



Universidade de Aveiro
2015

Departamento de Engenharia de Materiais e
Cerâmica

**Mário Filipe Guerra
Caetano**

**Propriedades antibacterianas de compósitos de
PU/npZnO**



**Mário Filipe Guerra
Caetano**

**Propriedades antibacterianas de compósitos de
PU/npZnO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Materiais e Dispositivos Biomédicos, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes, Professora associada do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica (DEMaC) da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa, Professora auxiliar, do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica (DEMaC) da Universidade de Aveiro.

O júri

Presidente

Professor Doutor José Maria da Fonte Ferreira
Professor Associado com Agregação da Universidade de Aveiro

Professor Doutor José Martinho Marques de Oliveira
Professor Coordenador sem Agregação da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes
Professora Associada da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Durante a realização deste longo trabalho tive o apoio de várias pessoas às quais não podia deixar de agradecer.

Em primeiro, gostaria de expressar um agradecimento especial às minhas orientadoras, a Professora Doutora Maria Helena Figueira Vaz Fernandes e a Professora Doutora Maria Elizabete Jorge Vieira da Costa, pelo fulcral papel que desempenharam ao longo de toda a dissertação, sempre com o máximo empenho e disponibilidade para esclarecer as minhas dúvidas e oferecer sugestões de melhorias e correções a fazer.

Em segundo, um especial agradecimento à Professora Doutora Cláudia Oliveira, Professora auxiliar convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, por todo o apoio, toda a contribuição, e todo o tempo despendido para este trabalho que sem a sua ajuda não teria sido possível ser realizado.

Também um especial agradecimento aos colegas Diogo Almeida e Joana Baltazar por toda a ajuda fornecida, especialmente no início do trabalho prático, mas também pela constante disponibilidade para esclarecimento de eventuais dúvidas.

Aos Técnicos do Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro, um especial agradecimento por todo o apoio e disponibilidade que mostraram ao longo da realização desta dissertação.

Aos meus colegas de turma e grandes amigos, um enorme obrigado por todo o apoio prestado, por todos os momentos de desconpressão e todos os bons momentos passados, pois sem eles este caminho seria muito mais difícil de percorrer.

Por fim, um eterno obrigado aos meus pais e irmão por todo o apoio que me prestaram desde o início pois sem eles não seria quem sou, nem estaria onde estou.

Palavras-chave

Óxido de zinco, nanopartículas, compósitos, poliuretano, ROS, propriedades antibacterianas.

Resumo

O óxido de zinco, sob a forma de nanopartículas (npZnO), é um tema de elevado interesse na actualidade. É no entanto sabido que as suas propriedades e efeitos biológicos são muito dependentes do método de síntese. Nesse contexto, características como o comportamento antibacteriano e a citotoxicidade encontram-se ainda pouco estudadas. Tal como outros materiais nanoestruturados, o óxido de zinco, quando na forma de nanopartículas, pode ser potencialmente perigoso para o organismo humano caso as suas propriedades não sejam bem controladas. A fixação destas nanopartículas numa matriz de poliuretano, formando compósitos de PU/npZnO, é uma possível via de controlar essas propriedades.

Trabalhos preliminares anteriormente realizados no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro estabeleceram as condições necessárias para a síntese de npZnO, e para a preparação de compósitos de PU/npZnO, com características promissoras para utilização como agentes antibacterianos.

O presente estudo teve como objectivo avaliar as propriedades antibacterianas de partículas de óxido de zinco nanoestruturadas, e de compósitos de PU/npZnO. Mais concretamente, pretende-se compreender qual o impacto das nanopartículas de óxido de zinco, sintetizadas com diferentes características físicas e químicas, bem como os compósitos, nos organismos vivos, designadamente bactérias. Foram sintetizadas nanopartículas de óxido de zinco, por precipitação química à temperatura ambiente, em condições de sobressaturação diferentes. Obtiveram-se nanoestruturas porosas e de elevada área superficial, mas com características fortemente condicionadas pelas condições de síntese. Além disso, as npZnO sintetizadas evidenciaram também características de superfície diferentes, refletidas pelas suas curvas de potencial zeta, que são distintas. Efectuaram-se estudos antibacterianos, com a estirpe de bactérias *E.Coli ATCC 25922*. Observou-se que, embora tendam a favorecer a proliferação bacteriana, se usadas em baixa concentração, as npZnO apresentam comportamento antibacteriano que se acentua quando se aumenta a concentração das npZnO. Deve referir-se que as npZnO, com menor valor de área superficial específica e potencial zeta mais acentuado foram as que apresentaram uma redução quase total da viabilidade bacteriana para a máxima concentração testada. Os compósitos PU/npZnO, preparados com as mesmas npZnO acima referidas, evidenciaram o mesmo comportamento. Estes resultados indiciam que

o estado de superfície das npZnO tem um contributo efetivo para o comportamento antibacterianos das mesmas.

Em conclusão, as npZnO sintetizadas no presente trabalho possuem propriedades antibacterianas, sendo possível a sua fixação numa matriz de poliuretano formando um compósito PU/npZnO, também ele com propriedades antibacterianas, com potencial interesse para tratamento localizado.

Keywords

Zinc oxide, nanoparticles, composite, polyurethane, ROS, antibacterial properties.

Abstract

Zinc oxide in the form of nanoparticles (npZnO) is currently a topic of high interest. However it is known that its properties and biological effects are highly dependent on the method of synthesis. In that context, characteristics such as the antibacterial performance and cytotoxicity are however still very little explored. Like other nanostructured materials, zinc oxide, when presented in the form of nanoparticles, can be potentially dangerous to the human body if their properties are not well controlled. Fixing these nanoparticles in a matrix of polyurethane (PU), forming a composite PU/npZnO is a possible way to control these properties.

Preliminary work previously carried out in the Department of Materials Engineering and Ceramics of the University of Aveiro have established the necessary conditions for the synthesis of npZnO, and for the composite PU/npZnO, with promising characteristics for use as antibacterial agents.

The present study aims to assess the antibacterial properties of nanostructured zinc oxide particles, and of the composite PU/npZnO. Specifically, the objective is to understand to what extent zinc oxide nanoparticles, synthesized with different physical and chemical characteristics, and their composites PU/npZnO, impact living organisms, particularly bacteria.

Zinc oxide nanoparticles were synthesized by a chemical precipitation method at room temperature, using different supersaturation conditions. ZnO porous nanostructures with a high surface area were obtained, but morphological characteristics strongly influenced by the conditions of synthesis. In addition, the synthesized npZnO also showed different surface characteristics as reflected by their zeta potential curves which are different. Antibacterial studies were carried out with the bacterial strain *E. Coli ATCC 25922*. Although npZnO tend to favor the bacterial growth when used in a low concentration, npZnO exhibit an antibacterial behavior that increases with the increasing concentration of npZnO. It should also be noted that npZnO with lower specific surface area and lower zeta potential showed the almost total reduction of bacterial viability for the highest concentration tested. The composites PU/npZnO prepared with the same npZnO mentioned above, also showed the same behavior.

As conclusion, the npZnO synthesized in this work exhibit antibacterial properties. Furthermore it is possible to fix the npZnO in a polyurethane matrix, obtaining a composite with antibacterial properties which might offer a potential interest for localized treatment.

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	vii
Abreviaturas.....	ix
Capítulo 1	1
1.Introdução.....	3
1.1. Objectivos.....	4
1.2. Estrutura da tese.....	5
Capítulo 2	7
2.Revisão da Literatura.....	9
2.1. Poliuretano	9
2.1.1.Química dos poliuretanos	10
2.1.2.Poliol	11
2.1.3.Isocianato	12
2.1.4.Extensor de Cadeia	13
2.1.5.Aplicações do Poliuretano	14
2.1.6.Importância da Degradação do Poliuretano.....	15
2.1.7.Mecanismos de Degradação	15
2.2. Óxido de Zinco	16
2.2.1.Propriedades antibacterianas do óxido de zinco	20
2.2.2.Citotoxicidade do óxido de zinco.....	24
2.3. Compósitos de PU e Nanopartículas de ZnO	26
Capítulo 3	29
3.Procedimento Experimental	31
3.1. Materiais e reagentes utilizados	31
3.2. Síntese das Nanopartículas de Óxido de Zinco.....	32
3.3. Preparação dos compósitos de Poliuretano e nanopartículas de Óxido de Zinco	35
3.4. Estudo das propriedades antibacterianas	37
3.5. Técnicas de Caracterização	38
3.5.1.Difração de Raios X.....	38

3.5.2. Microscopia Eletrônica de Varrimento	39
3.5.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva	40
3.5.4. Adsorção gasosa para determinação da Área Superficial Específica	41
3.5.5. Potencial Zeta	46
Capítulo 4	49
4. Resultados e Discussão.....	51
4.1. Caracterização das nanopartículas de óxido de zinco	51
4.1.1. Composição e cristalinidade	51
4.1.2. Morfologia da Partícula	52
4.1.3. Porosidade e área superficial específica	56
4.1.4. Potencial Zeta	61
4.2. Caracterização do Poliuretano	62
4.3. Caracterização dos compósitos PU/npZnO	64
4.4. Estudo das propriedades antibacterianas	65
4.4.1. Comportamento antibacteriano das nanopartículas de Óxido de Zinco.....	66
4.4.2. Comportamento antibacteriano dos compósitos PU/npZnO.....	71
Capítulo 5	77
5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos	79
6. Referências.....	81
7. Anexos.....	91

Índice de Figuras

Figura 1 - Reação entre um isocianato e um grupo hidroxilo, formando a ligação uretano.	9
Figura 2 – Ilustração da reação de síntese de um poliuretano, com realce da ligação uretano.	10
Figura 3 – Ilustração da reação do isocianato com a água.....	10
Figura 4 - Macroglicóis utilizados na síntese de poliuretano.....	11
Figura 5 - Diisocianatos utilizados na síntese de poliuretanos.....	12
Figura 6 - Ilustração da reação de extensão de cadeia entre o extensor de cadeia, diol(a) ou amina (b), e o isocianato.....	13
Figura 7 - Extensores de cadeia frequentemente usados na síntese de poliuretanos.	14
Figura 8 - Estrutura cristalina hexagonal da Wurtzite (a) e estrutura cristalina cúbica da Blenda (b) [41].	17
Figura 9 - Forma de alguns nanomateriais. Adaptado de [48].	18
Figura 10 - Exemplos de diferentes morfologias de nanoestruturas de óxido de zinco. A) Nanoaneis ([58]), B) Nanopregos ([59]), C) Nanocasulos ([61]), D) Nanoagulhas ([60]), E) Nanofitas ([25])e F) Pontos Quânticos ([40]).	20
Figura 11 - Ilustração do mecanismo de produção de ROS pelo óxido de zinco [73], [74].	21
Figura 12 – Ilustração do mecanismo de citotoxicidade do ZnO [9].....	22
Figura 13 - Ilustração da peroxidação lipídica [73].	23
Figura 14 – Micrografia de microscopia eletrónica de transmissão de <i>Escherichia Coli</i> , após tratamento com nanopartículas de ZnO (pontos negros), evidenciando uma rotura da membrana celular e exposição e libertação do conteúdo intracelular [67].....	23
Figura 15 - Ilustração do mecanismo proposto da resposta do supressor tumoral p53 à ação das nanopartículas de ZnO. Adaptado de [84].	25
Figura 16 - Esquema do procedimento experimental usado na síntese dos pós de óxido de zinco precipitados.	32
Figura 17 – (a) Imagem do dispersor utilizado na síntese das nanopartículas ilustrando o posicionamento dos orifícios superior (OS) e lateral (OL) e (b) e ilustração esquemática, em corte, do seu modo de funcionamento (b).	33
Figura 18 - Montagem experimental utilizada na síntese das nanopartículas de ZnO.	34
Figura 19 - Esquema ilustrativo da preparação dos compósitos de poliuretano e óxido de zinco.	36

Figura 20 - Ilustração esquemática da Lei de Bragg.	39
Figura 21 - Exemplo típico de um espectro de EDS.	41
Figura 22 - Os quatro passos que descrevem a adsorção de gás segundo <i>Braunauer, Emmett e Teller</i> . (1) processo inicial de adsorção, (2) formação da monocamada, (3) formação da multicamada e (4) preenchimento dos poros.	42
Figura 23 - Padrões IUPAC das isotérmicas para sólidos porosos ou pós [101].	43
Figura 24 - Classificação IUPAC dos ciclos de histerese [101].	44
Figura 25 - Imagem representativa da dupla camada elétrica.	47
Figura 26 - Difratoograma de raios X dos pós de óxido de zinco comerciais (ZnO-C) e dos sintetizados pelo método de precipitação química (ZnO-1 e ZnO-2).	51
Figura 27 - Micrografias dos pós comerciais de óxido de zinco (ZnO-C) obtidas por SEM, com diferentes ampliações.	53
Figura 28 - Micrografia dos pós precipitados de óxido de zinco ZnO-1 obtidas por SEM, com diferentes ampliações.	53
Figura 29 - Micrografia dos pós precipitados de óxido de zinco ZnO-1 obtidas por SEM, com diferentes ampliações, com identificação da espessura (E) das subunidades em forma de nanoplacas.	53
Figura 30 - Micrografias dos pós precipitados de óxido de zinco ZnO-2 obtidas por SEM, com diferentes ampliações.	54
Figura 31 - Micrografia dos pós precipitados de óxido de zinco ZnO-2 obtidas por SEM, com diferentes ampliações, com identificação da espessura (E) das subunidades em forma de nanoplacas.	54
Figura 32 - Espectro de EDS dos pós precipitados de óxido de zinco, onde se evidenciam os picos correspondentes aos elementos detectados na amostra: Carbono (C), Oxigénio (O) e Zinco (Zn).	56
Figura 33 - Isotérmica de adsorção/dessorção de BET dos pós precipitados (ZnO-1 e ZnO-2) e comerciais (ZnO-C) de óxido de zinco.	58
Figura 34 - Curvas cumulativas do volume de poro dos pós precipitados de ZnO-1 e ZnO-2 e comerciais de óxido de zinco.	59
Figura 35 – Curvas de distribuição de tamanho de poro dos pós precipitados ZnO-1 e ZnO-2 e comerciais ZnO-C de óxido de zinco.	59
Figura 36 - Curvas de potencial zeta dos pós precipitados (ZnO-1 e ZnO-2) e dos pós comerciais (ZnO-C) de óxido de zinco.	61
Figura 37 - Difratoograma de raios X da membrana de poliuretano puro.	63

Figura 38 - Fotografia da membrana de poliuretano puro (a), evidenciando o seu aspecto macroscópico, e micrografia do mesmo filme (b), ilustrando o seu aspecto microestrutural, obtida por SEM.	63
Figura 39 - Fotografia dos vários tipos de compósitos preparados ao longo deste projeto com os pós de óxido de zinco precipitados (CP1-30) e com os pós de óxido de zinco adquirido comercialmente (CC-30), e o filme de poliuretano puro (C0).	64
Figura 40 - Difractograma de raios X da membrana de poliuretano puro e dos compósitos de PU/npZnO.....	65
Figura 41 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana com os pós de óxido de zinco.	66
Figura 42 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, efectuados com os pós de ZnO, usando uma concentração de 1 mg/ml.	67
Figura 43 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, efectuados com os pós de ZnO, usando uma concentração de 5 mg/ml.	67
Figura 44 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, efectuados com os pós de ZnO, usando uma concentração de 10 mg/ml.	68
Figura 45 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os pós, usando uma concentração de 15 mg/ml.	69
Figura 46 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os pós, usando uma concentração de 20 mg/ml.	69
Figura 47 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos de poliuretano e óxido de zinco.	72
Figura 48 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos, usando uma concentração de 20 mg/ml.	73
Figura 49 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos, usando uma concentração de 40 mg/ml.	73
Figura 50 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos, usando uma concentração de 60 mg/ml.	74

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Propriedades do Óxido de Zinco [1].....	17
Tabela 2 - Materiais e reagentes utilizados na síntese das nanopartículas e na produção de compósitos (incluindo a sua fórmula química, a empresa fornecedora e o grau de pureza).	31
Tabela 3 - Quantidade de reagentes utilizada na preparação das soluções precursoras da síntese das nanopartículas de ZnO.	34
Tabela 4 - Especificações e designações das membranas produzidas.	37
Tabela 5 - Algumas características dos pós comerciais (ZnO-C) e precipitados (ZnO-1 e ZnO-2).	60

Abreviaturas

Abreviatura	Descrição
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
UV	Ultravioleta
GSSH	Glutathiona oxidada
GSH	Glutathiona reduzida
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SNC	Sistema Nervoso Central
DRX	Difração por Raios X
SEM	Microscopia Eletrônica de Varrimento
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
BET	Isotérmica de <i>Braunauer – Emmett - Teller</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
SSA	Área Superficial Específica

Capítulo 1

Introdução e Objectivos

1. Introdução

O óxido de zinco (ZnO) é um óxido semiconductor, com propriedades piezoeléctricas [1], usado em inúmeras aplicações, designadamente como sensor de gás [2], como catalisador [3], em aplicações fotocatalíticas [4], como protetor contra radiação UV [5], entre outras. Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA), o ZnO é um composto considerado GRAS, isto é “*Generally Recognised As Safe*” [6]. No entanto, quando sujeito a determinados estímulos (radiações com comprimentos de onda específicos), as partículas de ZnO podem sofrer, na superfície, reações químicas originadoras de radicais livres, como por exemplo espécies reativas de oxigénio, também conhecidas por ROS (da terminologia inglesa *Reactive Oxygen Species*), que podem induzir stress oxidativo a nível celular e, conseqüentemente, serem citotóxicas [7]–[10]. O ZnO tem sido, também, usado como aditivo em produtos de cosmética, nomeadamente os protetores solares [11].

