Figura 54 observou-se duas temperaturas de degradação na fibra concêntrica PCI-gelatina quando comparada com a matriz PCI, o que confirma a presença de gelatina. Esta diferença sugere a formação de duas fases na blenda por diferença da miscibilidade. (Brostow et al., 2008; Kolbuk et al., 2013).

Verifica-se também modificações nas temperaturas de degradação das fibras PCI-Alg e fibra concêntrica PCI-Alg quando comparado matriz PCI, sugerindo diminuição da cristalinidade da matriz PCI pela adição de alginato. Esses resultados são similares a descritos na literatura (Wan et al., 2009).

A continuação na Figura 55 estão apresentados os espectros de absorção na região de infravermelho de curcumina, PCI e fibra PCI-curcumina.



**Figura 55** Espectros de absorção na região de infravermelho de PCI, curcumina e a fibra PCI-curcumina.

Analisando os espectros da Figura 55 encontraram-se bandas de policaprolactona em  $1722\text{ cm}^{-1}$  referente a vibrações (C=O). No espectro da fibra PCI-curcumina, verifica-se as bandas em  $1283$  e  $961\text{ cm}^{-1}$  relacionados estiramentos de grupos (C-H) e (C-O) da curcumina, confirmando a presença de curcumina nas fibras.

A seguir na Figura 56 são comparados os espectros de infravermelho de alginato de sódio, fibra PCI-alginato e fibra concêntrica PCI alginato.

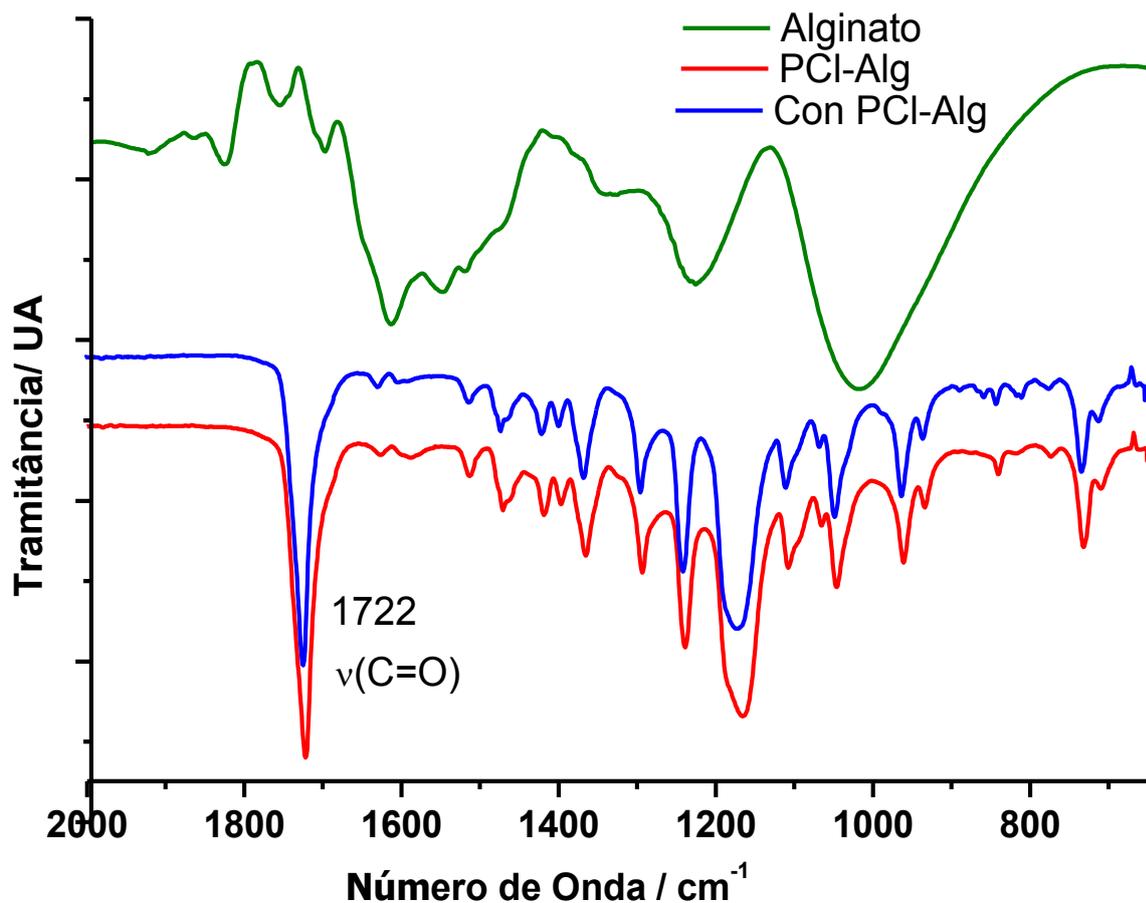
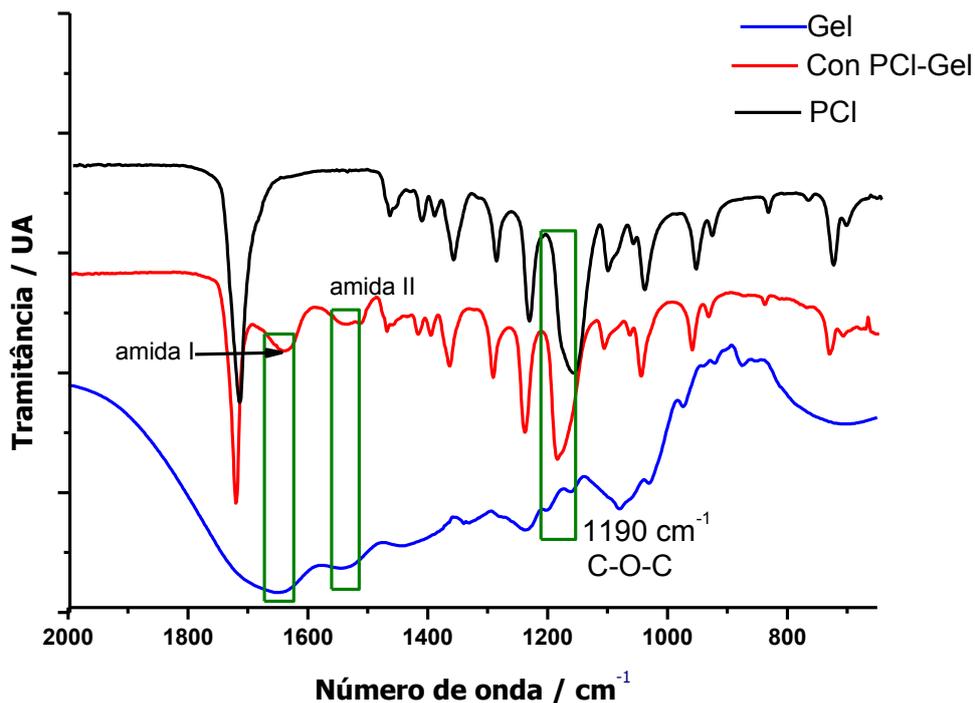


Figura 56 Espectros de absorção na região de infravermelho de alginato de sódio, PCI, fibra PCI-alginato e fibra concêntrica PCI-alginato.

Analisando a Figura 56 encontraram-se as bandas referentes aos materiais de partida como a banda em  $1722 \text{ cm}^{-1}$  que corresponde a vibrações do grupo (C=O) do PCI.

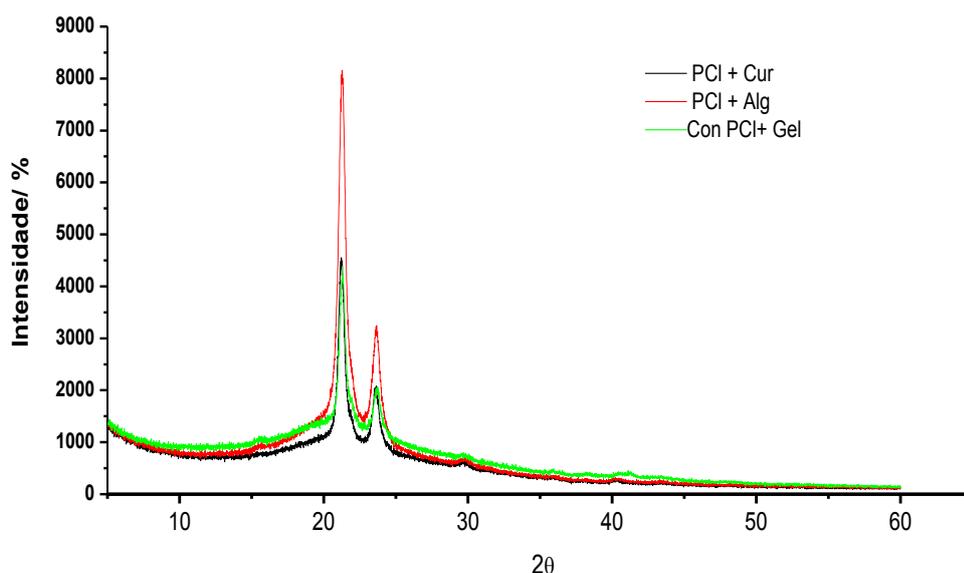
Na Figura 57 estão apresentados os espectros de absorção na região do infravermelho de gelatina, PCI e fibra concêntrica PCI-gelatina (PCI-Gel).