No entanto, os efeitos biológicos do ZnO, especialmente na forma nanoestruturada, ainda não estão convenientemente estudados. Na literatura existe ainda alguma controvérsia quanto ao efeito das nanopartículas de óxido de zinco (npZnO) no organismo humano e no ambiente [12], [13]. Tal como outros materiais nanoestruturados, o óxido de zinco possui um efeito potencialmente perigoso para a saúde humana, devido à sua capacidade de gerar ROS. Esta mesma capacidade torna o ZnO um material atrativo para uma potencial utilização como agente antibacteriano e como auxiliar no tratamento de doenças oncológicas [9], [14], [15]. Além disso, esse potencial risco apresentado pelo ZnO torna a fixação e estabilização das nanopartículas numa matriz polimérica uma possível e atrativa via de controlar os efeitos maliciosos do óxido de zinco. Este papel pode ser desempenhado pelo poliuretano (PU), uma vez que este polímero já tem sido usado em compósitos com partículas de óxido de zinco em estratégias osteocondutivas e reconstrução de canais nervosos [16], [17].

O termo poliuretano abarca um conjunto de polímeros de grande relevância no contexto da indústria biomédica, não só devido às suas propriedades físicas e químicas, mas também devido à sua biocompatibilidade e à possibilidade de ser um polímero biodegradável [18], [19]. Estas características, aliadas com fáceis métodos de processamento, permitem o uso regular na indústria biomédica, como por exemplo em dispositivos ventriculares, diafragmas, válvulas cardíacas, enxertos vasculares bioativos, cateteres, entre outros [18]–[22]. Além disso alguns poliuretanos, como por exemplo o *PU*

Tecoflex SG80A, são aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) e apresentam-se como uma potencial solução para controlar quer as propriedades das npZnO, como por exemplo a produção de ROS, quer o nível de exposição das próprias nanopartículas, possibilitando, assim, o uso deste tipo de partículas na indústria biomédica.

A associação de nanopartículas de óxido de zinco (npZnO) com poliuretano (PU) sob a forma de compósitos (PU/npZnO) já foi abordada em trabalhos anteriormente desenvolvidos na Universidade de Aveiro, nos quais se estabeleceram as condições e procedimentos apropriados para a síntese de nanopartículas de óxido de zinco (npZnO) e para a preparação de compósitos PU/npZnO com características promissoras para aplicações biomédicas [23]–[26]. No entanto as propriedades dos acima referidos compósitos, designadamente no que se refere ao comportamento antibacteriano dos mesmos, ainda não foram completamente exploradas, pelo que o seu estudo é um tema que se apresenta com particular interesse [17], [27].

1.1. Objectivos

A presente dissertação tem como objectivo geral o estudo do comportamento antibacteriano dos compósitos de PU/npZnO. Neste contexto pretende-se especificamente:

- i. Sintetizar nanopartículas de óxido de zinco (npZnO) com diferentes características morfológicas por precipitação química à temperatura ambiente.
- ii. Produzir compósitos PU/npZnO usando as npZnO anteriormente precipitadas.
- iii. Avaliar o desempenho antibacteriano das nanopartículas e compósitos, procurando compreender o impacto da morfologia das npZnO na sua resposta bacteriana. Para este objectivo seleccionar-se-á a estirpe de bactérias Gram-negativas *Escherichia Coli* (E.Coli) ATCC 25922, uma vez que é uma estirpe de bactérias de características e comportamento bem conhecidos permitindo, assim, melhor análise das reacções, por parte das bactérias, à presença das npZnO e dos compósitos PU/npZnO [28].

1.2. Estrutura da tese

Esta dissertação será dividida em cinco capítulos:

- Capítulo I, intitulado “Introdução”, onde-se apresentará a motivação que esteve na origem da realização desta dissertação, bem como os objetivos e a estrutura da mesma.
- Capítulo II, intitulado “Revisão da Literatura”, onde se efectuará a revisão de assuntos cujo conhecimento e compreensão é considerado fulcral para o enquadramento da análise e discussão dos resultados obtidos neste trabalho. Esses assuntos compreendem uma breve abordagem a cada um dos materiais utilizados neste trabalho, nomeadamente o óxido de zinco, o poliuretano e os compósitos PU/npZnO e também às propriedades antibacterianas, dando maior ênfase ao comportamento antibacteriano do óxido de zinco e dos compósitos PU/npZnO, e aos mecanismos que lhe estão subjacentes, nomeadamente a produção de ROS.
- Capítulo III, intitulado “Procedimento Experimental”, que visa relatar e explicar, detalhadamente, todo o procedimento experimental envolvido na síntese das npZnO por precipitação, bem como na preparação dos compósitos PU/npZnO. Serão também apresentadas neste capítulo todas as técnicas usadas para caracterizar os materiais em estudo neste trabalho (npZnO comerciais e precipitadas, PU, e compósitos PU/npZnO), bem como uma breve referência aos seus fundamentos. Neste capítulo descrever-se-á ainda, de forma detalhada, o procedimento associado aos testes antibacterianos.
- Capítulo IV, intitulado “Resultados e Discussão”, que visa apresentar e discutir todos os resultados obtidos durante o estudo, nomeadamente os resultados das caracterizações dos materiais utilizados e, com especial enfoque, os resultados do estudo das propriedades antibacterianas, que é o ponto de interesse máximo desta dissertação.
- Capítulo V, intitulado “Conclusão e Trabalhos Futuros”, onde se apresentarão as principais conclusões do estudo conduzido nesta tese e se deixarão algumas indicações e/ou directrizes para possíveis trabalhos futuros, dentro do mesmo tema.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2. Revisão da Literatura

2.1. Poliuretano

Os poliuretanos (PU's) formam uma grande família de materiais poliméricos com uma enorme diversidade de composições químicas e propriedades, que podem ser utilizados na indústria biomédica devido à sua biocompatibilidade e fácil processamento [22], [29]–[31]. Estes polímeros são caracterizados pela presença, na sua cadeia, de uma, ou mais ligações uretano. A ligação uretano é formada a partir da reação entre os dois componentes básicos do poliuretano, um polioliol e um isocianato. A descoberta desta ligação remonta ao ano de 1849, quando Wurtz e Hoffman estudaram a reação entre um isocianato e um composto com grupos funcionais álcool.

O trabalho pioneiro no campo dos poliuretanos foi reportado pelo Dr. Otto Bayer, em 1937 [22], [32], que descreveu a poliadição de isocianatos e poliois (figura 1). O grupo dos poliuretanos inclui então todos os polímeros que contenham a ligação uretano, ureia ou grupos derivados de isocianato, mesmo que constituam a menor parte da estrutura total.



Figura 1 - Reação entre um isocianato e um grupo hidroxilo, formando a ligação uretano.

Esta família de polímeros pode apresentar uma grande variedade de propriedades, que resultam das muitas variações moleculares que se podem obter através do uso da ligação uretano, e da variedade de combinações que se podem fazer com diferentes isocianatos e diferentes poliois [22], [32].

Seguidamente serão focadas as reacções químicas básicas, e os componentes que originam o poliuretano.

2.1.1. Química dos poliuretanos

O poliuretano é formado fundamentalmente a partir de dois compostos precursores, o polioli e o diisocianato. Por vezes é também usado um terceiro composto (um diol ou uma amina) como extensor de cadeia.

A reação principal na síntese do poliuretano é a formação da ligação uretano, que resulta da reação entre o isocianato e o grupo hidroxilo (figura 2).

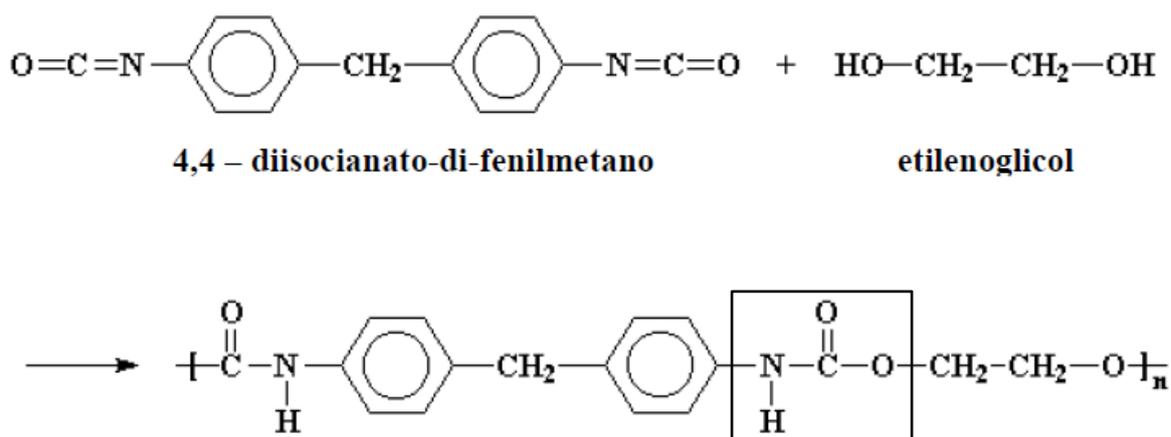


Figura 2 – Ilustração da reação de síntese de um poliuretano, com realce da ligação uretano.

Uma outra reação que pode ter lugar, embora nem sempre presente, é a reação de extensão de cadeia que ocorre entre o extensor de cadeia e o isocianato [22].

Para além das duas reações previamente referidas, pode também mencionar-se a reação do isocianato com a água. Esta reação é uma importante reação secundária e deve ser evitada ou minimizada, a menos que se pretenda uma espuma de poliuretano ou um poliuretano com elevado conteúdo em ureia (figura 3) [22].

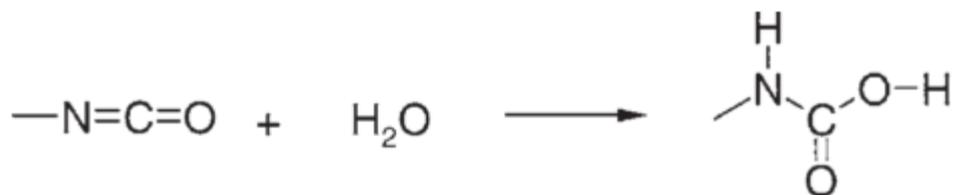


Figura 3 – Ilustração da reação do isocianato com a água.

As propriedades do poliuretano estão largamente dependentes da natureza física e química destes precursores [22]. Estes serão sucintamente abordados nas secções que se seguem.

2.1.2. Poliol

Os poliois convencionais são, por norma, um poliéter (estrutura de repetição é do tipo -R-O-R'-), ou um poliéster (estrutura de repetição é do tipo -R-COO-R'-), cuja cadeia termina em grupos hidroxilo [22].

À temperatura ambiente, os poliois podem ser líquidos ou sólidos, dependendo do seu peso molecular. Devido à sua estrutura alifática e baixa interacção intermolecular, as moléculas de poliol são flexíveis e, conseqüentemente, a porção do poliuretano correspondente ao poliol é referenciada como a porção flexível do poliuretano [22].

Na figura 4 ilustra-se a estrutura química de diferentes tipos de poliois.

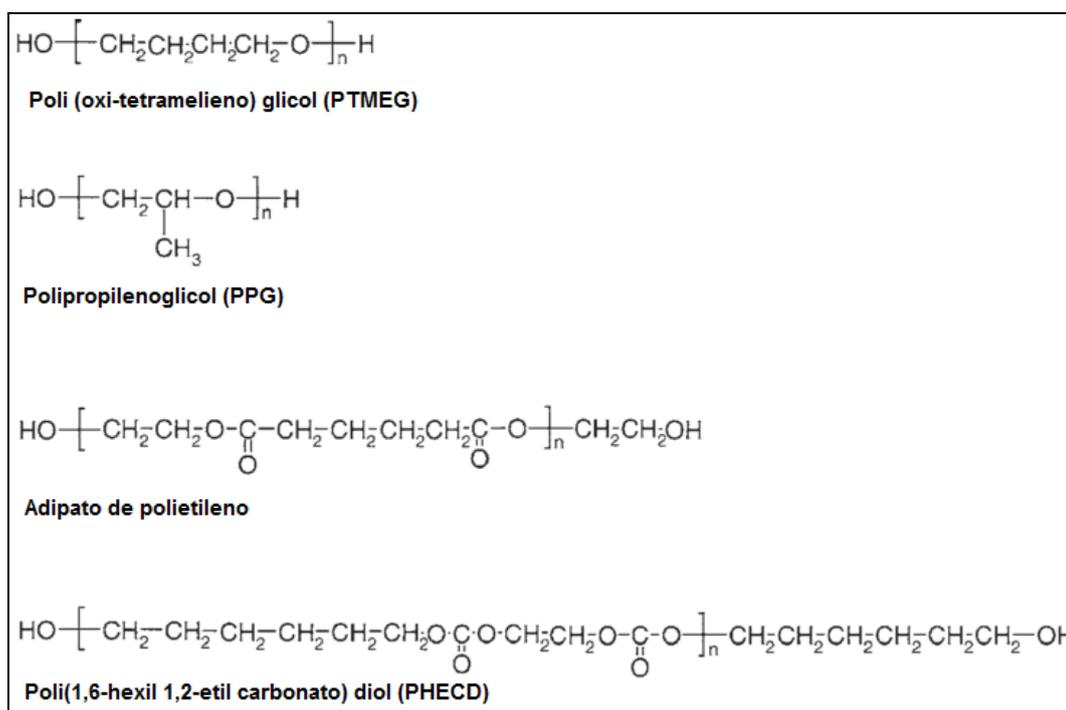


Figura 4 - Macroglícolis utilizados na síntese de poliuretano.

2.1.3. Isocianato

O isocianato mais importante usado na síntese do poliuretano é o diisocianato, que contém dois grupos isocianato por molécula. Estes dois grupos funcionais têm a função de unir, através de uma reação química, duas outras moléculas (dois poliois, ou um polioli e um extensor de cadeia) para formar uma cadeia linear. Quando a funcionalidade do isocianato é superior a dois, pode estabelecer-se uma ligação entre moléculas, levando à formação de uma rede reticulada [22].

O diisocianato pode ser aromático, como por exemplo o diisocianato 4,4'-difenilmetano (MDI), ou alifático, como por exemplo o diisocianato 4,4'-difenilmetano hidrogeneizado (HMDI). Outro isocianato importante é o diisocianato toluenometil (TDI), que também é de natureza aromática. A estrutura química destes diisocianatos é representada na figura 5 [22].

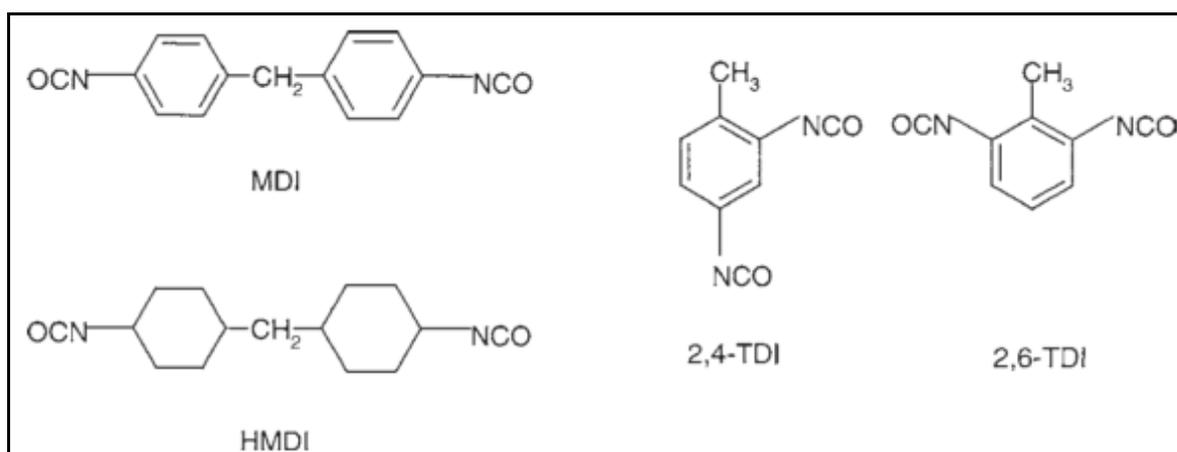


Figura 5 - Diisocianatos utilizados na síntese de poliuretanos.

Devido à estrutura em forma de anel dos diisocianatos e às interações intermoleculares fortes, tais como ligações de hidrogénio, as porções da cadeia do poliuretano que contém o isocianato são mais rígidas do que as que contém o polioli e são, por isso, referenciadas como a porção rígida da cadeia de poliuretano[22].

2.1.4. Extensor de Cadeia

A reação direta entre o polioli e o diisocianato produz um composto muito flexível e com fraca resistência mecânica. Esta propriedade pode ser substancialmente melhorada através da adição de um extensor de cadeia [22]. Neste caso o poliuretano pode ser representado, de uma forma geral, pela seguinte fórmula:



onde, P representa o polioli, D representa o diisocianato e C representa o extensor de cadeia. O extensor de cadeia é normalmente uma molécula com grupos hidroxilo ou amina [22].