**Figura 57** Espectros de absorção na região de infravermelho de policaprolactona, gelatina e fibra concêntrica PCI-gelatina.

Analisando os resultados observa-se que o espectro da fibra concêntrica de gelatina encontram-se bandas em  $1640$  e  $1544\text{ cm}^{-1}$  relacionadas aos grupos amida I e amida II de gelatina (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2008);(Gautam et al., 2014). Foi verificado o deslocamento da banda de  $1770$  para  $1990\text{ cm}^{-1}$  específicos de estiramentos dos grupos (C-O-C), resultados que sugerem a presença de gelatina na fibra corroborando os resultados das curvas DTG.

Na Figura 58 estão apresentados os difratogramas das fibras de policaprolactona-curcumina (PCI-Cur), policaprolactona-alginato (PCI-Alg) e fibra concêntrica policaprolactona gelatina (Con PCI-Gel).



**Figura 58** Difratoogramas de raios X das fibras PCI-curcumina (PCI-Cur), PCI-Alginato (PCI-Alg) e fibra concêntrica PCI-Gelatina (Con PCI-Gel).

Analisando a Figura 58 encontrou-se picos bem definidos em 21,3 e 23,6 graus que correspondem com os planos (hkl) (110) e (200) das estruturas cristalinas ortorrômbricas da matriz PCI (Wang et al., 2013).

#### 5.4 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica e a avaliação geométrica das fibras (distribuição de tamanho por diâmetro e orientação) foram estudadas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em geral, a morfologia e o tamanho das fibras são influenciados por diferentes fatores tais como: a viscosidade, a concentração do polímero, o tipo de solvente, fatores operacionais, como a distância entre a agulha e a placa coletora, a corrente aplicada, o fluxo de vazamento da solução polimérica (Pham et al., 2006; Thompson et al., 2007).

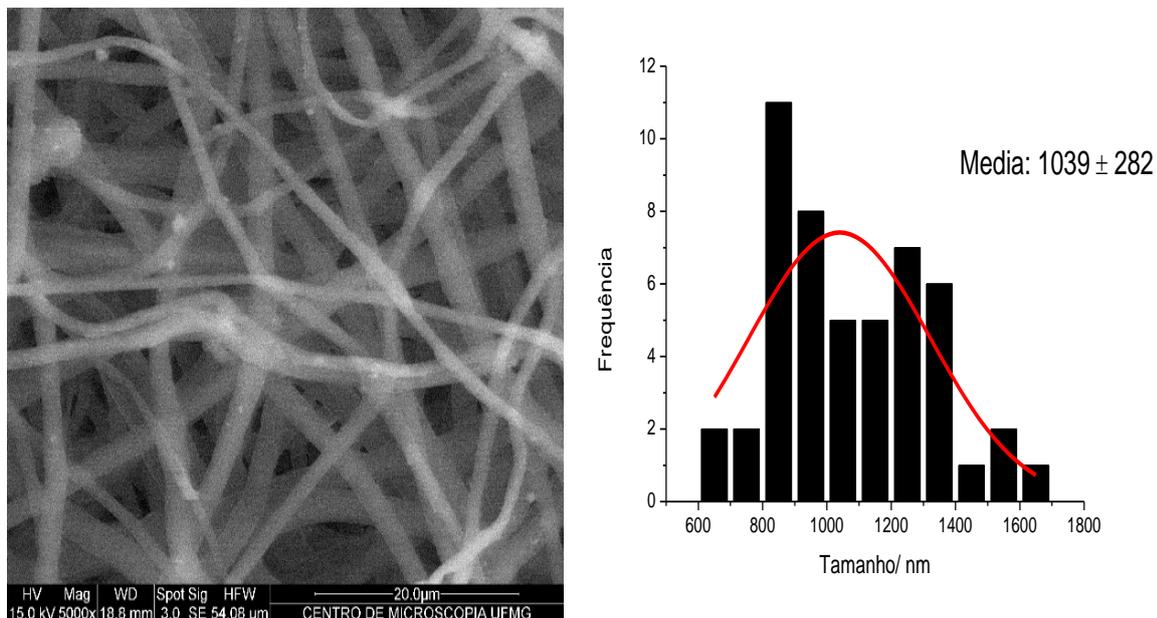
A viscosidade é um dos fatores determinantes que influenciam a morfologia e a orientação das fibras, e pode ser controlada por características da solução, tais como concentração do polímero. Valores altos de viscosidade evitam a formação de fibras lisas e uniformes.

A condutividade da solução é um outro fator que influencia a morfologia e o tamanho das fibras. Em geral, a adição de sais na solução polimérica é uma estratégia para aumentar a

condutividade promovendo a formação de fibras lisas com morfologia uniforme, sem formação de protuberâncias (Son et al., 2004).

A densidade de carga é outro parâmetro influente que está relacionado tanto com a condutividade quanto com o tipo de polímero e solvente escolhidos. Assim, polímeros naturais se comportam como polieletrólitos aumentando o transporte de carga na solução polimérica, resultando numa maior tensão sobre o campo elétrico que impedem a formação de fibras. O tipo de solvente e tipo de polímero usado afetam diretamente esta parâmetro (Li and Wang, 2013). Na Figura 59 estão apresentadas as características morfológicas e a distribuição de tamanho das fibras PCI carregando curcumina.

Analisando a Figura 60 observou-se a formação de fibras micrométricas com uma distribuição de tamanho larga, com valores 600 nm a 1,8  $\mu\text{m}$ .

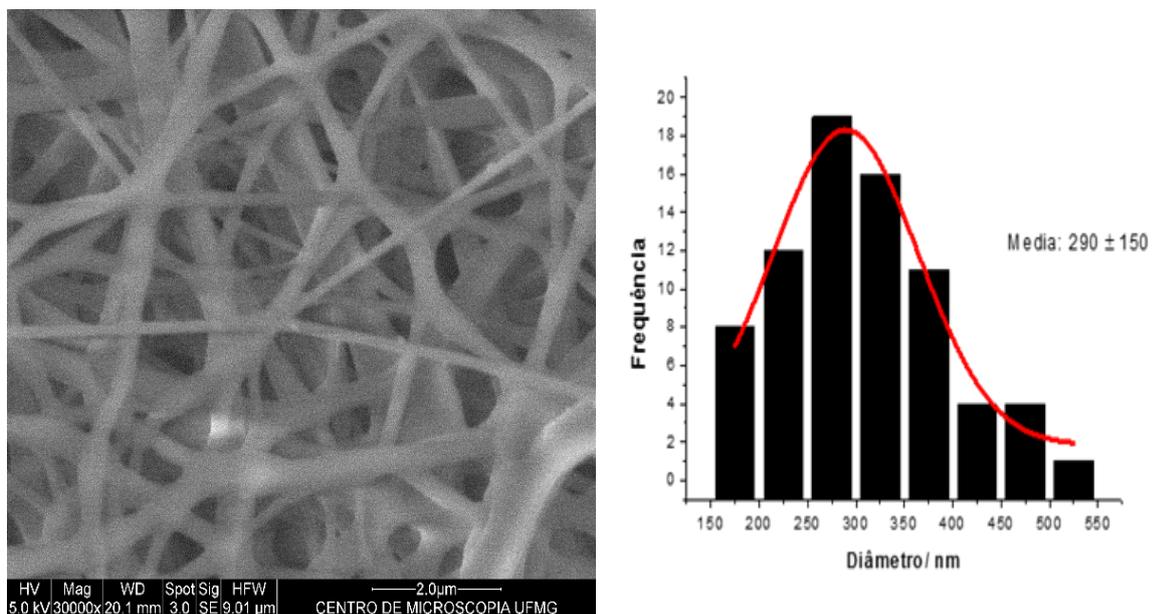


**Figura 59 Morfologia e distribuição de tamanho de fibra PCI-curcumina.**

Esses resultados podem ser explicados pela taxa de vazamento usada de 3 mL/h e pelas características dos solventes (Merrell et al., 2009). Relatos na literatura indicam que taxas de vazamento alta promovem a formação de fibras maiores, devido a formação de gotas e jatos de maior tamanho que promovem a união entre as fibras, além de imperfeições e presença de pérolas ou defeitos. (Zong et al., 2002). O uso de taxas de vazamentos maiores a 0,5 mL/h aumentam até oito vezes o diâmetro da fibra (Guarino et al., 2011).