A função do extensor de cadeia é produzir no polímero uma sequência alternada de diisocianatos e extensores de cadeia. Estas sequências, ou segmentos rígidos, atuam como locais de reticulação para aumentar a resistência mecânica [22].

Se for usado um diol como extensor de cadeia obtém-se um poliuretano, e se for usada uma diamina obtém-se um poliuretano-ureia [22].

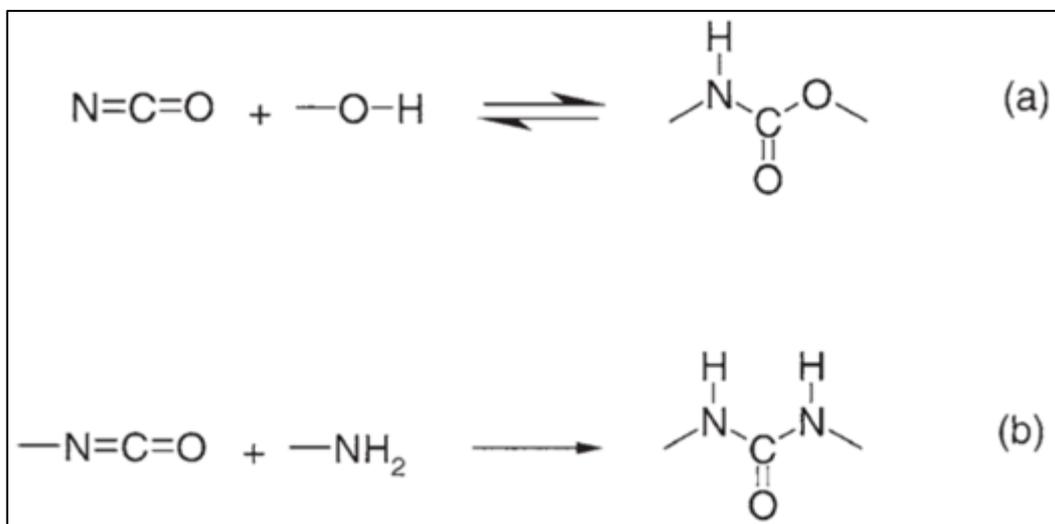


Figura 6 - Ilustração da reação de extensão de cadeia entre o extensor de cadeia, diol(a) ou amina (b), e o isocianato.

Os extensores de cadeia mais frequentemente usados estão ilustrados na figura 7.



Figura 7 - Extensores de cadeia frequentemente usados na síntese de poliuretanos.

2.1.5. Aplicações do Poliuretano

Desde que foi sintetizado pela primeira vez em 1937, o poliuretano tem sido usado nas mais diversas aplicações, designadamente no fabrico de elastómeros, espumas, tintas e adesivos [22], [32].

Para além de todas estas aplicações, os poliuretanos possuem, também, um papel importante como biomateriais, graças à sua biocompatibilidade e às suas propriedades mecânicas, especialmente a flexibilidade a baixa temperatura, a resistência à abrasão, a rigidez controlável e a resistência à fadiga, e ainda graças ao seu fácil processamento [22], [27]. Estas mesmas propriedades permitiram a aplicação dos poliuretanos na indústria biomédica, a partir da década de 60. Actualmente estes materiais são empregues na produção de válvulas cardíacas, sacos para armazenamento de sangue, membranas de diálise, próteses, adesivos ósseos, fios de sutura e sistemas de libertação controlada de fármacos [22], [30], [31], [33].

A resposta biológica e a bioestabilidade destes materiais é condicionada pelas propriedades de superfície, que por sua vez são influenciadas pelos processos de síntese e reações químicas neles envolvidos, uma vez que destas dependem a composição e distribuição das cadeias deste material [22].

Devido às propriedades atrás referidas, o poliuretano é considerado uma substância GRAS (da terminologia inglesa "*Generally Recognised As Safe*"), e aceite pela *Food and Drug Administration* (FDA) [34].

No entanto, vários autores apresentam-se reticentes quanto à segurança dos dispositivos biomédicos à base de poliuretano. Esta preocupação surge devido à possível degradação do polímero.

2.1.6. Importância da Degradação do Poliuretano

O tema de degradação de polímero é de grande importância em engenharia biomédica. Existem muitas situações em que polímeros inertes são utilizados no fabrico de próteses e implantados no corpo com o propósito de aí permanecerem durante um período de tempo considerável. Acontece que, em ambiente fisiológico, os polímeros sofrem degradação, podendo, desta forma, comprometer a biocompatibilidade e funcionalidade do implante. Neste contexto, a compreensão do mecanismo de degradação do polímero torna-se fulcral na estratégia de modificação da sua estrutura, com o intuito de torná-lo o mais compatível possível com o meio onde será implantado.

2.1.7. Mecanismos de Degradação

A degradação dos polímeros *in vivo* é extremamente complexa, especialmente devido ao envolvimento de agentes de degradação, como por exemplo as enzimas. Os dispositivos biomédicos fabricados à base de poliuretano podem estar sujeitos a diferentes mecanismos de degradação, como por exemplo o caso de enzimas hidrolíticas, que são capazes de alterar a estrutura do polímero, limitando o tempo de vida do próprio dispositivo [34].

Os principais mecanismos de degradação a assinalar são a hidrólise e a oxidação [35].

Hidrólise

Nos PU's existem dois mecanismos de hidrólise possíveis. O mais provável envolve a quebra da ligação éster produzindo duas cadeias mais pequenas. A outra possibilidade é a quebra da ligação uretano. Este último caso é favorecido se um poli(éster-uretano) contiver ligações carboxílicas estereamente impedidas. Os materiais com menor peso molecular sofrem cisão de cadeia mais rápida levando a uma formação mais rápida de fragmentos solúveis. A susceptibilidade à hidrólise resulta, principalmente, da presença de ligações éster na cadeia. A água reage com esta ligação, dividindo-a em duas partes menores. Uma delas termina num grupo hidroxilo, ao passo que a outra termina num

grupo carboxilo. O carácter ácido desta última acelera a hidrólise dos restantes segmentos do PU.

Nos poli(éter-uretano), que são geralmente mais estáveis, a cisão ocorre ao nível da ligação uretano, produzindo duas cadeias menores, uma terminada num grupo hidroxilo e outra num grupo amina. Este tipo de degradação é característica de uma degradação a longo prazo [36].

Oxidação

A degradação *in vivo* por oxidação resulta do ataque oxidativo dos segmentos poliéter do poliuretano. Este mecanismo de degradação pode ser acelerado pela ação de enzimas e peróxidos, bem como pela actividade catalítica de iões metálicos ou formação de grupos carboxílicos. Pode ainda ser promovida pela calcificação, que é a deposição de sais de cálcio (normalmente hidroxiapatite) no implante onde o PU é utilizado. Outro factor que afeta a razão de calcificação é a capacidade de o material absorver água. Os poli (éter-uretanos), sendo hidrofílicos, são mais suscetíveis à calcificação que os poli (éster-uretanos), que são hidrofóbicos. O aumento de segmentos rígidos nos poliuretanos reduz a capacidade de mineralização [36].

2.2. Óxido de Zinco

O óxido de zinco (ZnO) é um óxido metálico semicondutor e piezoelétrico que se apresenta sob a forma de um pó branco, praticamente insolúvel em água. Pode ser encontrado na natureza, mais concretamente na crosta terrestre, sob a forma de um mineral denominado Zincite [11], [37]–[39].

O óxido de zinco pode apresentar-se com uma das seguintes estruturas cristalinas: a Wurtzite, a Blenda e a Halite (figura 8) [11], [37]–[39].

A Wurtzite corresponde à forma cristalina termodinamicamente mais estável, sob condições de pressão e temperatura normais. Apresenta uma célula unitária hexagonal, com os parâmetros de rede $a=3.25\text{Å}$ e $c=5.12\text{Å}$, pertencente ao grupo espacial de simetria $P6_3mc$ e classe cristalográfica $6mm$ [1], [40]. A Blenda, com estrutura cúbica, ocorre devido a uma estabilização por crescimento em substratos, como por exemplo substratos de sulfeto de zinco (ZnS). Apresenta uma célula unitária cúbica de faces centradas, com os parâmetros de rede $a=4.62\text{Å}$, pertencente ao grupo espacial de

simetria $F\bar{4}3m$ [40]. A Halite ocorre somente na presença de altas pressões (aproximadamente 10GPa). Esta forma cristalina apresenta uma célula unitária cúbica, pertencente ao grupo espacial de simetria $Fm\bar{3}m$, cujos parâmetros de rede são $a=4.27\text{\AA}$, [40].

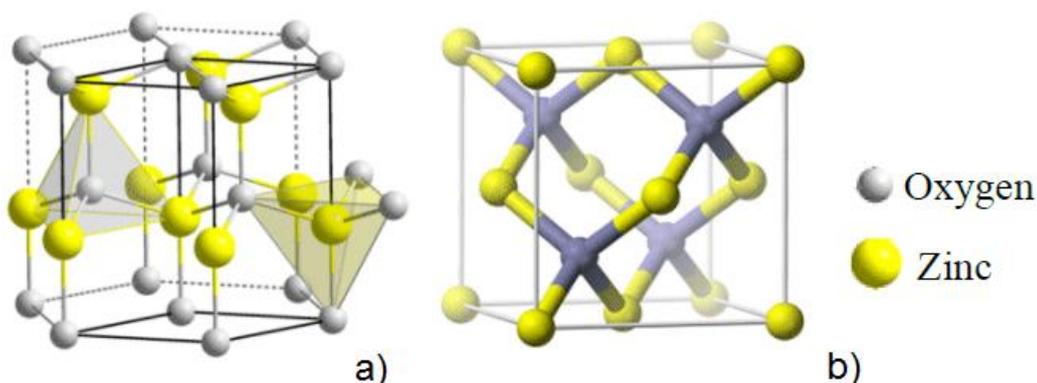


Figura 8 - Estrutura cristalina hexagonal da Wurtzite (a) e estrutura cristalina cúbica da Blenda (b) [41].

São as suas propriedades físicas (tabela 1) e químicas, como por exemplo, a estabilidade térmica (elevado ponto de fusão), a baixa constante dielétrica, a atividade catalítica, as propriedades antibacterianas e antifúngicas, que permitem a utilização do óxido de zinco em várias aplicações, tais como aplicações elétricas (sensor de gás, semicondutor, varistor) [40], aplicações fotocatalíticas (degradação de poluentes) [39], [42], [43], dispositivo piezoelétrico (dispositivos acustoelétricos) [44], [45] e tecidos com características antibacterianas [46].

Tabela 1 - Propriedades do Óxido de Zinco [1].

Propriedades	Valor
Densidade	5.6 g/cm ³
Energia de Banda Proibida	3.37 eV
Energia de Ligação	60 meV
Ponto de Fusão	1975 °C
Índice de Refração	2.0041
Constante Dielétrica	8.656

O óxido de zinco pode apresentar-se na forma de partículas nanométricas, também conhecidas como nanopartículas, o que pode ocasionar a melhoria de algumas das suas propriedades físicas e químicas.

Segundo alguns autores, a designação de nanopartículas aplica-se a partículas com tamanhos compreendidos entre 1 e 100 nanómetros (nm) [47]. As nanopartículas podem ser classificadas em naturais, quando provenientes de minerais, pós vulcânicos ou lunares, ou em antropogénicas, quando resultam da combustão de combustíveis fósseis ou ainda se sintetizadas e desenhadas para propósitos específicos. Este tipo de partículas podem ser também morfologicamente classificadas como nanopartículas, nanofolhas ou nanotubos (figura 9) [48].

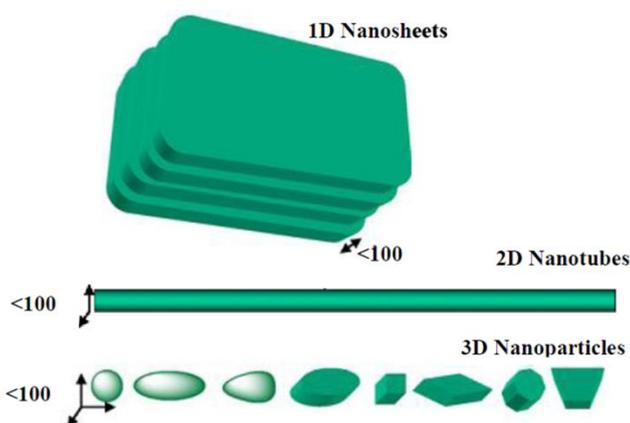


Figura 9 - Forma de alguns nanomateriais. Adaptado de [48].

Nanopartículas são partículas que apresentam as três dimensões abaixo dos 100 nanómetros. Nanotubos são partículas que apresentam elevada razão entre o comprimento e o diâmetro, estando duas das suas dimensões situadas abaixo dos 100 nanómetros. As nanofolhas são partículas que possuem uma dimensão abaixo dos 100 nanómetros [48].

O limite de 100 nanómetros imposto para classificar uma partícula como nanométrica tem suscitado alguma controvérsia. A justificação deste limite baseia-se no facto de que abaixo desse limiar as partículas apresentam, normalmente, propriedades físicas e químicas diferentes das do material volúmico [12], [49].

Com a diminuição do tamanho de partícula há um aumento da área superficial específica, o que proporciona maiores áreas de contacto, maior número de átomos superficiais por unidade de massa e, conseqüentemente, maior reatividade. Este aumento da reatividade ocorre devido ao facto de os átomos presentes à superfície não terem todas as ligações químicas compensadas [47].

Pode-se referir ainda que este tipo de partículas tem merecido um crescente interesse na área da saúde, principalmente no que se refere aos sistemas de libertação

controlada de fármacos. Este interesse baseia-se no facto de que as suas boas propriedades adsorptivas e a elevada área superficial específica permitem a fixação de elevada quantidade de compostos biologicamente relevantes e drogas e o seu transporte para locais específicos, melhorando, assim, a eficácia destes sistemas [10], [12].

A escolha do método de síntese é crucial no fabrico de materiais à escala nanométrica, visto que cada tipo de materiais exige um método de síntese específico para se atingirem as características desejadas, sendo assim necessário compreender os mecanismos de nucleação e crescimento destes materiais [37].

No caso do óxido de zinco, podem produzir-se nanopartículas por vários métodos tais como o sol-gel [50], a deposição por evaporação térmica de microondas [51], a deposição química em fase de vapor [52], a oxidação térmica [53], a síntese hidrotermal [54], a precipitação química [55], a sublimação e a pulverização [38], [56].

De entre os métodos referidos, a precipitação química é o método que apresenta maiores vantagens, uma vez que apresenta um custo económico reduzido, já que a precipitação pode ocorrer a baixas temperaturas ou mesmo à temperatura ambiente e não exige reagentes dispendiosos nem equipamentos sofisticados e caros [24], [25], [55].

Através dos métodos acima referidos podem ser sintetizadas uma grande variedade de morfologias de partícula, como por exemplo nanobastonetes [57], nanoaneis [58], nanopregos [59], nanoagulhas [60], nanocasulos [61], pontos quânticos [40], nanocubos [62], nanoesferas [63], nanotubos [64], nanofios [39], nanofitas e nanofolhas [25], entre outros. Algumas destas morfologias podem ser observadas na figura 10.

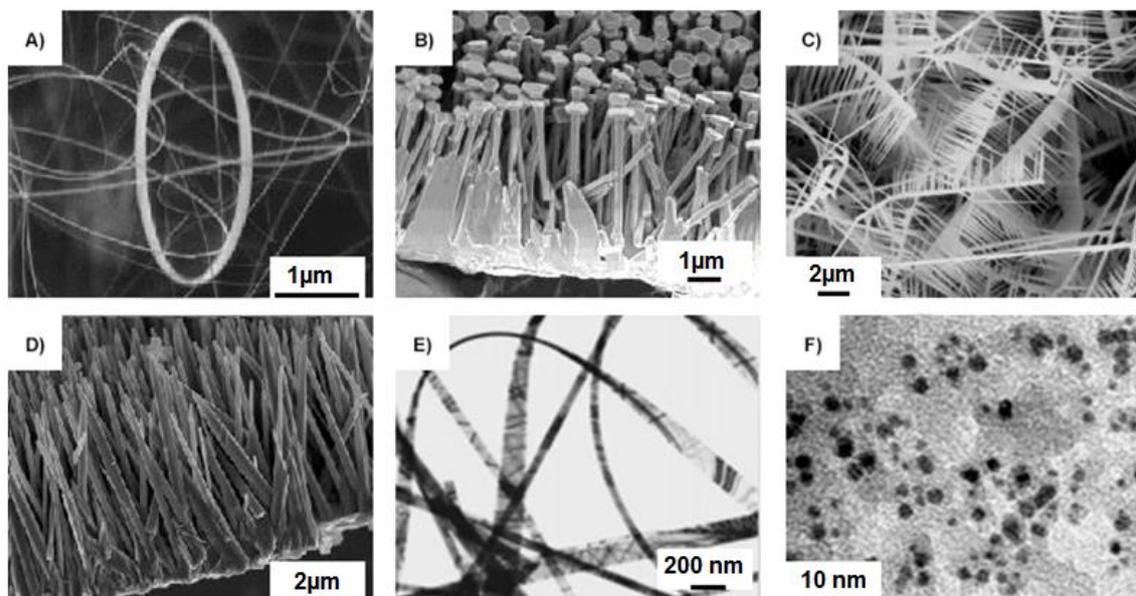


Figura 10 - Exemplos de diferentes morfologias de nanoestruturas de óxido de zinco. A) Nanoaneis ([58]), B) Nanopregos ([59]), C) Nanocasulos ([61]), D) Nanoagulhas ([60]), E) Nanofitas ([25]) e F) Pontos Quânticos ([40]).

Na forma de nanopartículas, o ZnO tem inúmeras aplicações, algumas das quais já foram mencionadas. Entre elas podemos salienta a sua aplicação em tintas, corantes, cosméticos, plásticos, borracha, produtos eletrônicos, produtos farmacêuticos, agentes esterilizantes, aditivos e sistemas de libertação de fármacos [39].

Na área biomédica e de cosméticos, as nanopartículas de ZnO têm sido usadas no auxílio ao tratamento de tumores, em protetores solares graças a propriedade de o ZnO bloquear a radiação UV, e como agentes antimicrobianos, uma vez que o ZnO potencia a produção de espécies reativas de oxigénio, também conhecidas por ROS (que provém da terminologia inglesa *Reactive Oxygen Species*).

2.2.1. Propriedades antibacterianas do óxido de zinco

O óxido de zinco, quando se apresenta na forma de pós nanométricos, é um agente antibacteriano inorgânico [65]. As partículas deste óxido são sintetizadas com tamanhos nanométricos, uma vez que a ação antibacteriana depende da área superficial específica, bem como da concentração das partículas. Quanto menor o tamanho de partícula, mais forte será o seu efeito antibacteriano [66].

O óxido de zinco apresenta comportamento antibacteriano, quer relativamente a bactérias Gram positivas, quer a bactérias Gram negativas. Este comportamento resulta

da ligação das partículas deste material com as membranas celulares das bactérias, lesando-a, e é a produção de espécies reativas de oxigênio que tem um papel de suma importância na desorganização desta membrana [67].

O termo espécies reativas de oxigênio (ROS) é usado para descrever um número de moléculas e radicais livres derivados do oxigênio molecular. As ROS podem resultar por exemplo de processos biológicos que ocorrem na mitocôndria, de enzimas oxidoreduases ou da oxidação catalisada por metais, e têm potencial para causar um vasto número de eventos prejudiciais à célula.

No caso do óxido de zinco, estas espécies são o anião hidróxido (OH^-), o anião superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) [68] que podem formar-se por fotocatalise, na superfície de uma partícula (figura 11). Sob ação de radiação UV ou visível, cuja energia seja superior a 3.3 eV, há movimentação de elétrons da banda de valência do ZnO para a sua banda de condução. Formam-se assim “buracos” (h^+) na banda de valência e elétrons livres (e^-) na banda de condução (a) [69]–[71]. Os buracos h^+ reagem com a água presente no meio produzindo H^+ e $\cdot\text{OH}$ (b), os elétrons e^- reagem com o oxigênio, também presente no meio, originando o anião superóxido $\cdot\text{O}_2^-$ (c), que por sua vez reage com H^+ para originar o radical hidroperoxil $\cdot\text{HO}_2$ (d). Seguidamente, este radical reage com outro elétron livre produzindo o anião peróxido de hidrogênio HO_2^- (e), que irá reagir com o ião H^+ levando à formação da molécula de peróxido de hidrogênio H_2O_2 (f) [68], [72].

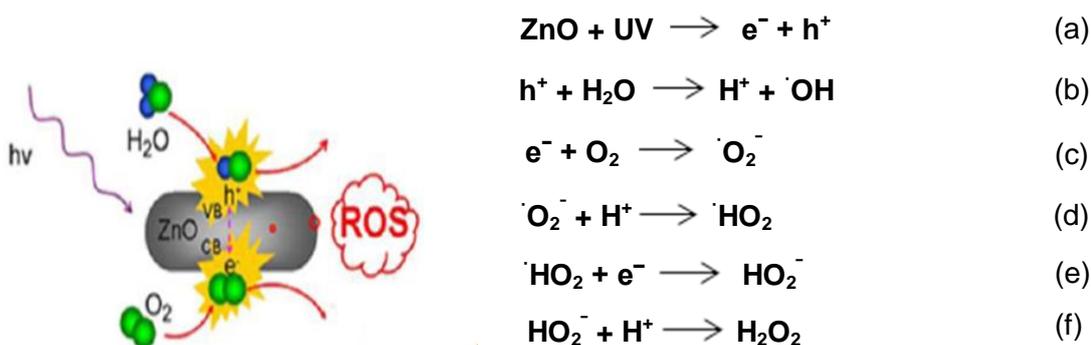


Figura 11 - Ilustração do mecanismo de produção de ROS pelo óxido de zinco [73], [74].

A toxicidade das espécies reativas de oxigênio é atribuída à sua elevada reatividade e capacidade de oxidação, que se traduz na destruição de componentes celulares como lípidos, DNA e proteínas [75]. Vários autores consideram as ROS como a maior causa da toxicidade dos nanomateriais e vários estudos apontam a geração

fotocatalítica dos ROS como sendo o maior contribuinte para a actividade antibacteriana dos óxidos metálicos, como é o caso do óxido de zinco [76]–[79].

É reportado na literatura que a ação das ROS, pode levar a perda de integridade da membrana celular, que resulta em disfuncionalidades na barreira de permeabilidade, o que terá como consequência a morte da célula [80]. A ação das espécies reativas de oxigénio inicia-se com a libertação de ROS da superfície das partículas, que reagem com a membrana celular, originando a rutura desta através de peroxidação lipídica, deixando exposto o conteúdo celular. As ROS podem então penetrar na célula e reagir com os ácidos nucleicos e as proteínas (por exemplo, desativação enzimática) [10] (figura 12). A peroxidação lipídica é um dos indicadores da formação de radicais livres mais usados, ou seja um indicador chave da ocorrência de stress oxidativo. Ácidos gordos insaturados, tais como os presentes na membrana celular, são um alvo comum dos radicais livres. As reações ocorrem, tipicamente, como reações em cadeia, onde um radical livre captura um hidrogénio de um ácido gordo insaturado para formar uma molécula de água. Isto deixa um electrão desemparelhado no ácido gordo que é então capaz de capturar oxigénio, formando um radical peróxido (figura 13). Os peróxidos lipídicos são instáveis e decompõem-se para formar séries complexas de compostos, que incluem compostos carbonilos reativos [73].

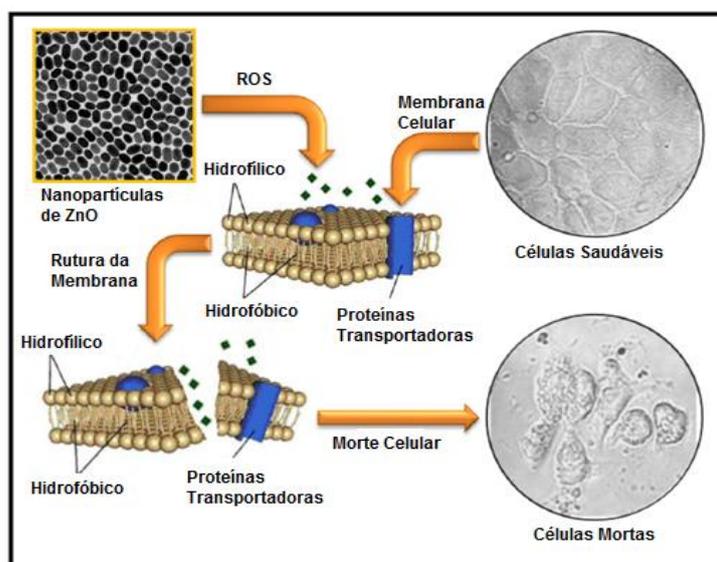


Figura 12 – Ilustração do mecanismo de citotoxicidade do ZnO [9].

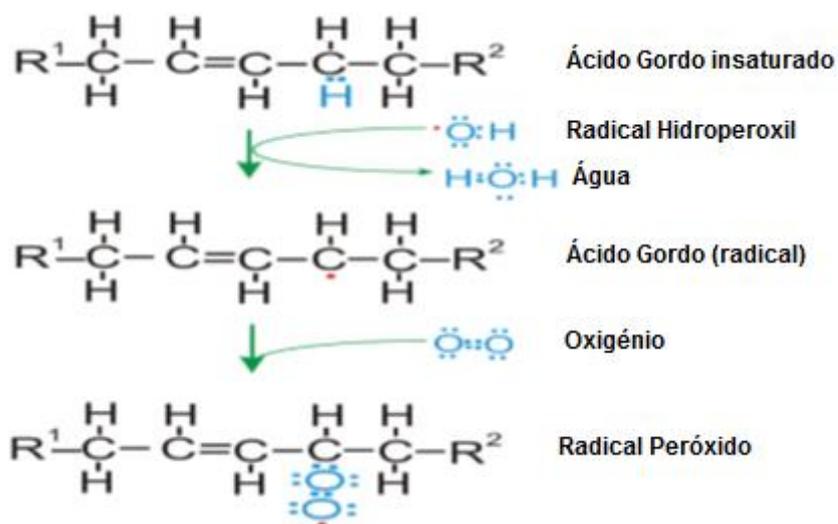


Figura 13 - Ilustração da peroxidação lipídica [73].

É com base nesta reação de peroxidação lipídica que os ROS atacam a membrana celular, causando a sua destruição (figura 14).

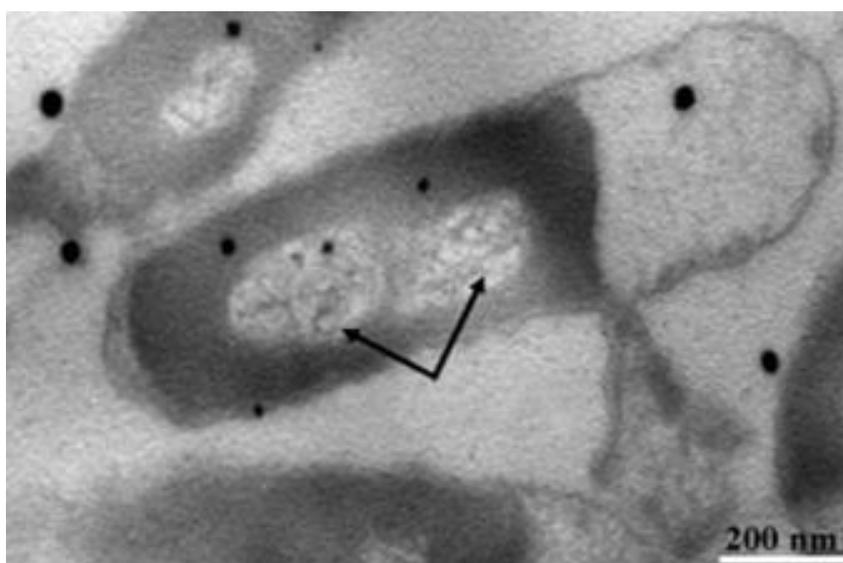
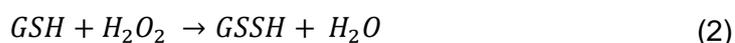


Figura 14 – Micrografia de microscopia eletrônica de transmissão de *Escherichia Coli*, após tratamento com nanopartículas de ZnO (pontos negros), evidenciando uma rutura da membrana celular e exposição e liberação do conteúdo intracelular [67].

As espécies reativas de oxigênio podem ser quantificadas através da quantidade de glutaciona na sua forma oxidada (GSSH). A glutaciona é um composto, não enzimático, antioxidante hidrossolúvel, e é reconhecido como o tiól não proteico mais importante nos sistemas vivos. Trata-se de um tripéptido linear, constituído por três aminoácidos: ácido

glutâmico, cisteína e glicina. Existe na maioria das células em concentrações compreendidas entre o 1 e 8 mM e pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSH). A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSH é normalmente utilizada para estimar o estado oxidativo dos sistemas biológicos. Os níveis de GSH e GSSH podem ser determinados pelos métodos cromatografia líquida de alta performance [81], eletroforese capilar [82] ou bioquimicamente [83]. A glutatona, a nível celular, tem um papel crucial na metabolização da água oxigenada (H_2O_2) e de outros peróxidos de hidrogénio, como cofactor da glutatona-peroxidase. As peroxidases são um grupo de enzimas oxidoreduções que oxidam substratos orgânicos, como a glutatona, segundo a seguinte reação (8):



2.2.2. Citotoxicidade do óxido de zinco

Além das propriedades antibacterianas, o óxido de zinco exibe propriedades interessantes como a citotoxicidade selectiva, relativamente a células tumorais. Com base nesta citotoxicidade, o óxido de zinco tem vindo a ser considerado com interesse para potencial tratamento para doenças como as neoplasias e as patologias auto-imunes [56], [84]. A citotoxicidade apresentada pelo ZnO depende, fortemente, da dose usada, sendo aparente a existência de um limiar entre os 10µg/ml e os 20µg/ml, a partir do qual os efeitos citotóxicos do óxido de zinco são notoriamente evidentes [84].

Kee Woiei Ng *et al.* [84] estudaram a função do supressor tumoral p53 envolvendo nanopartículas de ZnO, bem como a influência destas partículas na destruição do DNA. O supressor tumoral p53 é uma proteína citoplasmática que está envolvida em dois processos: a apoptose, que é a morte celular programada de células danificadas ou cuja função está defeituosa, e é responsável pela codificação de uma proteína nuclear fosforilada com propriedades de ligação ao DNA. Qualquer alteração ou mutação na proteína p53 poderá levar a alterações na apoptose e conseqüente replicação de células cujo DNA se encontra anormalmente alterado. Nos estudos destes autores, verificou-se que as nanopartículas de ZnO podem induzir danos no DNA de células cancerosas, levando a uma ativação da proteína p53. A ativação desta proteína, originada pela deteção de danos no DNA da célula, vai desencadear o mecanismo de apoptose resultando na morte da célula danificada (figura 15). Desta forma, e uma vez que a ação

das nanopartículas de óxido de zinco acaba por desencadear o mecanismo de apoptose, é possível o uso deste tipo de partículas como tratamento localizado para lesões tumorais.

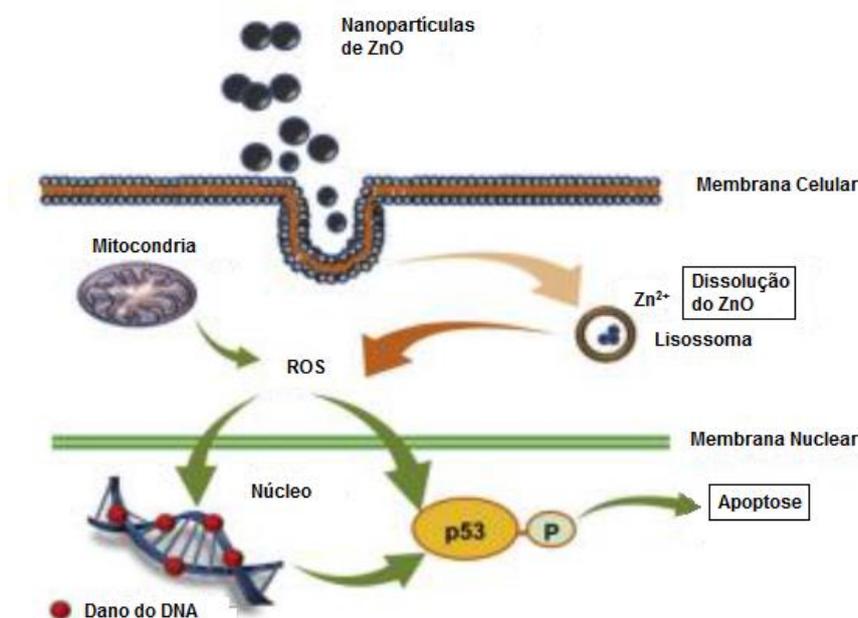


Figura 15 - Ilustração do mecanismo proposto da resposta do supressor tumoral p53 à ação das nanopartículas de ZnO. Adaptado de [84].

Cory Hanley *et al.* [85] reportaram um estudo comparativo do efeito de nanopartículas de ZnO em culturas celulares de células cancerosas e de células saudáveis. Observaram que a viabilidade das células tumorais, quando expostas às nanopartículas de óxido de zinco, foi significativamente menor do que a das células saudáveis. Em ambas as culturas celulares, a citotoxicidade produzida pelas nanopartículas de ZnO mostrou-se dependente da concentração de ZnO, observando-se um aumento da citotoxicidade com o aumento da concentração de nanopartículas, embora com uma evidente seletividade de efeitos citotóxicos na cultura celular de células cancerosas. Outros testes realizados por estes autores evidenciam ainda que é induzida apoptose devido à danificação do DNA celular por ação das espécies reativas de oxigênio, produzidas pelas nanopartículas de óxido de zinco. Resultados semelhantes são apresentados por Premanathan *et al.* [6] nos quais é evidente que as nanopartículas de óxido de zinco surtem um forte efeito citotóxico em células tumorais associadas à leucemia.