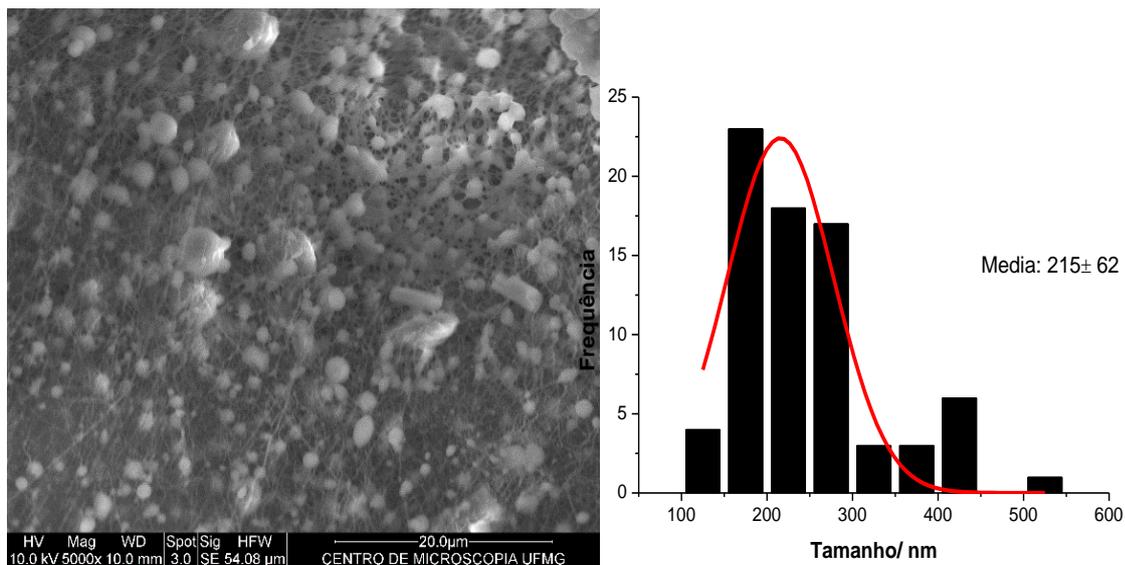
Características intrínsecas do solvente como grau de polaridade e permissividade relativa tem influência direta na densidade de carga da solução polimérica que afetam o tamanho, neste caso a permissividade relativa do metanol e do diclorometano usados na preparação das fibras é considerada alta que junto com o uso de alta taxas de vazamento levou a formação de fibras de maior tamanho (Guarino et al., 2011)

Na Figura 60 e 61 estão apresentadas as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura das fibras PCI- alginato (PCI-Alg) e fibra concêntrica PCI-alginato (Con PCI-Alg).



**Figura 60** Morfologia e distribuição de tamanho da fibra policaprolactona-alginato (PCI-Alg).

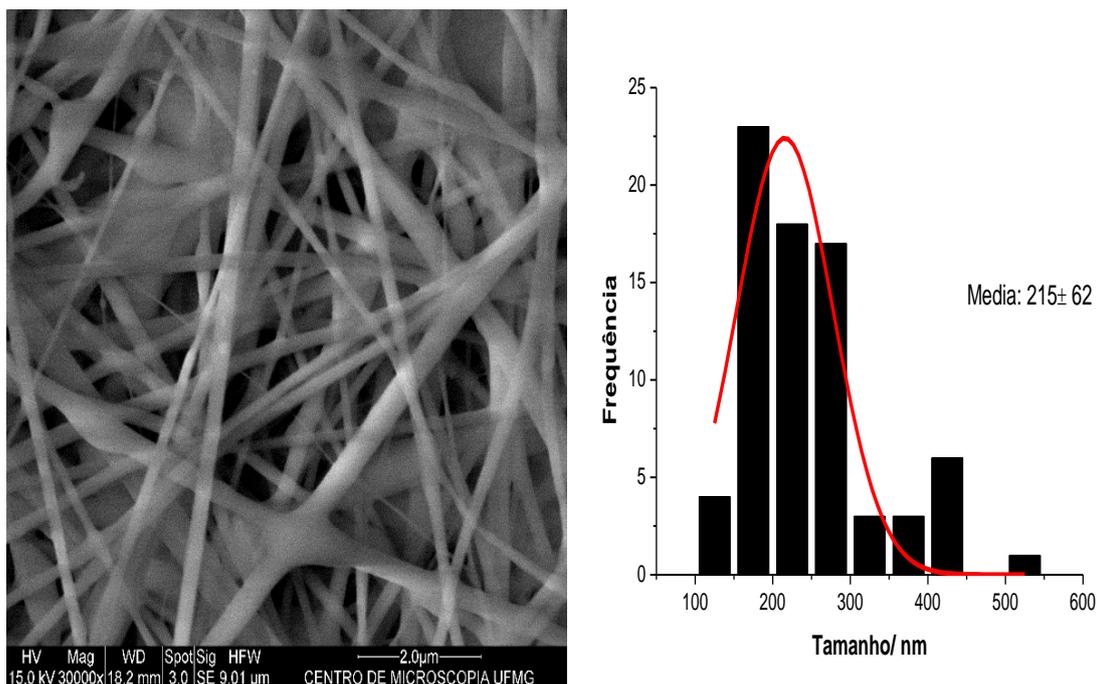
As fibras PCI- alginato mostraram um tamanho de fibra em torno de 290 nm, com distribuição de tamanho uniforme. Esses resultados podem ser explicados pelas condições de preparação usadas, como baixo fluxo de vazamento baixo (1,5 mL/ hora) , e tipos de solventes usados. A mistura de ácido acético e acetato de etila apresentam baixa polaridade, e consequentemente baixa permissividade relativa, mas as taxas de vazamento usadas permitiram a formação de gotas pequenas e consequentemente fibras de menor diâmetro em torno de 290 nm(Luo et al., 2012)



**Figura 61 Morfologia e distribuição do tamanho da fibra concêntrica policaprolactona-alginato.**

Analisando a Figura 61 verifica-se fibras com tamanho ao redor de 214 nm com presença de defeitos e pérolas que podem ser explicados pelo método de preparação das fibras. Neste método usou-se a solução de PCI para a formação da fibra central e a solução de alginato para a formação da fibra de recobrimento. Durante a formação da fibra central o alginato foi se depositando formando pérolas e defeitos, causados por sua baixa capacidade de eletrofiação. O resultado pode ser explicado pela alta rigidez dos monômeros que compõem o polímero (Mackie et al., 1983).

Na Figura 62 apresenta-se a micrografia e distribuição de tamanho da fibra concêntrica PCI-gelatina (Con PCI-Gel).



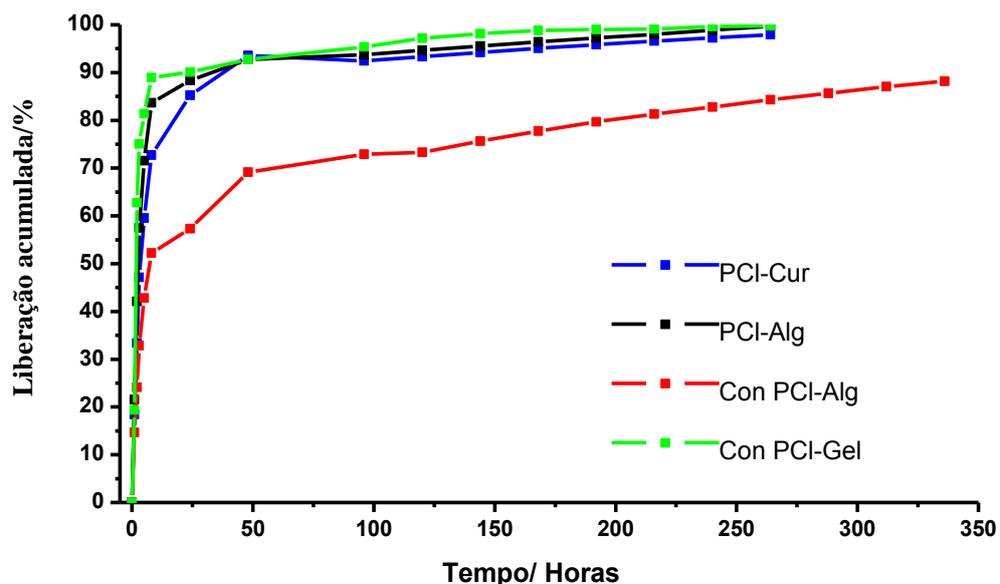
**Figura 62 Morfologia e distribuição de tamanho da fibra concêntrica policaprolactona-gelatina.**

Analisando a Figura 62 verifica-se a formação de fibras com tamanho entre 216 nm com distribuição uniforme. Foram encontrados defeitos como resultado da alta taxa de vazamento usada na solução de recobrimento de gelatina (1,8 mL·h), que foi 9 vezes superior às relatadas na literatura (Gautam et al., 2013).

Outro fator que pode ter influenciado a presença de imperfeições nas fibras é a concentração da solução de gelatina usada (Zhang et al., 2005; Gautam et al., 2013).

### 5.5 Cinéticas de liberação de curcumina

Na Figura 63 estão apresentados os perfis das cinéticas de liberação de curcumina das nanofibras preparadas. Analisando a Figura 63 se observa dois domínios de liberação das fibras. No primeiro domínio observou-se um efeito explosão liberando aproximadamente 80% da curcumina nas primeiras 8 horas, comportamento que não foi encontrado na fibra concêntrica PCI-alginato que liberou aproximadamente 50 % da carga nas primeiras 8 horas. O segundo domínio de liberação se estendeu por 264 horas liberando 95% carga.



**Figura 63** Cinéticas de liberação das fibras policaprolactona curcumina (PCI-Cur), policaprolactona-alginato (PCI-Alg), fibra concêntrica policaprolactona-alginato (Con PCI-Alg) e fibra concêntrica policaprolactona gelatina (Com PCI-Gel).

Analisando a Figura 63 observou-se dois domínios de liberação nas nanofibras avaliadas. No primeiro domínio observou-se um efeito explosão liberando aproximadamente 80% de curcumina durante as primeiras 8 horas de avaliação nas fibras uniaxial de policaprolactona, na fibra concêntrica policaprolactona-gelatina e na fibra policaprolactona-alginato. A fibra concêntrica policaprolactona alginato liberou uma menor quantidade de curcumina ao redor de 50% no mesmo período de tempo.