2.3. Compósitos de PU e Nanopartículas de ZnO

Os compósitos (polímero/partícula inorgânica) são constituídos por duas fases, sendo uma delas contínua, e denominada de matriz, e a outra, envolvida pela matriz, denominada de fase dispersa. As propriedades dos compósitos são fortemente influenciadas pelas propriedades, distribuição e interação dos seus constituintes [86].

A combinação dos polímeros orgânicos e nanomateriais inorgânicos abre horizontes para a engenharia de compósitos flexíveis, que apresentam propriedades mecânicas, térmicas, óticas e elétricas atrativas, quando comparados com os compósitos convencionais [54]. Este tipo de compósitos não só combina as propriedades do polímero orgânico com as do material inorgânico, mas permite também a melhoria das propriedades de ambos os constituintes, como por exemplo o aumento da resistência à tração e das capacidades de amortecimento no caso poliuretano [87].

Os compósitos, cuja fase dispersa é constituída por nanopartículas, podem ser preparados, basicamente, por quatro métodos diferentes:

- Método de Solução ou Evaporação de Solvente: Este método consiste na dissolução do polímero seguida da dispersão das nanopartículas na solução polimérica, seguido da evaporação do solvente [48].
- Mistura de fusão: O polímero é fundido e misturado com as nanopartículas [48].
- Polimerização *in-situ*: As nanopartículas são dispersas numa solução de pré-polímero e a polimerização é promovida de seguida [48].
- Síntese por moldes: As nanopartículas são precipitadas diretamente dentro dos poros da matriz polimérica, a partir de uma solução precursora. Neste método o tamanho da partícula esta fortemente dependente da distribuição e do tamanho dos poros da matriz [48].

Dos métodos acima referidos, o método de evaporação de solvente é o método mais vantajoso, uma vez que, além de ser um método simples, este apresenta um custo reduzido, já que ocorre à temperatura ambiente e não exige reagentes dispendiosos nem equipamentos sofisticados e caros [48].

O poliuretano tem sido bastante utilizado devido às suas propriedades, tal como já foi referido anteriormente. No entanto, este apresenta uma baixa estabilidade térmica (baixo ponto de fusão) e baixa resistência mecânica [22]. Grande parte destes “pontos fracos” do polímero podem ser melhorados através da modificação química da estrutura

molecular do próprio polímero e/ou pela introdução de materiais orgânicos e inorgânicos na matriz polimérica [27].

Na literatura é reportado que a introdução de nanopartículas de óxido de zinco, numa quantidade de 2%, em peso, numa matriz polimérica de poliuretano melhorou significativamente o Módulo de Young e a resistência à tração do material [27].

Além disso, a literatura também refere que é possível controlar a bioatividade, bem como a citotoxicidade, dos compósitos de poliuretano e óxido de zinco, recorrendo à manipulação das nanopartículas, bem como da sua percentagem em peso [24].

Os poucos estudos existentes na literatura, sobre compósitos de poliuretano e nanopartículas de óxido de zinco, evidenciam comportamentos potencialmente interessantes para a área de medicina regenerativa.

Alguns dos resultados presentes na literatura demonstram que alterando a percentagem, em peso, das nanopartículas (2% e 50%), também a potencialidade de aplicação na indústria biomédica, desse compósito, se alterava. Segundo esses resultados, os compósitos com 50%, em peso, de nanopartículas de óxido de zinco, apresentaram um maior potencial bioativo em meio acelular (SBF), mas apresentaram, também, uma citotoxicidade elevada em espécies celulares MC3T3. Já os compósitos com 2%, em peso, de nanopartículas de óxido de zinco, conferiram uma viabilidade celular mais elevada, mas em contrapartida possuíam uma capacidade bioativa inferior.

Assim sendo, com base nestes resultados podemos afirmar que as aplicações indicadas para cada um destes compósitos são diferentes. O compósito com uma percentagem, em peso, de nanopartículas de 2% seria mais adequado a aplicações ortopédicas, uma vez que este possui uma elevada viabilidade celular. Já o compósito com uma percentagem, em peso, de nanopartículas de 50% seria mais adequado para aplicações com o tratamento de neoplasias, onde tem maior interesse o impedimento da proliferação celular, uma vez que apresentam uma citotoxicidade elevada [24].

Nos últimos anos, outro ramo onde os materiais nanoestruturados se aplicam é na engenharia de tecidos, mais especificamente no tecido neuronal.

Reporta-se na literatura que, em estudos *in vitro*, a utilização de compósitos de poliuretano e nanopartículas de óxido de zinco melhora a atividade das células do Sistema Nervoso Central (SNC) [17]. O autor deste estudo utilizou nanopartículas de óxido de zinco por este apresentar propriedades piezoelétricas, que permitem potenciar a regeneração do tecido neuronal, uma vez que estas propriedades promovem a absorção da proteína fibronectina que produz um aumento da actividade das células neuronais. Verificam ainda que o uso de compósitos de poliuretano e nanopartículas de ZnO

proporciona uma diminuição da adesão e proliferação dos astrócitos, que são um dos principais impedimentos da regeneração celular do SNC.

Os astrócitos desempenham funções essenciais no SNC, uma vez que participam na nutrição e sustentação dos neurónios, regulam os neurotransmissores e a concentração de várias substâncias que interferem nas funções normais dos neurónios. No entanto a proliferação excessiva dos astrócitos é um dos fatores que prejudica a regeneração do SNC [17].

Por fim puderam ainda concluir que com o aumento da carga de nanopartículas de óxido de zinco, no compósito, havia uma redução da proliferação celular [17].

Capítulo 3

Procedimiento Experimental

3. Procedimento Experimental

No presente capítulo serão descritos todos os procedimentos e técnicas utilizadas na realização da parte experimental deste estudo. As primeiras secções contemplam os materiais e reagentes utilizados, bem como a descrição dos procedimentos utilizados para síntese das nanopartículas de óxido de zinco e para preparação dos compósitos de óxido de zinco e poliuretano.

Foram sintetizados dois tipos diferentes de nanopartículas de óxido de zinco com o intuito de obter diferentes áreas superficiais específicas entre elas.

Seguidamente é descrito o protocolo experimental para a realização dos testes de actividade antibacteriana.

Por último, segue uma descrição sumária de todas as técnicas de caracterização utilizadas ao longo deste trabalho.

3.1. Materiais e reagentes utilizados

Na tabela 2, encontram-se listados os materiais e reagentes que foram necessários para a produção das nanopartículas e dos compósitos, a fornecedora e grau de pureza:

Tabela 2 - Materiais e reagentes utilizados na síntese das nanopartículas e na produção de compósitos (incluindo a sua fórmula química, a empresa fornecedora e o grau de pureza).

Reagente	Fórmula Química	Fornecedor	Pureza
1,2 - Dicloroetano	$C_2H_4Cl_2$	Fluka	≥99.5%
Ácido Cítrico Monohidratado	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Sigma-Aldrich	99.5-102%
Cloreto de Zinco	$ZnCl_2$	Merk	≥98%
Clorofórmio	$CHCl_3$	Carlo Hebra	≥99%
Etanol Absoluto	C_2H_5OH	Carlo Hebra	≥99.9%
Hidróxido de Sódio	$NaOH$	Sigma-Aldrich	≥98%
Nanopartículas de Óxido de Zinco Comerciais	ZnO	Aldrich	---
Poliuretano <i>Tecoflex SG80A</i>	PU	Fluka	---

3.2. Síntese das Nanopartículas de Óxido de Zinco

As partículas nanoestruturadas de óxido de zinco foram sintetizadas com base num método de precipitação química à temperatura ambiente, tal como é descrito na literatura [88] e devidamente otimizado em estudos anteriores realizados no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro [24]–[26].

Este método baseia-se na adição de soluções básicas (hidróxido de sódio) a uma solução ácida (cloreto de zinco acidificado com ácido cítrico), contendo iões zinco (Zn^{2+}), com recurso a um pulverizador. O precipitado resultante é um pó branco constituído por nanopartículas de óxido de zinco.

Na figura 16 encontra-se esquematizado o procedimento experimental utilizado na síntese das nanopartículas de óxido de zinco.

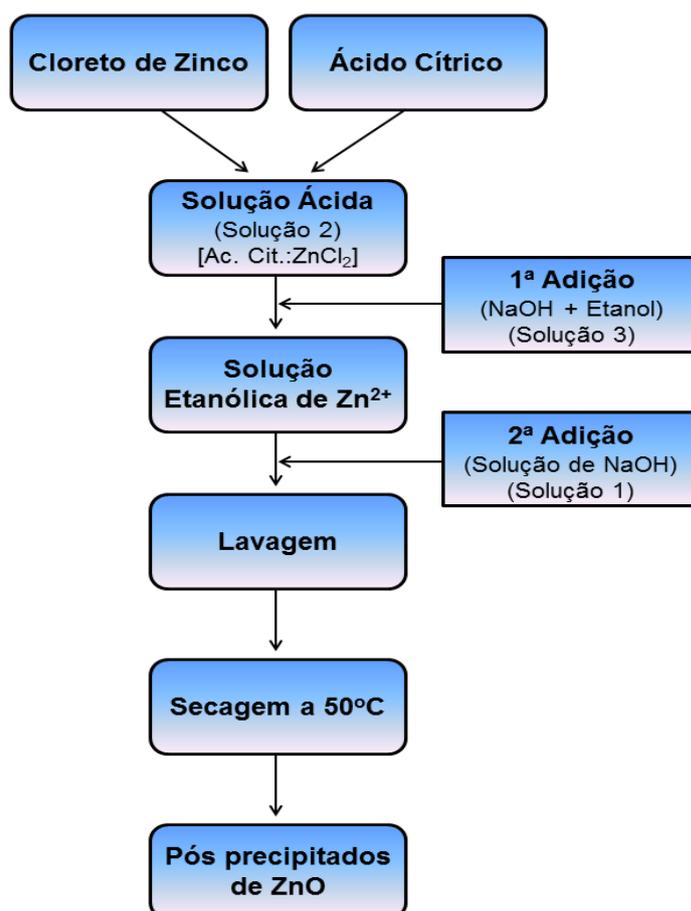


Figura 16 - Esquema do procedimento experimental usado na síntese dos pós de óxido de zinco precipitados.

Tal como referido, a adição das soluções básicas à solução ácida foi feita com recurso a um pulverizador (admitindo-se um caudal de 41.6 ml/min). O pulverizador é apresentado na figura 17 e possui dois orifícios: um localizado na parte superior (OS) e o outro localizado na parte lateral (OL). O orifício superior é o local de admissão da solução básica, que, ao chegar à extremidade inferior do pulverizador, entra em contacto com um fluxo de ar comprimido (a uma pressão de aproximadamente 3 bar), admitido pelo orifício lateral, sofrendo, então, dispersão e originando pequenas gotículas que entrarão em contacto com a solução ácida.

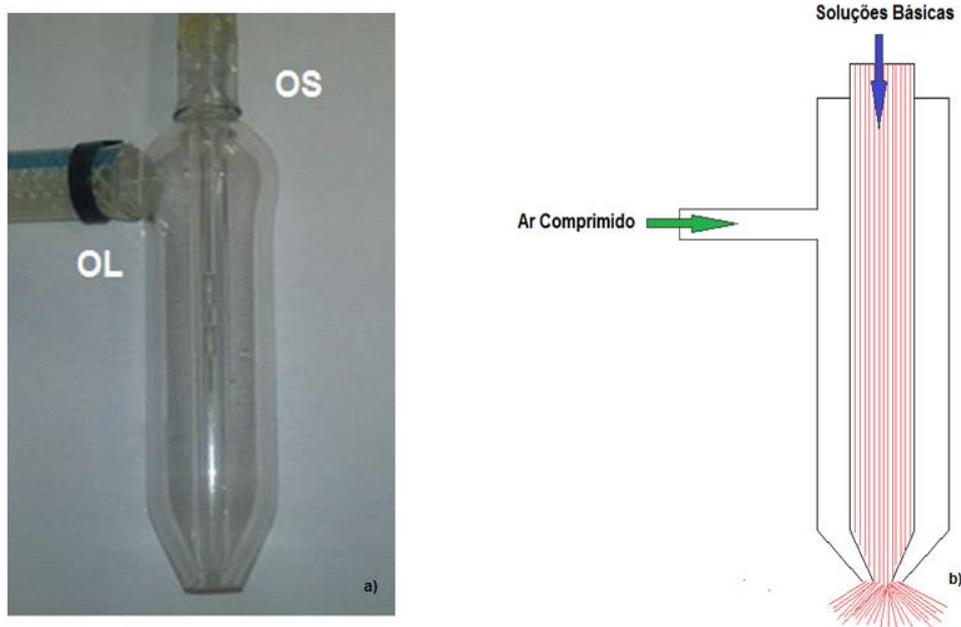


Figura 17 – (a) Imagem do pulverizador utilizado na síntese das nanopartículas ilustrando o posicionamento dos orifícios superior (OS) e lateral (OL) e (b) e ilustração esquemática, em corte, do seu modo de funcionamento (b).

Neste estudo foram sintetizados dois tipos de pós de nanopartículas de ZnO. Esses pós foram denominados de ZnO-1 e ZnO-2. A única diferença, no método de síntese, entre os dois tipos de nanopartículas foi a quantidade de reagentes utilizada na preparação das soluções precursoras para o método de precipitação.

Para a síntese das nanopartículas de ZnO foram preparadas três soluções: duas soluções básicas e uma solução ácida. A preparação da primeira solução básica (denominada de Solução 1) consistiu na dissolução de hidróxido de sódio (NaOH) em água destilada (H₂O), com recurso a agitação magnética durante 5 minutos. Esta solução apresentou um pH de aproximadamente 14. Para a preparação da solução ácida de Zn²⁺

(denominada de Solução 2) procedeu-se à dissolução de ácido cítrico monohidratado e de cloreto de zinco (ZnCl_2) em água destilada (H_2O), com recurso a agitação magnética durante 5 minutos. Esta solução apresentou um valor de pH de aproximadamente 1. A preparação da segunda solução básica (denominada de Solução 3) consistiu na diluição de 20 ml da Solução 1 em 15 ml de etanol absoluto, com recurso a agitação magnética durante 5 minutos. Esta solução apresentou um pH de aproximadamente 13.5.

As quantidades de reagentes utilizadas na preparação das soluções 1 e 2 para a síntese dos dois tipos de pós de óxido de zinco, ZnO-1 e ZnO-2, encontram-se sumarizadas na tabela 3.

Tabela 3 - Quantidade de reagentes utilizada na preparação das soluções precursoras da síntese das nanopartículas de ZnO.

	Solução 1		Solução 2		
	NaOH (g)	H ₂ O (ml)	Ác. Cítrico (g)	ZnCl ₂ (g)	H ₂ O (ml)
ZnO-1	20	50	17	3.647	25
ZnO-2	40	50	34	7.294	25

De seguida colocou-se a Solução 2 no frasco de Erlenmeyer sob agitação magnética constante (figura 18).

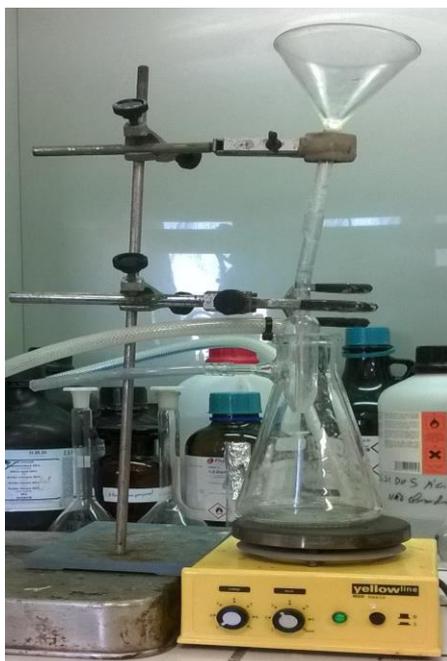


Figura 18 - Montagem experimental utilizada na síntese das nanopartículas de ZnO.

É então adicionada a Solução 3, pelo orifício superior do pulverizador, com admissão de ar a uma pressão constante de 3 bar, e de seguida adicionados 17 ml da Solução 1, obtendo-se, assim, uma suspensão de nanopartículas de óxido de zinco, cujo pH foi de aproximadamente 13.

A suspensão de óxido de zinco é então submetida a 12 ciclos de centrifugação a 10000 rpm, de 10 minutos cada, com lavagens entre cada ciclo. A lavagem consiste em: no final de cada ciclo de centrifugação, é retirado o sobrenadante e o precipitado ressuspenso com água desionizada. Este conjunto de lavagens tem como objectivo a eliminação do sódio (íões Na^+) que se possa encontrar no precipitado, permitindo assim obter óxido de zinco puro.

Por fim, o depósito resultante da centrifugação é seco numa estufa a uma temperatura de 50°C , durante aproximadamente 3 dias.

Os produtos sintetizados (ZnO-1 e ZnO-2), bem como as nanopartículas de óxido de zinco comercial (ZnO-C) foram caracterizadas por difracção de raios-X (DRX), microscopia electrónica de varrimento (SEM) com espectroscopia de energia dispersiva (EDS). Adicionalmente caracterizou-se a distribuição granulométrica das partículas e determinou-se a área superficial específica por adsorção de N_2 usando a isotérmica de *Braunauer-Emmett-Teller* (BET). As características superficiais das partículas foram caracterizadas por análise de Potencial Zeta.