O segundo domínio de liberação se estendeu por 264 horas liberando 95% da carga de todas as nanofibras avaliadas. Os resultados mostraram uma cinética de liberação prolongada de curcumina na fibra concêntrica de PCI-alginato quando comparada com as outras fibras. Diferentes mecanismos participam do processo de liberação em nanofibras polimérica como processo de difusão, degradação da matriz e dissolução do fármaco (Chou et al., 2015). O processo de difusão está afetado por outras variáveis como tipo de fibra (uniaxial , coaxial), porosidade da matriz e interações entre a matriz e princípio ativo (Hrib et al., 2015).

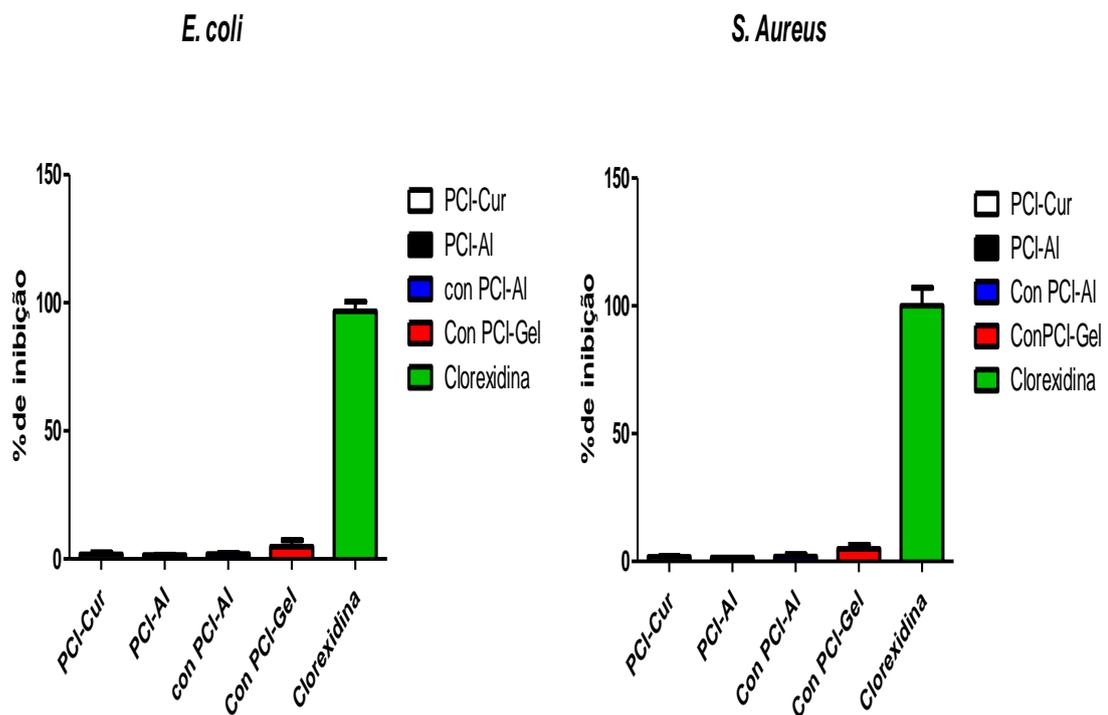
Por tanto as diferenças nas cinéticas de liberação podem ser explicadas pelo tipo de fibra, que no caso particular da estratégia do recobrimento com alginato prolongou o processo de liberação.

As cinéticas de liberação mostraram maiores porcentagens quando comparadas aos relatos da literatura (Merrell et al., 2009; Shao et al., 2011; Kim et al., 2012).

As altas taxas de liberação mostradas nas primeiras 8 horas foram consequência de modificação do meio de liberação com SDS 1% P/V. Encontram-se estudos na literatura que relatam taxa de liberação menores entre a matriz PCI e a curcumina (Chou et al., 2015).

## 5. 6 Avaliação microbiológica

Na Figura 64 estão apresentados os resultados de avaliação microbiológica das fibras P PCI-curcumina, PCI-Alginato, fibra concêntrica PCI-alginato e fibra concêntrica PCI-gelatina carregando frente as bacterias *E. coli* e *S. aureus*.



**Figura 64** Percentagem de inibição de crescimento de *E. coli* e *S.aureus* usando as fibras PoCl-curcumina, PCI-alginato, concêntrica PCI-alginato e concêntrica PCI gelatina.

Analisando a Figura 64 observou-se uma baixa ação antimicrobiana das nanofibras carregando curcumina. Os resultados podem ser explicados pelas interações hidrofóbicas entre a matriz policarprolactona e curcumina que dificultaram o processo de liberação (Letchford et al.; Feng et al., 2012). Outra razão da baixa atividade pode estar relacionada com alta resistência das bactérias testadas.

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que

- Os métodos de síntese das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) influenciaram nas propriedades físico-químicas.
- O método de síntese hidrotérmico permitiu formar nanopartículas com menores tamanhos e distribuição uniforme.
- Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) reduzidas mostraram maior intensidade de fotoluminescência.
- Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) reduzidas mostraram maior intensidade das sinais de EPR.
- Comprovou-se a eficácia do efeito antimicrobiano frente as bactérias fitopatogénicas com uso de nanopartícula de óxido zinco (ZnO) com as superfícies modificadas.
- A eficácia da atividade antimicrobiana por efeito fotocatalítico esta relacionada à formação de defeitos de superfície como vacâncias de oxigênio e zinco intersticial.
- Os defeitos na superfície das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) melhoram a capacidade de formação de radical hidroxila, que esta associada na eficácia da atividade antimicrobiana.
- Os resultados deste trabalho permitem demonstrar o uso de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) como plataformas eficientes na adsorção e liberação controlada de fármacos catiônicos como doxiciclina durante períodos prolongados.
- Foi evidenciado que as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) apresentam uma dupla vantagem para serem empregadas como antimicrobiano por efeito catalítico e como sistema de liberação controlada de doxiciclina.
- A estratégia de secagem por aspersão permitiu melhorar a solubilidade da curcumina em água em 12 vezes.
- As metodologias empregadas na preparação das nanopartículas poliméricas alginato-quitosana possibilitou a obtenção de nanopartículas com tamanhos entre 125 e 500 nm.
- As metodologias utilizadas na preparação de fibras poliméricas permitiram a obtenção de fibra com diâmetros entre 215 – 1000 nm.

- A estratégia de recobrimento da fibra concêntrica policaprolactona-alginato prolongou o tempo de liberação *in vitro* da curcumina.
- As nanopartículas poliméricas alginato-quitosana carregando curcumina não apresentaram atividade antimicrobiana frente as bactérias testadas.
- As fibras poliméricas não exibiram ação antimicrobiana nas bactérias testadas.

## Perspectivas

Como perspectivas para trabalhos futuros propõe-se:

- Padronizar metodologias para gerar defeitos fixos de superfície em nanopartículas de ZnO por médio de dopagem com outros metais como cromo, cobre e nióbio.
- Padronizar a metodologia de síntese hidrotérmica assistida por microondas visando melhorar a eficiência na produção destes materiais.
- Estudar o efeito dos surfactantes sobre a morfologia e o crescimento do cristal nas nanopartículas de óxido de zinco (ZnO)
- Estudar o efeito do crescimento do cristal de óxido de zinco (ZnO) sobre as atividades fotocatalítica e antimicrobiana
- Testar a matriz de óxido de zinco (ZnO) para a liberação de outros produtos de interesse agrônômico como adubos, herbicidas e inseticidas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) usando um modelo vegetal.