3.3. Preparação dos compósitos de Poliuretano e nanopartículas de Óxido de Zinco

Os compósitos foram preparados com recurso ao método de evaporação de solvente.

Foram preparados compósitos de óxido de zinco e poliuretano, com um conteúdo de 30% de óxido de zinco, em peso (massa de ZnO/massa total do compósito) e para tal foram dissolvidos 0.28g de poliuretano em 15ml de clorofórmio, sob agitação magnética durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Preparou-se, também, uma suspensão de 0.12g de ZnO (ZnO-1, ZnO-2 ou ZnO-C consoante o compósito pretendido) em 5ml de 1,2 – Dicloroetano, agitando com ultra-sons durante 5 minutos, à temperatura ambiente. De seguida foram misturadas a solução de poliuretano e a suspensão de óxido de zinco, com recurso a ultra-sons, durante 10 minutos, de forma a que as nanopartículas ficassem homogeneamente distribuídas no compósito.

Por fim, a mistura final foi seca em copos de 10 ml, numa estufa a 37°C, durante um período superior a 12 horas, de forma a garantir a total evaporação dos solventes (clorofórmio e 1,2 – dicloroetano).

Na figura 19 encontra-se esquematizado o procedimento experimental utilizado na produção dos compósitos de poliuretano e óxido de zinco.

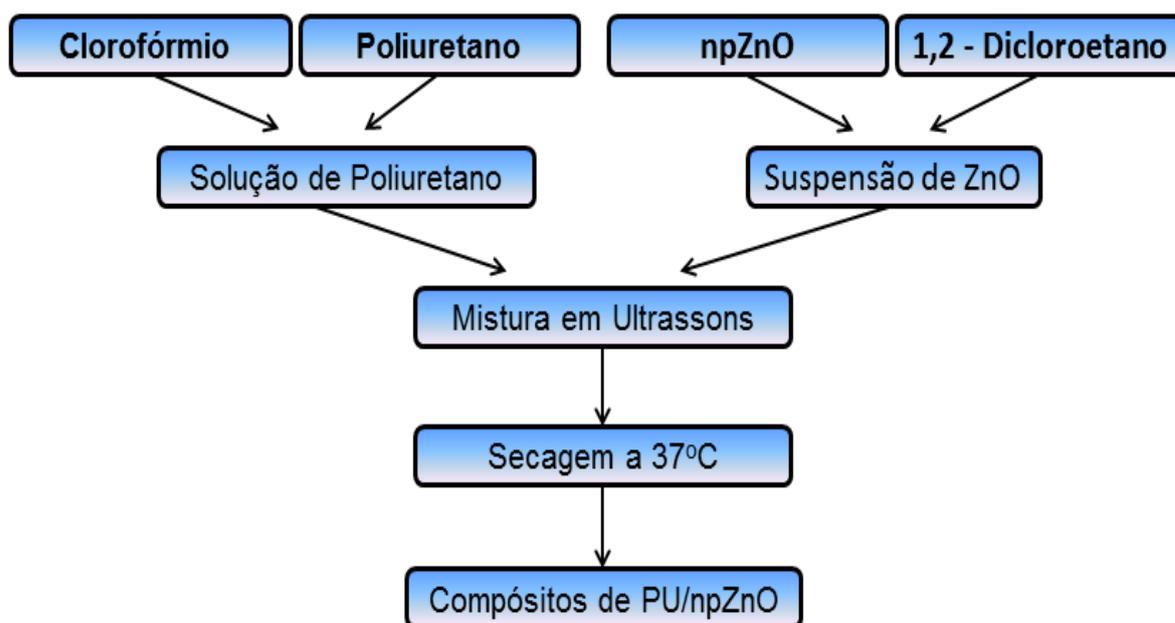


Figura 19 - Esquema ilustrativo da preparação dos compósitos de poliuretano e óxido de zinco.

Foram ainda preparadas membranas de poliuretano puro.

Para tal foram dissolvidos 0.4 g de poliuretano em 15 ml de clorofórmio, sob agitação magnética, durante 5 minutos. A solução foi seca em copos de 10 ml, numa estufa a 37°C, durante um período superior a 12 horas, de forma a permitir a total evaporação do solvente (clorofórmio). A membrana assim preparada será denominada de C0.

Na tabela 4 resumam-se as especificações das várias membranas produzidas, bem como as suas designações.

Tabela 4 - Especificações e designações das membranas produzidas.

Quantidade de ZnO	Tipo de Compósito	Denominação
30%	ZnO-1+PU	CP1-30
30%	ZnO-2+PU	CP2-30
30%	ZnO-C+PU	CC-30
0%	PU	C0

3.4. Estudo das propriedades antibacterianas

Os testes de determinação das propriedades antibacterianas foram executados de acordo com o método ASTM E2149, com devidas adaptações, denominado de “*Determinação da Actividade Antibacteriana de Agentes Antibacterianos Imobilizados sob Condições de Contacto Dinâmicas*” [89].

Este método é um método sensível, comumente usado para medir a actividade antibacteriana de superfícies irregulares ou hidrofóbicas. Este teste foi desenvolvido com o intuito de ultrapassar dificuldades enfrentadas pelos métodos de avaliação de actividade antimicrobiana clássicos, tais como o assegurar do contacto entre as bactérias e o material a testar [90], a sensibilidade do teste e a sua reprodutibilidade [91].

A espécie de bactéria seleccionada foi a *Escherichia Coli*, estirpe ATCC 25922, uma vez que tem características bem conhecidas e é uma das estirpes recomendadas para testes de actividade antimicrobiana [92].

O procedimento tem a duração de três dias e envolve, essencialmente, os seguintes passos: incubação da cultura de bactérias, a 37°C, durante 16h; suspensão dos pós de óxido de zinco, nos ensaios com os pós, ou dos compósitos PU/npZnO, nos ensaios com os compósitos, em tampão fosfato e adição da suspensão de bactérias, seguido de incubação em agitação constante durante 1h; realização de diluições decimais das suspensões incubadas; sementeira à superfície das placas de petri; incubação das placas semeadas a 37°C durante 16-24h; contagem das unidades formadoras de colónias (UFC). O procedimento detalhado dos ensaios para determinação da viabilidade bacteriana pode ser consultado em Anexo.

3.5. Técnicas de Caracterização

3.5.1. Difração de Raios X

A difracção de raios-x (DRX) é uma técnica não destrutiva que permite a identificação de fases cristalinas e a quantificação de várias características estruturais, entre as quais os parâmetros de rede, o tamanho de cristalite e a orientação cristalográfica [93], [94]. Esta técnica é baseada no fenómeno de interações construtivas de feixes difractados e segue a lei de Bragg (figura 20) [95], [96]:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad (9)$$

onde, “ $n\lambda$ ” é a diferença de fases construtiva, “ d_{hkl} ” é a distância interplanar e “ θ ” é o ângulo de difracção entre o plano cristalográfico e o feixe incidente de radiação, de comprimento de onda “ λ ” [95].

Através da variação de 2θ , que é o ângulo de difracção, e medindo a intensidade do feixe difractado, que depende do número de planos atómicos igualmente espaçados, obtém-se o difratograma, que pode ser comparado com uma base de dados para identificar a estrutura do material [97].

A largura de um pico de difracção de raios X, num varrimento de θ a 2θ , está relacionada com o tamanho médio de cristalite das amostras. A equação que relaciona a largura a meia altura, também denominada por “*full-width at half maximum*” (FWHM), de um pico de difracção, com a dimensão média (TC) (10) das cristalites na direcção perpendicular à superfície do substrato, é conhecida como equação de *Debye-Scherrer* [98], e é dada por:

$$TC = \frac{k\lambda}{\beta\cos\theta} \quad (10)$$

onde, “ k ” é o factor de forma (assume o valor de 0.98 para superfícies esféricas), “ λ ” é o comprimento de onda da radiação X, “ θ ” é a posição do pico, em graus, e “ β ” é a largura a meia altura (FWHM), em radianos, sendo “ β ” definido por:

$$\beta = \sqrt{(A_{obs}^2 - a^2)} \quad (11)$$

onde o “ A_{obs} ” é a largura a meia altura do pico (FWHM) da amostra em análise e “ a ” refere-se à FWHM de uma amostra padrão, cuja largura a meia altura é conhecida.

A análise foi efectuada num difractómetro *RigakuGeigerflex D/ Max-SérieC*, a uma intensidade de corrente de 30 mA, e uma diferença de potencial de 40 kV e usando uma radiação $K\alpha$ ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) de um ânodo de cobre.

A análise por difracção de raios-X foi usada para identificar as fases e estrutura cristalinas dos materiais estudados (pós de óxido de zinco (precipitados e comercial), poliuretano, e compósitos) e para calcular o respectivo tamanho de cristalite (TC), com base na equação de *Debye-Scherer*.

A base de dados usada como referência durante este projecto foi a *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD).

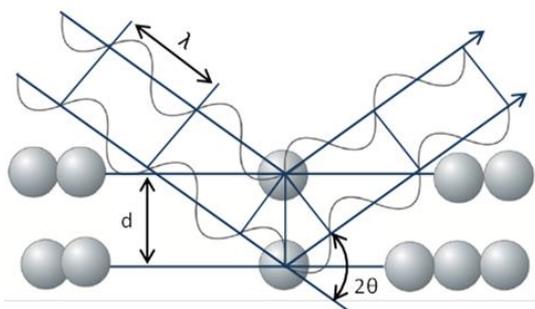


Figura 20 - Ilustração esquemática da Lei de Bragg.

3.5.2. Microscopia Electrónica de Varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM), desenvolvida por Max Knoll [99] no início dos anos 30, pode proporcionar imagens de alta resolução da superfície de uma amostra, à escala micrométrica e nanométrica.

O princípio básico de funcionamento baseia-se no bombardeamento da superfície do material em estudo com um feixe de electrões altamente energético (geralmente entre os 0.1 e os 30 keV), do qual resultam a emissão de electrões e fotões. Os electrões e os fotões emitidos pelo material darão origem à imagem da topografia da superfície do material (imagem SEM) [95].

Existem várias interações que podem ocorrer entre a superfície da amostra e o feixe electrónico, tais como: absorção de electrões por parte da amostra, emissão de electrões retrodifundidos, emissão de electrões de *Auger* e emissão de fotões X. Destas muitas interações, a emissão de fotões X é particularmente interessante. Se a energia do fotão X for suficiente para que este seja detectado é possível identificar o elemento químico da amostra que originou a emissão desse fotão X. Este é o princípio básico da espectroscopia de energia dispersiva (EDS), que será melhor explicada mais a frente neste documento [96].

As amostras para SEM podem ter qualquer formato, desde que sejam suportadas pelo porta-amostras. Normalmente, as amostras são cobertas por um filme fino de carbono ou ouro com o intuito de lhes conferir condutibilidade eléctrica[96].

As amostras foram observadas num microscópio electrónico de varrimento *Hitachi S-4100*, disponível no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro que é um modelo com alta resolução, provido de um sistema de emissão com um filamento de tungsténio com um potencial de aceleração de 25 keV e uma resolução máxima de 15Å, e microanálise de dispersão de energia de raios X (EDS).

De modo a proceder a observação da amostra foi colado um pequeno pedaço de fita-cola de carbono (*Neubauer Chemikalien*) num porta-amostras de alumínio plano e polido. De seguida, foi colocado uma quantidade muito pequena de pó (1 a 2 mg), na fita-cola, de forma a que esta ficasse bem espalhada. Seguidamente as amostras foram sujeitas à deposição de um filme fino de carbono, num equipamento *Emitech K950*.

As medições do diâmetro médio de partícula e da espessura média das subunidades nanoestruturadas das partículas foram medidas com recurso ao software *ImageJ*.

3.5.3. Espectroscopia de Energia Dispersiva

A espectroscopia de energia dispersiva (EDS) é um técnica comumente usada pra análise elementar e composicional de uma amostra. Baseia-se na detecção de radiação X secundária emitida pela amostra como resultado da ionização dos seus átomos devido à sua interacção com o feixe electrónico incidente de que resulta a ejeção de electrões de uma das orbitais internas dos átomos (níveis de baixa energia) da amostra, levando a formação de buracos. Para facilitar o retorno do átomo ao seu estado de energia fundamental, os electrões das orbitais mais externas (níveis de mais alta

energia) tendem a ocupar os buracos formados. A diferença de energia entre estes níveis atômicos leva à emissão de radiação X, que é colectada por um detetor adequado (espectrómetro de energia dispersiva) permitindo assim a identificação e quantificação dos elementos constituintes da amostra [100].

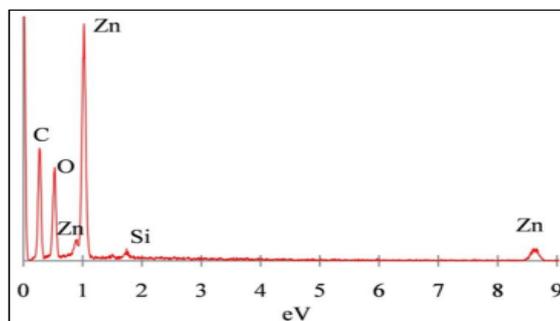


Figura 21 - Exemplo típico de um espectro de EDS.

O mesmo equipamento usado para a microscopia electrónica de varrimento é suficiente para gerar o feixe de electrões necessário para a análise EDS. O detetor de radiação X usado para a análise EDS é, por isso, normalmente integrado em sistemas de SEM. A espectroscopia de energia dispersiva permite uma rápida análise de elementos químicos individuais de uma amostra, através da comparação do espectro obtido com valores de energias de radiação X conhecidas e características dos elementos. Dependendo do tipo de detetor, conseguem ser detectados elementos tão leves como o Berílio [100].

3.5.4. Adsorção gasosa para determinação da Área Superficial Específica

A área superficial específica é definida como a razão A_s/m_s (m^2/g) entre a área superficial absoluta de um sólido (A_s) e a sua massa (m_s) (massa da amostra). A área superficial inclui todas as partes de superfícies internas acessíveis a partir do exterior, como por exemplo, as superfícies das paredes dos poros. A área superficial específica pode ser calculada com base em isotérmicas de adsorção de gases, nomeadamente do gás Azoto (N_2), que foi o gás utilizado neste estudo. Isotérmica é a relação, a temperatura constante, entre a quantidade de gás adsorvido na superfície de um material e a pressão parcial a que a adsorção ocorre. É normalmente representada como a variação da quantidade adsorvida (em mmol/g) em função da pressão relativa (p/p_0) do gás

adsorvido, em que “ p_0 ” é a pressão de saturação do gás adsorvido à temperatura do ensaio.

Segundo *Braunauer, Emmett e Teller* (BET), a adsorção de gás na superfície de um material pode ser descrita por quatro passos (figura 22) [101].

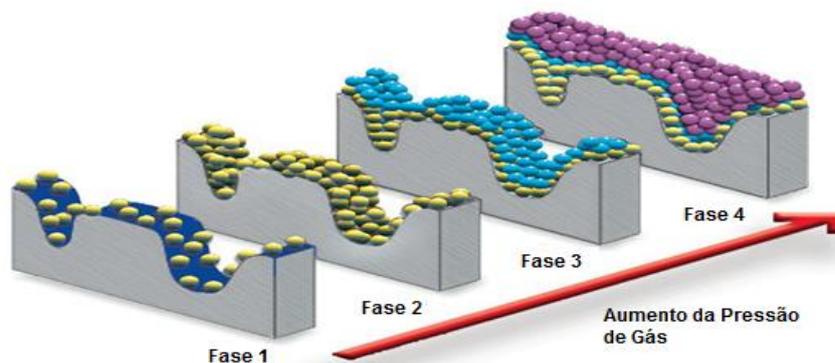


Figura 22 - Os quatro passos que descrevem a adsorção de gás segundo *Braunauer, Emmett e Teller*: (1) processo inicial de adsorção, (2) formação da monocamada, (3) formação da multicamada e (4) preenchimento dos poros.

Numa primeira fase (fase 1) as moléculas de gás são adsorvidas à superfície do material, através da ação de forças de Van der Waals. Com o aumento da pressão, mais moléculas de gás são adsorvidas, até que fica completa uma camada monomolecular deste gás (fase 2). Com o posterior aumento da pressão são formadas novas camadas de gás adsorvido até ao completo preenchimento dos poros (fases 3 e 4) [101].

A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) define poro como uma cavidade cuja profundidade é superior ao seu comprimento. De acordo com o IUPAC os poros são classificados em função do seu diâmetro (D_p) [101], ou seja:

- Macroporos: $D_p > 50$ nm
- Mesoporos: $0.2 < D_p < 50$ nm
- Microporos: $D_p < 0.2$ nm

Segundo a IUPAC, as isotérmicas de adsorção são classificadas em seis tipos diferentes, estando cada tipo de isotérmica associado a um determinado mecanismo de adsorção [101]. A classificação usada atualmente baseia-se nas curvas ilustradas na figura 23 e dela constam os seguintes tipos de isotérmicas:

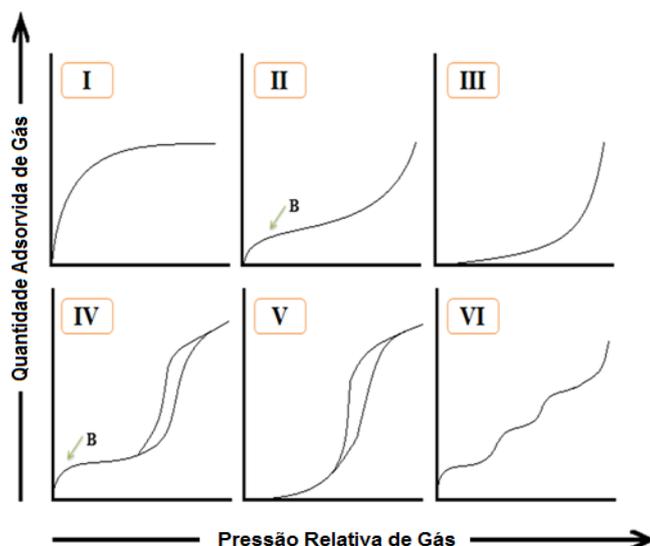


Figura 23 - Padrões IUPAC das isotérmicas para sólidos porosos ou pós [101].