## Referências bibliográficas

- Administration UFD** (2016) CFR Code of Federal Regulations Title 21. *In* 21CFR182.8991, ed, Substances Generally Recognized with as Safe,
- Aggarwal B, Surh Y-J, Shishodia S, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H** (2007) Curcumin the indian gold. *In* The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease, Vol 595. Springer US, pp 1-75
- Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM** (2004) Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **100**: 5-28
- Al-Helw AA, Al-Angary AA, Mahrous GM, Al-Dardari MM** (1998) Preparation and evaluation of sustained release cross-linked chitosan microspheres containing phenobarbitone. *Journal of Microencapsulation* **15**: 373-382
- Allah MAA, Foda VH, Mahmoud RM, Arab AAA** (1987) X-Ray Diffraction of Starches Isolated from Yellow Corn, Sorghum, Sordan and Pearl Millet. *Starch - Stärke* **39**: 40-42
- Anderson Janotti and Chris GVdW** (2009) Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor. *Reports on Progress in Physics* **72**: 126501
- Aubert T, Burel A, Esnault M-A, Cordier S, Grasset F, Cabello-Hurtado F** (2012) Root uptake and phytotoxicity of nanosized molybdenum octahedral clusters. *Journal of hazardous Materials* **219-220**: 111-118
- Auffan M, Rose J, Bottero J-Y, Lowry GV, Jolivet J-P, Wiesner MR** (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology* **4**: 634-641
- Azam A, Ahmed AS, Oves M, Khan MS, Habib SS, Memic A** (2012) Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine* **7**: 6003-6009
- Azevedo MA, Bourbon AI, Vicente AA, Cerqueira MA** (2014) Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of biological macromolecules* **71**: 141-146
- Baghbanzadeh M, Carbone L, Cozzoli PD, Kappe CO** (2011) Microwave-Assisted Synthesis of Colloidal Inorganic Nanocrystals. **50**: 11312-11359
- Bahnemann DW, Kormann C, Hoffmann MR** (1987) Preparation and characterization of quantum size zinc oxide: a detailed spectroscopic study. *The Journal of Physical Chemistry* **91**: 3789-3798
- Baji A, Wong S-C, Liu T, Li T, Srivatsan TS** (2007) Morphological and X-ray diffraction studies of crystalline hydroxyapatite-reinforced polycaprolactone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **81B**: 343-350
- Balbi-Peña MI, Becker A, Stangarlin JR, Franzener G, Lopes MC, Schwan-Estrada KRF** (2006) Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina: I. avaliação in vitro. **31**: 310-314
- Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK** (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis* **6**: 71-79
- Bamiduro F, Ward MB, Brydson R, Milne SJ** (2014) Hierarchical Growth of ZnO Particles by a Hydrothermal Route. **97**: 1619-1624
- Banerjee SS, Chen D-H** (2007) Magnetic Nanoparticles Grafted with Cyclodextrin for Hydrophobic Drug Delivery. *Chemistry of Materials* **19**: 6345-6349
- Barnes RJ, Molina R, Xu J, Dobson PJ, Thompson IP** (2013) Comparison of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles for photocatalytic degradation of methylene blue and the correlated inactivation of gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of Nanoparticles Research* **15**: 1-11
- Beninca C, Demiate IM, Lacerda LG, Carvalho Filho MAS, Ionashiro M, Schnitzler E** (2008) Thermal behavior of corn starch granules modified by acid treatment at 30 and 50°C. *Eclética Química* **33**: 13-18

- Bhat K, Masood S, Bhat N, Bhat MA, Razvi S, Mir M, Akhtar S, Wani N, Habib M** (2010) Current status of post harvest soft rot in vegetables: a review. *Asian Journal of Plant Sciences* **9**: 200-208
- Biliaderis CG, Page CM, Maurice TJ, Juliano BO** (1986) Thermal characterization of rice starches: a polymeric approach to phase transitions of granular starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **34**: 6-14
- Borghetti AA, Palma MSA** (2014) Tetracycline: production, waste treatment and environmental impact assessment. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **50**: 25-40
- Bouchoucha M, Côté M-F, C.-Gaudreault R, Fortin M-A, Kleitz F** (2016) Size-Controlled Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles for Tunable Drug Release and Enhanced Anti-Tumoral Activity. *Chemistry of Materials* **28**: 4243-4258
- Brandão FD** (2008) Identificação, quantificação e controle de defeitos em monocristais e nanopartículas de TiO<sub>2</sub>. Federal University Of Minas Gerais, <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/IACO-7KVS58>
- Brostow W, Chiu R, Kalogeras IM, Vassilikou-Dova A** (2008) Prediction of glass transition temperatures: Binary blends and copolymers. **62**: 3152-3155
- Buettner GR** (1987) Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528V. *Free radicals in medicine and biology* **3**: 259-303
- Cai Q, Gao Y, Gao T, Lan S, Simalou O, Zhou X, Zhang Y, Harnode C, Gao G, Dong A** (2016) Insight into Biological Effects of Zinc Oxide Nanoflowers on Bacteria: Why Morphology Matters. *ACS Applied Materials & Interfaces* **8**: 10109-10120
- Campos EVR, de Oliveira JL, Fraceto LF, Singh B** (2015) Polysaccharides as safer release systems for agrochemicals. *Agronomy for sustainable development* **35**: 47-66
- Carvalho, Filho RC, Mello SCM** (2008) *Pectobacterium carotovorum*: taxonomia, identificação, sintomatologia, epidemiologia e controle. In *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos*, 261, Embrapa, p 17
- Charitidis CA, Georgiou P, Koklioti MA, Trompeta A-F, Markakis V** (2014) Manufacturing nanomaterials: from research to industry. *Manufacturing Review* **1**: 11
- Chen Z, Xia Y, Liao S, Huang Y, Li Y, He Y, Tong Z, Li B** (2014) Thermal degradation kinetics study of curcumin with nonlinear methods. **155**: 81-86
- Chou S-F, Carson D, Woodrow KA** (2015) Current strategies for sustaining drug release from electrospun nanofibers. *Select Contributions from the 17th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems (Salt Lake City, USA, 2015)* **220, Part B**: 584-591
- Cimitan S, Albonetti S, Forni L, Peri F, Lazzari D** (2009) Solvothermal synthesis and properties control of doped ZnO nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **329**: 73-80
- Cleonice C, Rudolfo BR, Fernando FC** (2016) Anuario Brasileiro de Hortaliças. In. Editora Gazzeta Santa Cruz Ltda, <http://www.editoragazeta.com.br/wp-content/uploads/2016/11/Hortali%C3%A7as-2016.pdf>, p 64
- CLSI** (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. In. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Colman T, Demiate I, Schnitzler E** (2014) The effect of microwave radiation on some thermal, rheological and structural properties of cassava starch. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **115**: 2245-2252
- Cover NF, Lai-Yuen S, Parsons AK, Kumar A** (2012) Synergetic effects of doxycycline-loaded chitosan nanoparticles for improving drug delivery and efficacy. *International Journal of Nanomedicine* **7**: 2411-2419
- Cuscó R, Alarcón-Lladó E, Ibáñez J, Artús L, Jiménez J, Wang B, Callahan MJ** (2007) Temperature dependence of Raman scattering in ZnO. *Physical Review B* **75**: 165202
- Cárdenas G, Patricia MS** (2004) FTIR AND TGA STUDIES OF CHITOSAN COMPOSITE FILMS. *Journal of the Chilean Chemical Society* **49**: 291-295
- Danks AE, Hall SR, Schnepf Z** (2016) The evolution of 'sol-gel' chemistry as a technique for materials synthesis. *Materials Horizons* **3**: 91-112

- Das RK, Kasoju N, Bora U** (2010) Encapsulation of curcumin in alginate-chitosan-pluronic composite nanoparticles for delivery to cancer cells. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **6**: 153-160
- Davis EA, Mott NF** (1970) Conduction in non-crystalline systems V. Conductivity, optical absorption and photoconductivity in amorphous semiconductors. *Philosophical Magazine* **22**: 0903-0922
- De S, Robinson D** (2003) Polymer relationships during preparation of chitosan–alginate and poly-L-lysine–alginate nanospheres. *Journal of control released* **89**: 101-112
- de-Luque AP** (2014) Nanotechnology research activities in the agricultural sector. *In* Poawotnftasfrtt field, ed. Join Research centre, [https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/ipts\\_jrc\\_89736\\_online\\_final.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/ipts_jrc_89736_online_final.pdf)
- Dizaj SM, Lotfipour F, Barzegar-Jalali M, Zarrintan MH, Adibkia K** (2014) Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **44**: 278-284
- Djurišić AB, Choy WCH, Roy VAL, Leung YH, Kwong CY, Cheah KW, Gundu Rao TK, Chan WK, Fei Lui H, Surya C** (2004) Photoluminescence and Electron Paramagnetic Resonance of ZnO Tetrapod Structures. *Advanced Functional Materials* **14**: 856-864
- Donati I, Holtan S, Mørch YA, Borgogna M, Dentini M** (2005) New Hypothesis on the Role of Alternating Sequences in Calcium–Alginate Gels. *Biomacromolecules* **6**: 1031-1040
- Douglas KL, Tabrizian M** (2005) Effect of experimental parameters on the formation of alginate–chitosan nanoparticles and evaluation of their potential application as DNA carrier. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **16**: 43-56
- Drouilly C, Krafft J-M, Averseng F, Casale S, Bazer-Bachi D, Chizallet C, Lecocq V, Vezin H, Lauron-Pernot H, Costentin G** (2012) ZnO Oxygen Vacancies Formation and Filling Followed by in Situ Photoluminescence and in Situ EPR. *The Journal of Physical Chemistry C* **116**: 21297-21307
- Dunne PW, Munn AS, Starkey CL, Huddle TA, Lester EH** (2015) Continuous-flow hydrothermal synthesis for the production of inorganic nanomaterials. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **373**
- Dupuy B, Arien A Fau - Perrot Minnot A, Perrot Minnot A** (1994) FT-IR of membranes made with alginate/polylysine complexes. Variations with the mannuronic or guluronic content of the polysaccharides. *Artificial cells blood and substitutes and Biotechnology* **22**
- Dutta RK, Nenavathu BP, Gangishetty MK** (2013) Correlation between defects in capped ZnO nanoparticles and their antibacterial activity. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology* **126**: 105-111
- Eichert T, Kurtz A, Steiner U, Goldbach HE** (2008) Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles. *Physiologia Plantarum* **134**: 151-160
- Elzein T, Nasser-Eddine M, Delaite C, Bistac S, Dumas P** (2004) FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. **273**: 381-387
- Emami J, Boushehri MSS, Varshosaz J** (2014) Preparation, characterization and optimization of glipizide controlled release nanoparticles. *Research in Pharmaceutical Sciences* **9**: 301-314
- Feng R, Song Z, Zhai G** (2012) Preparation and in vivo pharmacokinetics of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine* **7**: 4089-4098
- Fraceto LF, Grillo R, de Medeiros GA, Scognamiglio V, Rea G, Bartolucci C** (2016) Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have? **4**: 20
- Galema SA** (1997) Microwave chemistry. *Chemical Society Reviews* **26**: 233-238
- Gao P, Nie X, Zou M, Shi Y, Cheng G** (2011) Recent advances in materials for extended-release antibiotic delivery system. **64**: 625-634
- Gautam S, Chou C-F, Dinda AK, Potdar PD, Mishra NC** (2014) Surface modification of nanofibrous polycaprolactone/gelatin composite scaffold by collagen type I grafting for skin tissue engineering. **34**: 402-409
- Gautam S, Dinda AK, Mishra NC** (2013) Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method. **33**: 1228-1235