- **Tipo I:** Esta isotérmica é também conhecida como isotérmica de *Langmuir*. Este comportamento está presente em sólidos microporosos com reduzida área superficial externa. Esta isotérmica apresenta uma curva inicialmente crescente que tende a estabilizar a pressões relativas mais altas. Essa estabilização é determinada e limitada pelo volume do microporo.
- **Tipo II:** esta isotérmica é bastante comum em sólidos não porosos ou macroporosos e está associada a formação de monocamada de gás adsorvido (ponto B) com posterior adsorção multicamada sem qualquer restrição.
- **Tipo III:** As isotérmicas de tipo III são casos raros e geralmente não têm o ponto B, ou seja não ocorre a formação da monocamada de gás adsorvido.
- **Tipo IV:** Tal como as isotérmicas do tipo II, esta isotérmica é caracterizada pela formação de monocamada e multicamada. Tem, no entanto, um ciclo de histerese associado à condensação capilar dentro dos mesoporos.
- **Tipo V:** A isotérmica de tipo V é também caracterizada pelo ciclo de histerese, mas em vez da formação de multicamada, segue uma tendência semelhante à do tipo III.
- **Tipo VI:** Esta isotérmica geralmente representa uma adsorção multicamada escadeada, em superfícies não porosas e não uniformes, estando cada degrau relacionado com uma camada formada [101].

Os sólidos porosos ao serem sujeitos à adsorção de gases podem apresentar os referidos ciclos de histerese em que a curva de adsorção não coincide com a curva de dessorção. Este fenómeno acontece devido ao facto de, no interior dos poros, a condensação e evaporação do adsorvato ocorrer a pressões de gás diferentes. As histereses podem exibir quatro padrões diferentes (H1 a H4 – figura 24), que estão normalmente associados à condensação capilar nos mesoporos com diferentes geometrias [101]:

- **Tipo H1:** Está relacionado com aglomerados de partículas esféricas de distribuições de tamanho de poro estreitas.
- **Tipo H2:** Associada a mecanismos de condensação e adsorção em materiais que possuem poros em forma de gargalo (“*bottleneck*”).
- **Tipo H3:** Este padrão é exibido por materiais que apresentam um formato semelhante a placas, e que originam poros em forma de fenda.
- **Tipo H4:** Tal como no padrão H3, este tipo de histerese é característico de materiais com poros em forma de fenda, sendo que neste caso os poros são mais estreitos.

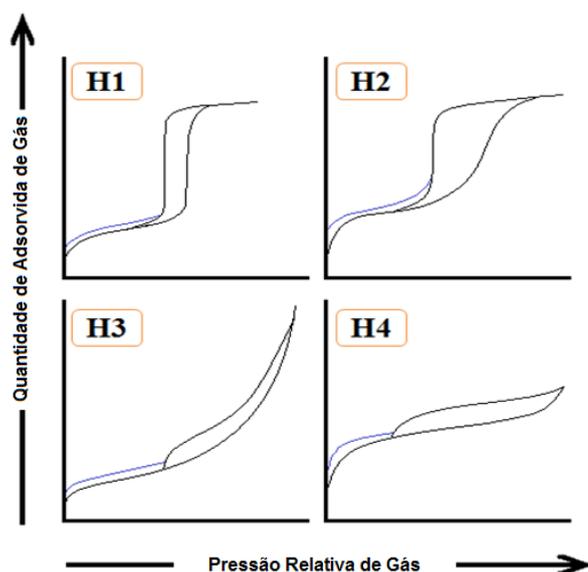


Figura 24 - Classificação IUPAC dos ciclos de histerese [101].

Um dos métodos mais utilizados para analisar a área superficial específica é o método baseado na isotérmica de *Braunauer – Emmett – Teller* (BET), também conhecido como método de BET, que foi o método seleccionado para este estudo [102].

De acordo com este método, a área superficial específica (SSA) pode ser determinada a partir da porção linear da isotérmica de adsorção numa gama de pressões parciais de 0.05 a 0.30 através da equação de BET (12) [103].

$$\frac{\frac{p}{p^0}}{n\left(1-\frac{p}{p^0}\right)} = \frac{c-1}{n_m c} \times \frac{p}{p^0} + \frac{1}{n_m c} \quad (12)$$

na qual “ p/p^0 ” é a pressão parcial do gás, “ p ” corresponde à pressão de equilíbrio, “ p^0 ” é a pressão de saturação à temperatura de adsorção, “ n ” é a quantidade de gás adsorvido (em moles) à pressão “ p ”, “ n_m ” é a quantidade de gás necessária para preencher totalmente a monocamada (em moles). O parâmetro “ c ” é designado por constante de BET é dado por:

$$c = e^{(E_1 - E_L)/RT} \quad (13)$$

onde E_1 e E_L representam respetivamente o calor de adsorção relativo à primeira camada e o calor de condensação de vapor [103].

Após a determinação de n_m a partir da equação de BET, a SSA pode ser calculada pela seguinte equação (14):

$$SSA = \frac{n_m \times N_A \times a_m}{m} \quad (14)$$

na qual “ m ” é a massa da amostra, “ N_A ” é a constante de Avogadro e “ a_m ” é a área média ocupada por uma molécula de gás adsorvida na monocamada, que no caso do azoto é de 0.162nm^2 [103].

É ainda possível determinar o tamanho esférico equivalente da partícula (SED) a partir da SSA determinada pelo método de BET [104] através da seguinte equação (15):

$$SED = \frac{6}{SSA \times \rho} \quad (15)$$

onde “ ρ ” é a densidade teórica da amostra, que no caso do óxido de zinco corresponde a 5.6 g/cm^3 [104] e a “SSA” é a área superficial específica determinada pelo método de BET.

Neste estudo, foi utilizado um equipamento *Micrometrics_Gemini 2370V5* para medição da área superficial específica dos pós de óxido de zinco, quer sintetizados, quer comerciais. As amostras foram desgaseificadas a 80°C durante 3 dias, com o intuito de eliminar quaisquer gases ou vapores adsorvidos à superfície dos materiais.

3.5.5. Potencial Zeta

O potencial zeta é uma propriedade física exibida por uma partícula em suspensão. A interface entre a partícula e o meio líquido que a rodeia pode ser dividida em duas regiões: uma região mais interna, denominada de camada de Stern, onde os íons do meio estão fortemente adsorvidos na superfície da partícula, e uma região mais externa, chamada de camada difusa, onde os íons do meio estão menos ligados à superfície da partícula (figura 25). Existe assim uma dupla camada elétrica a rodear cada partícula. Entre estas duas camadas, a camada de Stern e a camada difusa, existe uma fronteira, denominada de plano de deslizamento, onde os íons do meio e a partícula estão estáveis, ou seja, quando a partícula se move, por exemplo, devido à ação da gravidade ou a uma diferença de potencial aplicada, os íons presentes na camada de Stern movem-se com a partícula, ao passo que os íons presentes na camada difusa não se movem. O potencial elétrico associado a essa fronteira é conhecido como o Potencial Zeta.

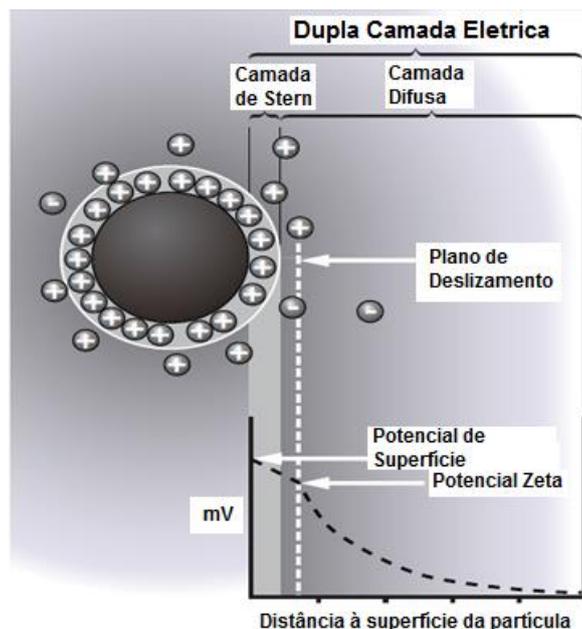


Figura 25 - Imagem representativa da dupla camada elétrica.

O factor mais importante que afecta o potencial zeta é o pH. Uma partícula com potencial zeta negativo colocada em suspensão num meio básico tenderá a adquirir mais carga negativa. Se for adicionado um ácido ao meio, ocorrerá o inverso, sendo a carga de superfície da partícula neutralizada pela adsorção de iões de carga positiva, fornecidos pelo ácido; se for adicionado mais ácido, a partícula continua a adsorver cargas positivas e o seu valor de potencial zeta tornar-se-á positivo e continuará a aumentar.

Uma importante consequência da existência de carga elétrica na superfície das partículas é a sua mobilidade em suspensão quando colocadas sob a ação de um campo elétrico aplicado (eletroforese). Neste caso, estando as partículas suspensas num electrólito, têm tendência a deslocar-se em direção ao eléctrodo de carga oposta. A viscosidade do meio oferece uma resistência que tende a opor-se a esse movimento. Em condições de equilíbrio de forças, as partículas movem-se a velocidade constante, sendo esta velocidade denominada de mobilidade eletroforética. A velocidade da partícula depende da força do campo elétrico, da constante dielétrica do meio, da viscosidade do meio e do potencial zeta.

O valor de potencial zeta pode ser obtido através da equação de Henry (16):

$$U_E = \frac{2\varepsilon \cdot z \cdot f(k\alpha)}{3\eta} \quad (16)$$

onde, “z” é o potencial zeta, “ U_E ” é a mobilidade eletroforética, “ ϵ ” é a constante dielétrica, “ η ” é a viscosidade e $f(\kappa a)$ é a função de Henry [105].

Neste estudo, foi utilizado um equipamento *Zetasizer Nano ZS*, da *Malvern Instruments*, para medição do potencial zeta das partículas de óxido de zinco precipitadas e comerciais. As medições foram todas realizadas em solução de cloreto de potássio (KCl) (10ml, $10^{-3}M$), tendo sido adicionado ácido clorídrico (HCl) (0.01M) e hidróxido de sódio (NaOH) (0.1M) para ajuste do pH, permitindo medidas de potencial zeta a diferentes valores de pH, na gama de valores entre 5 e 12.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização das nanopartículas de óxido de zinco

4.1.1. Composição e cristalinidade

Na figura 26 encontram-se os difratogramas de raios X dos pós de óxido de zinco comercial (ZnO-C) e precipitados (ZnO-1 e ZnO-2), que foram objecto de estudo neste projecto.

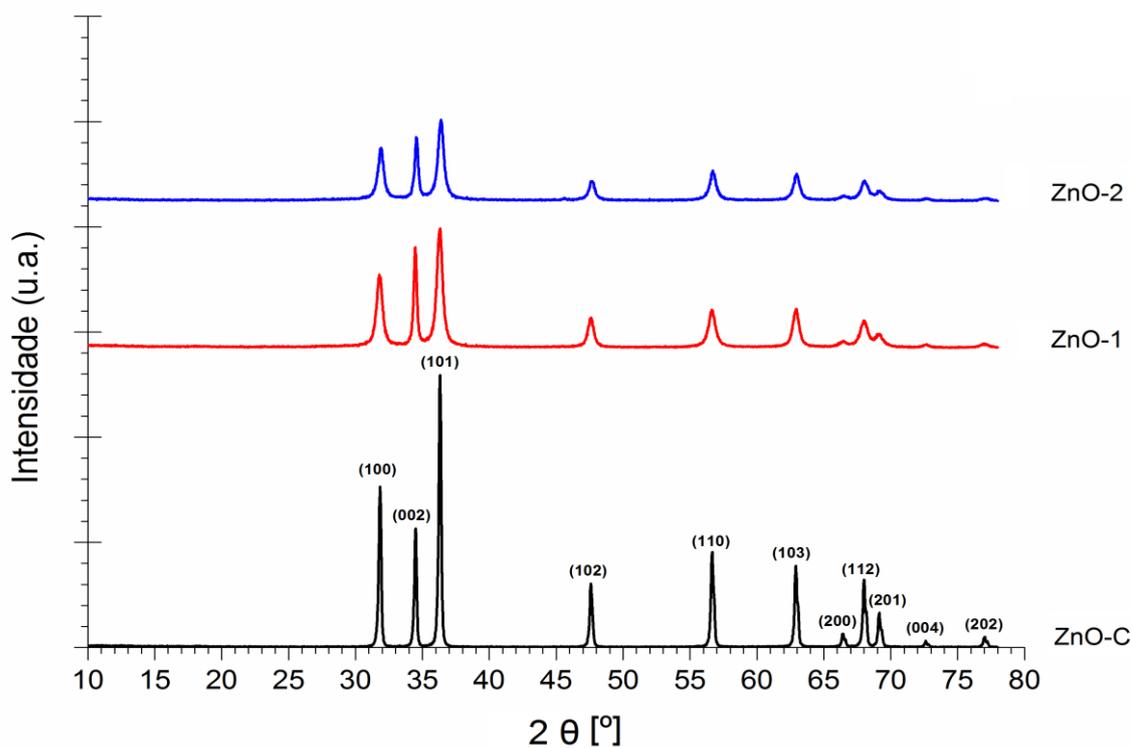


Figura 26 - Difratograma de raios X dos pós de óxido de zinco comerciais (ZnO-C) e dos sintetizados pelo método de precipitação química (ZnO-1 e ZnO-2).

Tanto os difratogramas das partículas comerciais, como os das partículas sintetizadas, confirmam a existência de uma única fase cristalina hexagonal, a *wurtzite*.

Os planos identificados no difratograma coincidem com os planos característicos da *wurtzite* (segundo a ficha cristalográfica JCPDS 00-036-1451 do óxido de zinco).

O pó ZnO-C aparenta ter uma cristalinidade superior, evidenciada por picos muito intensos e estreitos, quando comparado com os pós precipitados, o que pode ser reflexo de uma elevada temperatura de síntese dos ZnO-C.

Os pós precipitados ZnO-1 apresentam, também uma estrutura cristalina bem definida, no entanto não tão bem definida como a dos pós comerciais. Este facto é evidenciado pela intensidade e formato dos picos, que não são tão intensos nem tão estreitos como os presentes no difratograma do óxido de zinco comercial.

Argumentos da mesma natureza, intensidade e largura a meia altura do pico, indicam o pó ZnO-2 como possuindo cristalinidade inferior aos pós ZnO-C e ZnO-1.

Os tamanhos médios de cristalite dos pós ZnO-1, ZnO-2 e ZnO-C, determinados com base na equação de Debye-Scherrer, foram de 28, 24 e 122 nanómetros, respectivamente. Estes resultados estão em concordância com as observações qualitativas apresentadas anteriormente.

Calculou-se também a razão entre a intensidade dos picos correspondentes aos plano (002) e (101) ($I_{(002)}/I_{(101)}$), tendo-se obtido o valor de 0.78, para os pós precipitados, e de 0.47, para os pós de ZnO-C. Sendo estes valores superiores a 0.44 (valor padrão da razão de intensidade da *wurtzite*), tem-se um crescimento preferencial das partículas segundo a direcção (002), mais acentuado no caso dos pós precipitados [106].

4.1.2. Morfologia da Partícula

Nas figuras 27, 28 e 29, 30 e 31 apresentam-se as micrografias dos pós de óxido de zinco ZnO-C, ZnO-1 e ZnO-2, respectivamente, obtidas por microscopia electrónica de varrimento (SEM).

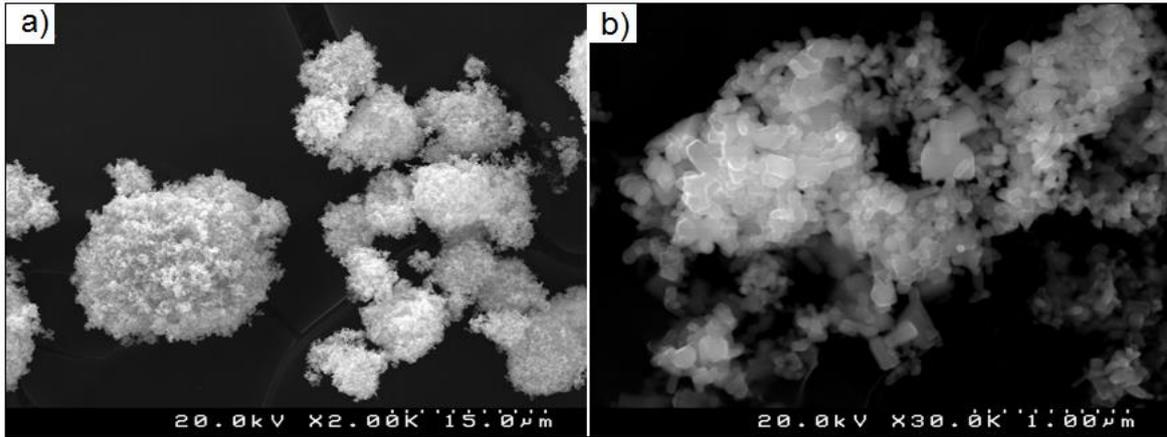


Figura 27 - Micrografias dos pós comerciais de óxido de zinco (ZnO-C) obtidas por SEM, com diferentes ampliações.