- German RM** (2016) Sintering Simplified: Surface Area, Density, and Grain Size Relations. *In Materials Science Forum*, Vol 835
- Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani M-H, Ramakrishna S** (2008) Electrospun poly( $\epsilon$ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *29*: 4532-4539
- Gogos A, Knauer K, Bucheli TD** (2012) Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization: Current State, Foreseen Applications, and Research Priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 9781-9792
- Government A** (2016) Patent analytics reports: Agricultural nanomaterials. *In* Department of industry ed, Vol 1. Department of industry, innovation and science, <https://www.ipaustralia.gov.au/understanding-ip>, p 22
- Guarino V, Cirillo V, Taddei P, Alvarez-Perez MA, Ambrosio L** (2011) Tuning Size Scale and Crystallinity of PCL Electrospun Fibres via Solvent Permittivity to Address hMSC Response. *Macromolecular Bioscience* **11**: 1694-1705
- Gul P, Bakht J** (2015) Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. *Journal of Food Science and Technology* **52**: 2272-2279
- Gusatti M, Barroso GS, Campos CEMd, Souza DARD, Rosário JdAd, Lima RB, Milioli CC, Silva LA, Riella HG, Kuhnen NC** (2011) Effect of different precursors in the chemical synthesis of ZnO nanocrystals. *Materials Research* **14**: 264-267
- Gómez-Guillén MC, Giménez B, López-Caballero ME, Montero MP** (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. 25 years of Advances in Food Hydrocolloid Research **25**: 1813-1827
- Hongyan Liu FZ, Yisong Lin, Guangyue Wang, and Feng Pan** (2013) Correlation of oxygen vacancy variations to band gap changes in epitaxial ZnO thin films. *Applied Physics Letters* **102**: 181908
- Hrib J, Sirc J, Hobzova R, Hampejsova Z, Bosakova Z, Munzarova M, Michalek J** (2015) Nanofibers for drug delivery – incorporation and release of model molecules, influence of molecular weight and polymer structure. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **6**: 1939-1945
- Il'ina AV, Varlamov VP** (2005) Chitosan-based polyelectrolyte complexes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **41**: 5-11
- Jacobson T J** (2010) Synthesis and characterisation of ZnO nanoparticles. An experimental investigation of some of their size dependent quantum effects. Uppsala Universitet, diva2:306210
- Jasim F, Talib T** (1992) Some observations on the thermal behaviour of curcumin under air and argon atmospheres. *Journal of thermal analysis* **38**: 2549-2552
- Jay Chithra M, Sathya M, Pushpanathan K** (2015) Effect of pH on Crystal Size and Photoluminescence Property of ZnO Nanoparticles Prepared by Chemical Precipitation Method. *Acta Metallurgica Sinica (English Letters)* **28**: 394-404
- Jensen KMØ** (2013) Watching Materials Form: Particle Formation and Growth in Hydrothermal Synthesis. Aarhus University, [http://pure.au.dk/portal/en/publications/id\(c1191b2e-f693-47f8-b5d1-748cec7f947d\).html](http://pure.au.dk/portal/en/publications/id(c1191b2e-f693-47f8-b5d1-748cec7f947d).html)
- Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC** (2008) Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **279**: 71-76
- Kaloustian J, Pauli AM, Pastor J** (1991) DTA identification of polycaprolactone. *Journal of thermal analysis* **37**: 1767-1773
- Kansal SK, Singh M, Sud D** (2008) Studies on TiO<sub>2</sub>/ZnO photocatalysed degradation of lignin. *Journal of Hazardous Materials* **153**: 412-417
- Kashyap PL, Xiang X, Heiden P** (2015) Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of biological macromolecules* **77**: 36-51
- Kayaci F, Ertas Y, Uyar T** (2013) Enhanced Thermal Stability of Eugenol by Cyclodextrin Inclusion Complex Encapsulated in Electrospun Polymeric Nanofibers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**: 8156-8165

- Khan MF, Ansari AH, Hameedullah M, Ahmad E, Husain FM, Zia Q, Baig U, Zaheer MR, Alam MM, Khan AM, AlOthman ZA, Ahmad I, Ashraf GM, Aliev G** (2016) Sol-gel synthesis of thorn-like ZnO nanoparticles endorsing mechanical stirring effect and their antimicrobial activities: Potential role as nano-antibiotics. *Scientific reports* **6**: 27689
- Kharisov BI, Kharissova OI, Méndez UO** (2012) Microwave hydrothermal and solvothermal processing of materials and compounds. *In* W Cao, ed, *The development and application microwave heating*. Intech, <http://www.intechopen.com/books/statistics/the-development-and-application-of-microwave-heating/>
- Ki CS, Baek DH, Gang KD, Lee KH, Um IC, Park YH** (2005) Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. **46**: 5094-5102
- Kim M-k, Choi G-j, Lee H-s** (2003) Fungicidal Property of Curcuma longa L. Rhizome-Derived Curcumin against Phytopathogenic Fungi in a Greenhouse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 1578-1581
- Kim Y-J, Park MR, Kim MS, Kwon OH** (2012) Polyphenol-loaded polycaprolactone nanofibers for effective growth inhibition of human cancer cells. **133**: 674-680
- Kizil R, Irudayaraj J, Seetharaman K** (2002) Characterization of Irradiated Starches by Using FT-Raman and FTIR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 3912-3918
- Kolbuk D, Sajkiewicz P, Denis P, Choinska E** (2013) Investigations of polycaprolactone/gelatin blends in terms of their miscibility. *In* *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences*, Vol 61, p 629
- Kolev TM, Velcheva EA, Stamboliyska BA, Spitteller M** (2005) DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. *International Journal of Quantum Chemistry* **102**: 1069-1079
- Kołodziejczak-Radzimska A, Jesionowski T** (2014) Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review. *Materials* **7**
- Kumar R, Gokulakrishnan N, Kumar R, Krishna VM, Saravanan A, Supriya S, Somanathan T** (2015) Can Be a Bimetal Oxide ZnO-MgO Nanoparticles Anticancer Drug Carrier and Deliver? Doxorubicin Adsorption/Release Study. *Journal of nanosciences and nanotechnology* **15**: 1543-1553
- Kurien BT, Singh A, Matsumoto H, Scofield RH** (2007) Improving the Solubility and Pharmacological Efficacy of Curcumin by Heat Treatment. *ASSAY and Drug Development Technologies* **5**: 567-576
- Kwon PC** (2013) Antimicrobial ball having antimicrobial function for plant cultivation and plant cultivation method using name. *In* TKC LTD, ed, Ed A01G1/00, C05D3/02, Korea
- Labet M, Thielemans W** (2009) Synthesis of polycaprolactone: a review. *Chemical Society Reviews* **38**: 3484-3504
- Lakshmi Prasanna V, Vijayaraghavan R** (2015) Insight into the Mechanism of Antibacterial Activity of ZnO: Surface Defects Mediated Reactive Oxygen Species Even in the Dark. *Langmuir* **31**: 9155-9162
- Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, Grøndahl L** (2007) Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* **8**: 2533-2541
- Layek A, Mishra G, Sharma A, Spasova M, Dhar S, Chowdhury A, Bandyopadhyaya R** (2012) A Generalized Three-Stage Mechanism of ZnO Nanoparticle Formation in Homogeneous Liquid Medium. *The Journal of Physical Chemistry C* **116**: 24757-24769
- Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ** (2013) Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature reviews microbiology* **11**: 371-384
- Letchford K, Liggins R, Burt H** Solubilization of hydrophobic drugs by methoxy poly(ethylene glycol)-block-polycaprolactone diblock copolymer micelles: Theoretical and experimental data and correlations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **97**: 1179-1190
- Li L, Fang Y, Vreeker R, Appelqvist I, Mendes E** (2007) Reexamining the Egg-Box Model in Calcium–Alginate Gels with X-ray Diffraction. *Biomacromolecules* **8**: 464-468

- Li P, Dai Y-N, Zhang J-P, Wang A-Q, Wei Q** (2008) Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine. *International Journal of Biomedical Science : IJBS* **4**: 221-228
- Li Y, Zhang W, Niu J, Chen Y** (2012) Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. *ACS Nano* **6**: 5164-5173
- Li Z, Wang C** (2013) Effects of Working Parameters on Electrospinning. *In One-Dimensional nanostructures*. Springer Berlin Heidelberg, pp 15-28
- Liu F, Avena-Bustillos RJ, Woods R, Chiou B-S, Williams TG, Wood DF, Bilbao-Sainz C, Yokoyama W, Glenn GM, McHugh TH, Zhong F** (2016) Preparation of Zein Fibers Using Solution Blow Spinning Method. *Journal of Food Science* **81**: N3015-N3025
- Liu JL, Luo Z, Bashir S** (2013) A progressive approach on inactivation of bacteria using silver-titania nanoparticles. *Biomaterials Science* **1**: 194-201
- Liu Y, He L, Mustapha A, Li H, Hu ZQ, Lin M** (2009) Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of applied microbiology* **107**: 1193-1201
- Ludi B, Niederberger M** (2013) Zinc oxide nanoparticles: chemical mechanisms and classical and non-classical crystallization. *Dalton Transactions* **42**: 12554-12568
- Luo CJ, Stride E, Edirisinghe M** (2012) Mapping the Influence of Solubility and Dielectric Constant on Electrospinning Polycaprolactone Solutions. *Macromolecules* **45**: 4669-4680
- Luo Y, Wang Q** (2014) Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **64**: 353-367
- Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A** (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the total environment* **408**: 3053-3061
- Mackie W, Perez S, Rizzo R, Taravel F, Vignon M** (1983) Aspects of the conformation of polyguluronate in the solid state and in solution. **5**: 329-341
- Manzoor U, Siddique S, Ahmed R, Noreen Z, Bokhari H, Ahmad I** (2016) Antibacterial, Structural and Optical Characterization of Mechano-Chemically Prepared ZnO Nanoparticles. *PLoS ONE* **11**: e0154704
- Maruyama CR, Guilger M, Pascoli M, Bileschy-José N, Abhilash PC, Fraceto LF, de Lima R** (2016) Nanoparticles Based on Chitosan as Carriers for the Combined Herbicides Imazapic and Imazapyr. **6**: 19768
- McCluskey MD, Jokela SJ** (2009) Defects in ZnO. *Journal of Applied Physics* **106**: 071101
- McManus P, Jones A** (1994) Epidemiology and genetic analysis of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* from Michigan and evaluation of oxytetracycline for control. *Phytopathology* **84**: 627-633
- McManus PS, Stockwell VO** (2001) Antibiotic use for plant disease management in the United states. *In Plant Health Progress*, Vol 2016, [www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/antibiotic/](http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/antibiotic/)
- Medina LFC, Stefani V, Brandelli A** (2004) Use of 1,4-naphthoquinones for control of *Erwinia carotovora*. *Canadian Journal of Microbiology* **50**: 951-956
- Merrell JG, McLaughlin SW, Tie L, Laurencin CT, Chen AF, Nair LS** (2009) Curcumin Loaded Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanofibers: Diabetic Wound Dressing with Antioxidant and Anti-inflammatory Properties. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **36**: 1149-1156
- Mishra RK, Majeed ABA, Banthia AK** (2011) Development and characterization of pectin/gelatin hydrogel membranes for wound dressing. *International Journal of Plastics Technology* **15**: 82-95
- Mitra S, Chandra S, Patra P, Pramanik P, Goswami A** (2011) *J. Mater. Chem.* **21**: 17638
- Mohan PRK, Sreelakshmi G, Muraleedharan CV, Joseph R** (2012) Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy* **62**: 77-84

- Monteiro I, Simarelli M, Matiass D** (2014) 2° Levantamento de dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil. *In* ABdcdsem abcsem, ed, Vol 2017, <http://www.abcsem.com.br/>
- Morales AE, Mora ES, Pal U** (2007) Use of diffuse reflectance spectroscopy for optical characterization of un-supported nanostructures. *Revista Mexicana de Física S* **53**: 18
- Murata Y, Maeda T, Miyamoto E, Kawashima S** (1993) Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads — effects of chitosan on gel matrix erosion. **96**: 139-145
- Muñoz MM** (2013) Síntese e caracterização das propriedades estruturais e morfológicas de de nanopartículas de ZnO. Universidade de Brasília, 2013
- Nascimento WM, Tavares PC** (2011) Panorama da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil. *In*. Embrapa.gov.br, [www.embrapa.br/hortalicas/publicações](http://www.embrapa.br/hortalicas/publicações)
- Navale GR, Thripuranthaka M, Late DJ, Shinde SS** (2015) Antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against pathogenic bacteria and fungi. *J Sci Med Nanotechnol Nanomed* **3**: 2-9
- Negi PS, Jayaprakasha GK, Rao LJM, Sakariah KK** (1999) Antibacterial activity of turmeric oil: A byproduct from curcumin manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 4297-4300
- Novae V** (2016) Indicadores económicos. *In*, Vol 2017. MAPA, <http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias>
- Oliveira Nd** (2017) PIB fecha com queda no 2015. *In* IBGE, ed, Vol 2017, [agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia](http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia)
- Otoni CG, Espitia PJP, Avena-Bustillos RJ, McHugh TH** (2016) Trends in antimicrobial food packaging systems: Emitting sachets and absorbent pads. *Food research international* **83**: 60-73
- O'Neill J** (2015) Antimicrobials in agricultural and the environment: Reducing unnecessary use and waste. *In*, <https://amr-review.org/Publications>
- Pacchioni G** (2003) Oxygen Vacancy: The Invisible Agent on Oxide Surfaces. *ChemPhysChem* **4**: 1041-1047
- Pacchioni G** (2015) Numerical Simulations of Defective Structures: The Nature of Oxygen Vacancy in Non-reducible (MgO, SiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>) and Reducible (TiO<sub>2</sub>, NiO, WO<sub>3</sub>) Oxides. *In*. Springer International Publishing, Cham, pp 1-28
- Pasquet J, Chevalier Y, Pelletier J, Couval E, Bouvier D, Bolzinger M-A** (2014) The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and surface A physicochemical and engineering aspects* **457**: 263-274
- Pereira AGB, Fajardo AR, Nocchi S, Nakamura CV, Rubira AF, Muniz EC** (2013) Starch-based microspheres for sustained-release of curcumin: Preparation and cytotoxic effect on tumor cells. **98**: 711-720
- Pereira F, da Silva Agostini D, Job A, González E** (2013) Thermal studies of chitin–chitosan derivatives. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **114**: 321-327
- Peretto G, Du W-X, Avena-Bustillos RJ, De J. Berrios J, Sambo P, McHugh TH** (2017) Electrostatic and Conventional Spraying of Alginate-Based Edible Coating with Natural Antimicrobials for Preserving Fresh Strawberry Quality. *Food and Bioprocess Technology* **10**: 165-174
- Pham QP, Sharma U, Mikos AG** (2006) Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue engineering* **12**: 1197-1211
- Phogat N, Khan SA, Shankar S, Ansary AA, Uddin I** (2016) Fate of inorganic nanoparticles of agriculture. *In* Advanced materials letters, Vol 7. [www.vbripress.com](http://www.vbripress.com), [http://www.vbripress.com/aml/uploads/5679744f850b31450800207\\_fullabstratct.pdf](http://www.vbripress.com/aml/uploads/5679744f850b31450800207_fullabstratct.pdf), pp 7-12
- Pillai CKS, Paul W, Sharma CP** (2009) Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **34**: 641-678
- Pourrahimi AM, Liu D, Pallon LKH, Andersson RL, Martinez Abad A, Lagaron JM, Hedenqvist MS, Strom V, Gedde UW, Olsson RT** (2014) Water-based synthesis and cleaning methods for high purity ZnO nanoparticles - comparing acetate, chloride, sulphate and nitrate zinc salt precursors. *RSC Advances* **4**: 35568-35577

- Pourrahimi AM, Liu D, Strom V, Hedenqvist MS, Olsson RT, Gedde UW** (2015) Heat treatment of ZnO nanoparticles: new methods to achieve high-purity nanoparticles for high-voltage applications. *Journal of Materials Chemistry A* **3**: 17190-17200
- protection VC** (2017) Vive Crop protection. *In* DA Cinthia Goh, Jordan Dinglasan, Jane Goh, Richard Loo., ed, Vive Crop protection, Vol 16-03-2017, <http://vivecrop.com/>
- Prystupa DA, Donald AM** (1996) Infrared study of gelatin conformations in the gel and sol states. **4**: 87-110
- Puoci F, Iemma F, Spizzirri UG, Cirillo G, Curcio M, Picci N** (2008) Polymer in Agriculture: A Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* **3**: 299-314
- Pérez-y-Terrón R, Villegas MC, Cuellar A, Muñoz-Rojas J, Castañeda-Lucio M, Hernández-Lucas I, Bustillos-Cristales R, Bautista-Sosa L, Munive JA, Caicedo-Rivas R, Fuentes-Ramírez LE** (2009) Detection of *Pantoea ananatis*, causal agent of leaf spot disease of maize, in Mexico. *Australasian plant Diseases Notes* **4**: 96-99
- Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC** (2011) Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Langmuir* **27**: 4020-4028
- Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D** (2008) Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochemical Journal* **410**: 147-155
- Rana AuHS, Kang M, Kim H-S** (2016) Microwave-assisted Facile and Ultrafast Growth of ZnO Nanostructures and Proposition of Alternative Microwave-assisted Methods to Address Growth Stoppage. **6**: 24870
- Rao JP, Geckeler KE** (2011) Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Special Issue on Composites* **36**: 887-913
- Regitano JB, Leal RMP** (2010) Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **34**: 601-616
- Rehm BHA** (2009) *Alginates: Biology and Applications: Biology and Applications*. Springer
- Rinaudo M** (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. **31**: 603-632
- Rosenthal I, Krishna CM, Yang GC, Kondo T, Riesz P** (1987) A new approach for EPR detection of hydroxyl radicals by reaction with sterically hindered cyclic amines and oxygen. **222**: 75-78
- Rudrappa T, Bais HP** (2008) Curcumin, a Known Phenolic from *Curcuma longa*, Attenuates the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in Whole Plant and Animal Pathogenicity Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 1955-1962
- S.J Gregg KSWs** (1982) Adsorption, Surface Area and Porosity. *In* KSWs Sidney Jhon Gregg, H.F Stoeckli, ed, Vol 86. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p 957
- Saied Noura AM** (2014) Zeta potential and turbidimetry analyzes for the evaluation of chitosan-phytic acid complex formation. *In* Journal of food research, Vol vol 3. canadiancenter of science education, canadian center of science education, p 11
- Sartori C** (1997) *The Characterisation of Alginate Systems for Biomedical Applications*. Brunel University
- Schiffman JD, Schauer CL** (2008) A Review: Electrospinning of Biopolymer Nanofibers and their Applications. *Polymer Reviews* **48**: 317-352
- Schmid G, Fenske D** (2010) Metal clusters and nanoparticles. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **368**: 1207
- Schumm M** (2010) ZnO-based semiconductors studied by Raman spectroscopy: semimagnetic alloying, doping and nanostructures. *Suedwestdeutscher Verlag fuer Hochschulschriften*
- Shandilya M, Rai R, Singh J** (2016) Review: hydrothermal technology for smart materials. *Advances in Applied Ceramics* **115**: 354-376
- Shao S, Li L, Yang G, Li J, Luo C, Gong T, Zhou S** (2011) Controlled green tea polyphenols release from electrospun PCL/MWCNTs composite nanofibers. **421**: 310-320
- Sharma PK, Pandey AC, Zolnierkiewicz G, Guskos N, Rudowicz C** (2009) Relationship between oxygen defects and the photoluminescence property of ZnO nanoparticles: A spectroscopic view. *Journal of Applied Physics* **106**: 094314

- Shi R, Yang P, Wang J, Zhang A, Zhu Y, Cao Y, Ma Q** (2012) Growth of flower-like ZnO via surfactant-free hydrothermal synthesis on ITO substrate at low temperature. *CrystEngComm* **14**: 5996-6003
- Siddaramaiah, Swamy TMM, Ramaraj B, Lee JH** (2008) Sodium alginate and its blends with starch: Thermal and morphological properties. *Journal of Applied Polymer Science* **109**: 4075-4081
- Simsek-Ege FA, Bond GM, Stringer J** (2003) Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. *Journal of Applied Polymer Science* **88**: 346-351
- Sing KSW** (1989) The use of gas adsorption for the characterization of porous solids. 6th International Conference on Surface and Colloid Science **38**: 113-124
- Singh PK, Wani K, Kaul-Ghanekar R, Prabhune A, Ogale S** (2014) From micron to nano-curcumin by sophorolipid co-processing: highly enhanced bioavailability, fluorescence, and anti-cancer efficacy. *RSC Advances* **4**: 60334-60341
- Sirelkhatim A, Mahmud S, Seeni A, Kaus NHM, Ann LC, Bakhori SKM, Hasan H, Mohamad D** (2015) Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro letters* **7**: 219-242
- Soares JP, Santos JE, Chierice GO, Cavalheiro ETG** (2004) Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química* **29**: 57-64
- Son WK, Youk JH, Lee TS, Park WH** (2004) The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. **45**: 2959-2966
- Stockwell V, Duffy B** (2012) Use of antibiotics in plant agriculture.
- Swadeshmukul S** (2010) Silica based antibacterial and antifungal nanoFórmulation. *In* UCoFR Foundation, ed, Ed A61K31/44 Vol WO2010068275 A1, United States
- Swamy TMM, Ramaraj B, Siddaramaiah** (2010) Sodium Alginate and Poly(ethylene glycol) Blends: Thermal and Morphological Behaviors. *Journal of Macromolecular Science, Part A* **47**: 877-881
- Szekalska M, Sosnowska K, Zakrzewska A, Kasacka I, Lewandowska A, Winnicka K** (2017) The Influence of Chitosan Cross-linking on the Properties of Alginate Microparticles with Metformin Hydrochloride—In Vitro and In Vivo Evaluation. *Molecules* **22**
- Søndergaard M, Bøjesen ED, Christensen M, Iversen BB** (2011) Size and Morphology Dependence of ZnO Nanoparticles Synthesized by a Fast Continuous Flow Hydrothermal Method. *Crystal Growth & Design* **11**: 4027-4033
- Tauc J, Grigorovici R, Vancu A** (1966) Optical Properties and Electronic Structure of Amorphous Germanium. *Physic status solid* **15**: 627-637
- Thanh NTK, Maclean N, Mahiddine S** (2014) Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. *Chemical Reviews* **114**: 7610-7630
- Thommes M, Kaneko K, Neimark Alexander V, Olivier James P, Rodriguez-Reinoso F, Rouquerol J, Sing Kenneth SW** (2015) Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *In* Pure and Applied Chemistry, Vol 87, p 1051
- Thompson CJ, Chase GG, Yarin AL, Reneker DH** (2007) Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. **48**: 6913-6922
- Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K** (2015) Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLoS ONE* **10**: e0121313
- Vaezi MR, Sadrnezhaad SK** (2007) Nanopowder synthesis of zinc oxide via solochemical processing. *Materials & Design* **28**: 515-519
- Vahling-Armstrong C, Dung JKS, Humann JL, Schroeder BK** (2016) Effects of postharvest onion curing parameters on bulb rot caused by *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis* and *Pantoea allii* in storage. *plant Pathology* **65**: 536-544
- Vallet-Regí M, Balas F, Arcos D** (2007) Mesoporous Materials for Drug Delivery. **46**: 7548-7558
- van Hoogmoed CG, Busscher HJ, de Vos P** (2003) Fourier transform infrared spectroscopy studies of alginate-PLL capsules with varying compositions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **67A**: 172-178

- Wahab R, Ansari SG, Kim YS, Song M, Shin H-S** (2009) The role of pH variation on the growth of zinc oxide nanostructures. *Applied surface science* **255**: 4891-4896
- Wan Y, Lu X, Dalai S, Zhang J** (2009) Thermophysical properties of polycaprolactone/chitosan blend membranes. **487**: 33-38
- Wang J, Wang Z, Huang B, Ma Y, Liu Y, Qin X, Zhang X, Dai Y** (2012) Oxygen Vacancy Induced Band-Gap Narrowing and Enhanced Visible Light Photocatalytic Activity of ZnO. *ACS Applied Materials & Interfaces* **4**: 4024-4030
- Wang P, Lombi E, Zhao F-J, Kopittke PM** (2016) Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in Plant Science* **21**: 699-712
- Wang X, Zhao H, Turng L-S, Li Q** (2013) Crystalline Morphology of Electrospun Poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) Nanofibers. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **52**: 4939-4949
- Wei H, Wu Y, Lun N, Hu C** (2005) Hydrothermal synthesis and characterization of ZnO nanorods. *Materials Science and Engineering: A* **393**: 80-82
- Xu X, Chen D, Yi Z, Jiang M, Wang L, Zhou Z, Fan X, Wang Y, Hui D** (2013) Antimicrobial Mechanism Based on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation at Oxygen Vacancies in ZnO Crystals. *Langmuir* **29**: 5573-5580
- Yallapu MM, Gupta BK, Jaggi M, Chauhan SC** (2010) Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. **351**: 19-29
- Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC** (2010)  $\beta$ -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. **79**: 113-125
- Zak AK, Abrishami ME, Majid WHA, Yousefi R, Hosseini SM** (2011) Effects of annealing temperature on some structural and optical properties of ZnO nanoparticles prepared by a modified sol-gel combustion method. *Ceramics International* **37**: 393-398
- Zhang J, Zhao B, Pan Z, Gu M, Punnoose A** (2015) Synthesis of ZnO Nanoparticles with Controlled Shapes, Sizes, Aggregations, and Surface Complex Compounds for Tuning or Switching the Photoluminescence. *Crystal Growth & Design* **15**: 3144-3149
- Zhang M, Guo Y, Powell CA, Doud MS, Yang C, Duan Y** (2014) Effective Antibiotics against '*Candidatus* *Liberibacter asiaticus*' in HLB-Affected Citrus Plants Identified via the Graft-Based Evaluation. *PLoS ONE* **9**: e111032
- Zhang R, Yin P-G, Wang N, Guo L** (2009) Photoluminescence and Raman scattering of ZnO nanorods. *Solid state sciences* **11**: 865-869
- Zhang Y, Ouyang H, Lim CT, Ramakrishna S, Huang Z-M** (2005) Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **72B**: 156-165
- Zhu Y-J, Chen F** (2014) Microwave-Assisted Preparation of Inorganic Nanostructures in Liquid Phase. *Chemical Reviews* **114**: 6462-6555
- Zong X, Kim K, Fang D, Ran S, Hsiao BS, Chu B** (2002) Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. **43**: 4403-4412
- Zorofchian Moghadamtousi S, Abdul Kadir H, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K** (2014) A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International* **2014**: 12
- Østberg T, Lund EM, Graffner C** (1994) Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: IV. Release characteristics in different media. **112**: 241-248