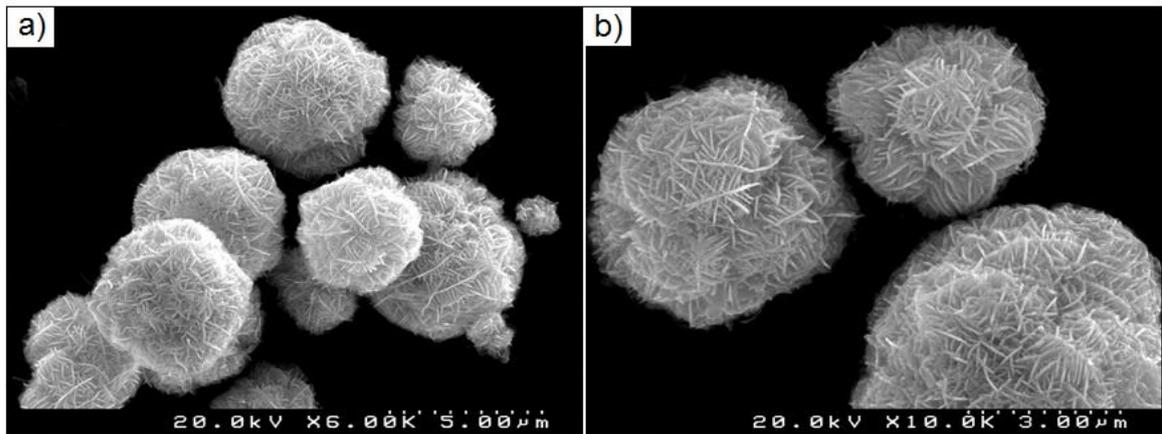


Figura 28 - Micrografia dos pós precipitados de óxido de zinco ZnO-1 obtidas por SEM, com diferentes ampliações.

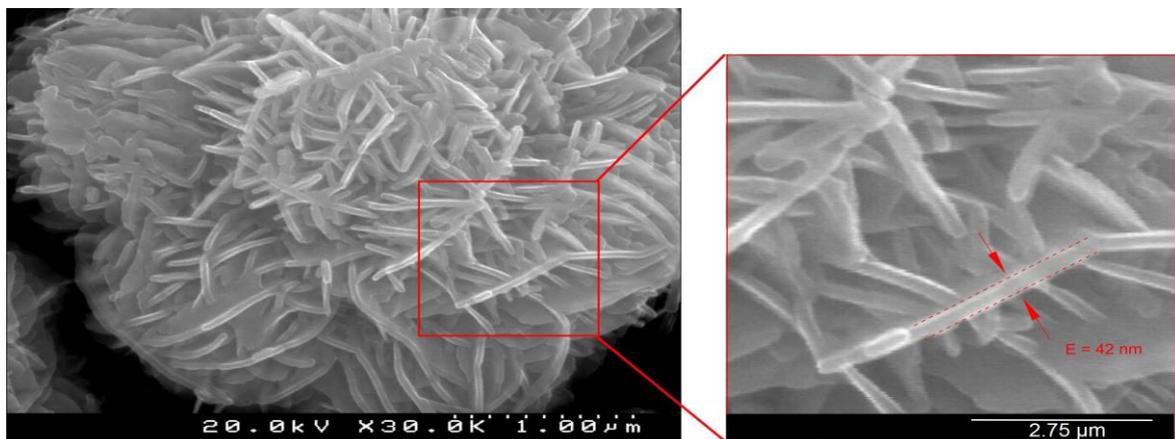


Figura 29 - Micrografia dos pós precipitados de óxido de zinco ZnO-1 obtidas por SEM, com diferentes ampliações, com identificação da espessura (E) das subunidades em forma de nanoplaquetas.

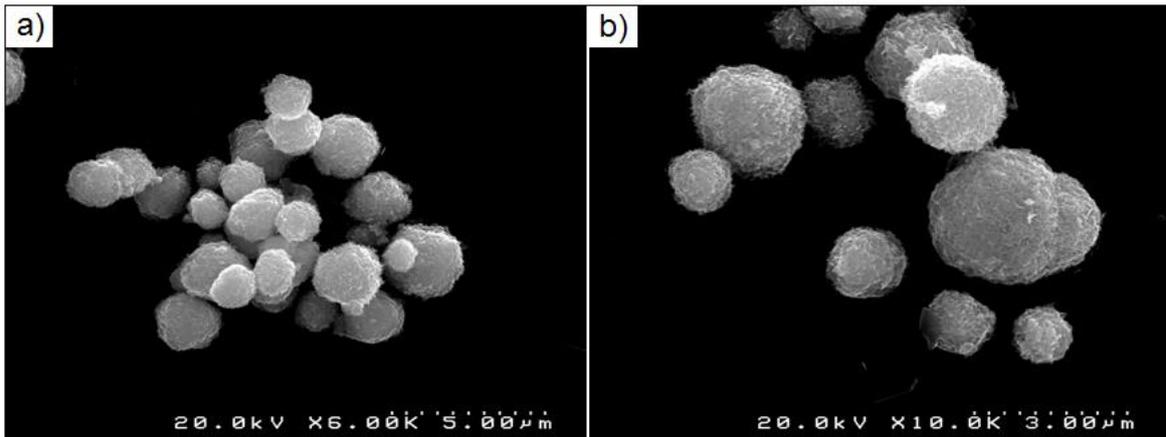


Figura 30 - Micrografias dos pós precipitados de óxido de zinco ZnO-2 obtidas por SEM, com diferentes ampliações.

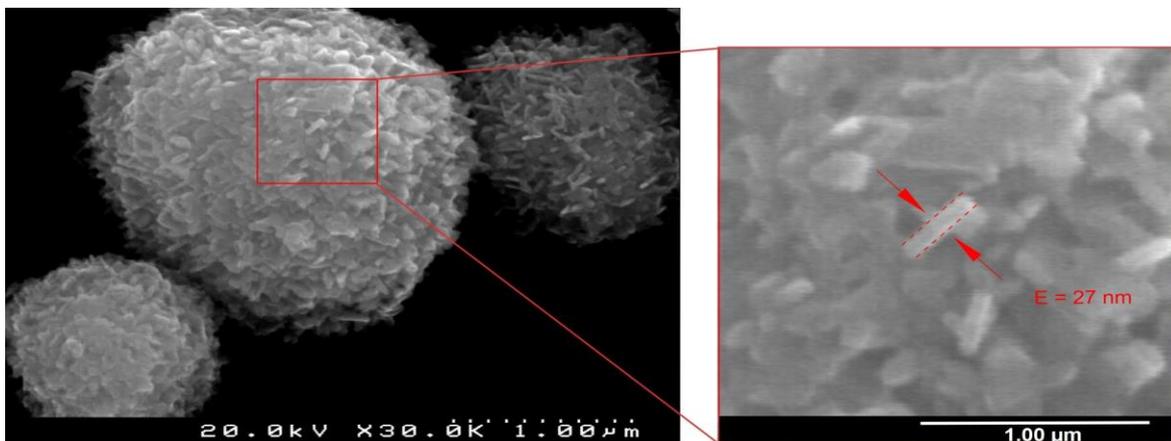


Figura 31 - Micrografia dos pós precipitados de óxido de zinco ZnO-2 obtidas por SEM, com diferentes ampliações, com identificação da espessura (E) das subunidades em forma de nanoplacas.

As micrografias dos pós de óxido de zinco comercial (ZnO-C) observadas na figura 27 (a e b) evidenciam a presença de grandes agregados nanoestruturados, em que se detectam partículas submicrométricas com formato arredondado ou irregular. Este pó apresenta-se assim muito irregular quer na distribuição do tamanho de partícula, quer na própria morfologia de partícula. Esta característica é provavelmente um reflexo do método industrial de produção destas partículas, que é baseado em tratamentos a altas temperaturas do próprio metal zinco ou mesmo do minério de origem do metal. O elevado tamanho de cristalite, referido anteriormente, é uma consequência destas condições de síntese.

Os pós precipitados ZnO-1 (figura 28 (a e b) e figura 29) apresentam-se, morfologicamente, como aglomerados esféricos, bem definidos, com um diâmetro médio

de cerca de 4 μ m, constituídos por subunidades de tamanho nanométrico em forma de plaquetas, cuja espessura média (E) (figura 29) é de aproximadamente 42 nm. A distribuição relativa destas subunidades na partícula esférica torna-a semelhante a uma flor microestruturada ou “microflor”.

O aspecto apresentado por estas partículas pode ser justificado pelo facto de, numa fase inicial da precipitação, no momento em que os núcleos começam a crescer, a existência de um elevado número de partículas com dimensões muito reduzidas e com elevadíssima energia de superfície (que é também um resultado do seu tamanho diminuto [107]) levou a agregação das mesmas, resultando assim num agregado esférico de plaquetas nanoestruturadas [25].

Os pós precipitados ZnO-2 (figura 30 (a e b) e figura 31), tal como os pós ZnO-1, apresentam-se, morfologicamente, como aglomerados esféricos, bem definidos, com um diâmetro médio de cerca de 2 μ m. São também constituídos por subunidades de tamanho nanométrico em forma de plaquetas, no entanto com uma espessura média (E) (figura 31) inferior à dos pós ZnO-1 (aproximadamente 27 nm). Além disso estas partículas têm uma aparência muito mais compacta, quando comparada com os pós ZnO-1.

A diferença de morfologia entre estas partículas e as partículas do pó ZnO-1 pode ser justificada pelas diferenças no método de síntese. Tal como referido no capítulo anterior deste documento, a diferença entre os métodos de síntese dos pós ZnO-1 e ZnO-2 reside fundamentalmente na concentração de reagentes usada, que na síntese dos pós ZnO-2 foi o dobro da usada na síntese dos pós ZnO-1. Esse aumento da concentração de reagentes resultou num aumento da sobressaturação em solução, e como consequência, no aumento da velocidade de nucleação. A quantidade de núcleos formados no caso de ZnO-2 é superior à correspondente a ZnO-1, pelo que o crescimento dos núcleos no caso de ZnO-2 ficou desfavorecido comparativamente com os de ZnO-1. Sugere-se assim que, no caso de ZnO-2, o processo de agregação de partículas de menores dimensões tenha originado estruturas mais compactas do que no caso de ZnO-1, justificando assim as diferenças na aparência das partículas de ZnO-1 e ZnO-2.

Na literatura são reportadas outras morfologias de nanopartículas de óxido de zinco, tais como, nanoesferas, produzidas por um método de *eletrospinning*, seguido de tratamento térmico, e usando como precursor principal um acetato de zinco [63], nanocubos, produzidos por um método de síntese hidrotermal, e usando como precursores nitrato de zinco e hidróxido de potássio [62], entre outras.

Na figura 32 é apresentada a análise de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) dos pós precipitados.

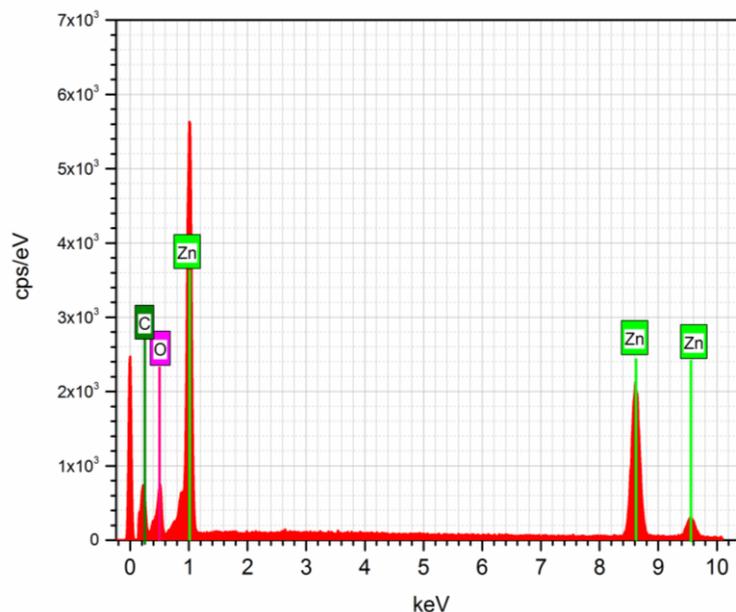


Figura 32 - Espectro de EDS dos pós precipitados de óxido de zinco, onde se evidenciam os picos correspondentes aos elementos detectados na amostra: Carbono (C), Oxigênio (O) e Zinco (Zn).

Para além dos picos correspondentes ao oxigênio e ao zinco, encontra-se somente o pico correspondente ao carbono, que resulta da deposição do filme condutor de carbono e da fita-cola de carbono usados na preparação da amostra para análise SEM. A ausência de qualquer outro elemento no espectro de EDS confirma que a amostra é constituída somente por óxido de zinco puro, não estando presentes quaisquer impurezas.

4.1.3. Porosidade e área superficial específica

Na figura 33 são apresentadas as isotérmicas de adsorção/dessorção gasosa dos pós de óxido de zinco precipitados ZnO-1 e ZnO-2 e dos pós comerciais ZnO-C.

Os pós comerciais (ZnO-C) e precipitados (ZnO-1 e ZnO-2) de óxido de zinco apresentam uma isotérmica tipo IV, segundo a classificação da IUPAC, o que revela a presença de mesoporos responsáveis pela condensação capilar mesoporosa. Os pós precipitados (ZnO-1 e ZnO-2), quanto ao tipo de histerese que evidenciam, podem ainda classificar-se como isotérmicas do tipo H3 que indicam a presença de poros em forma de

fenda (*slit pores*) [101]. Estes resultados são concordantes com as imagens obtidas por SEM, uma vez que o posicionamento relativo das subunidades das partículas, as nanoplacas, indica a existência de espaços ou poros em forma de fenda, sendo esse aspecto mais evidente nas estruturas dos pós ZnO-1. O mesmo acontece para os pós ZnO-2, que também se apresentam como agregados de subunidades em forma de nanoplacas, no entanto são pós aparentemente mais compactos e densos, como pode ser verificado pelas micrografias obtidas por SEM. Os pós comerciais (ZnO-C), quanto ao tipo de histerese que evidenciam, podem ainda classificar-se como uma isotérmica tipo H4, que é característica de pós constituídos por agregados de plaquetas cujos poros são estreitos e em formato de fenda (*slit pores*) [101], embora essa característica não seja evidente nas micrografias obtidas por SEM.

Em concordância com as isotérmicas de adsorção (figura 33), as curvas cumulativas de volume de poro evidenciam diferenças de porosidade entre os vários pós de óxido de zinco: os pós ZnO-1 apresentam um volume total de poro de aproximadamente $10^{-1} \text{ cm}^3/\text{g}$, que é substancialmente superior aos dos pós ZnO-2 e ZnO-C, cujos valores são semelhantes e próximos de $4 \times 10^{-2} \text{ cm}^3/\text{g}$ (figura 34). As curvas de distribuição de tamanho de poro (figura 35) também são significativamente diferentes entre si: o pó ZnO-C apresenta uma curva de distribuição unimodal com um máximo centrado num diâmetro de poro de aproximadamente 2 nm, ao passo que, os pós precipitados apresentam curvas bimodais em que, para além de um máximo relativo a um tamanho de poro de aproximadamente 2 nm, se observam outros valores extremos de dV/dw que ocorrem para valores de diâmetro de poro iguais a 8 e 20 nm para os pós ZnO-2 e ZnO-1, respectivamente. No seu conjunto, estes dados indicam que, embora o volume total de poros seja semelhante no caso dos pós ZnO-C e ZnO-2, ele se encontra fundamentalmente distribuído por poros muito finos, no caso de ZnO-C, e por poros finos e poros mais largos, no caso do ZnO-2. As áreas superficiais específicas medidas para estes dois pós foram de 20 e 10 m^2/g , respectivamente, o que reflecte os diferentes contributos de tamanho de poro atrás referidos. De facto um mesmo volume de poro, se distribuído por poros muito finos, originará maior área superficial específica do que no caso de ser distribuído por poros de maior diâmetro médio.

No que se refere ao pó ZnO-1, este é o pó precipitado com maior volume total de poros, aproximadamente $0.1 \text{ cm}^3/\text{g}$, valor este que é superior ao dobro do valor registado para os restantes pós. Porém a curva de distribuição bimodal deste pó evidencia uma forte contribuição de poros de tamanho médio, aproximadamente 20 nm, que é significativamente superior ao observado nos restantes casos. A área superficial

específica do pó ZnO-1 é de 22 m²/g. Este valor é relativamente próximo do valor medido para o ZnO-C embora a porosidade total deste último seja muito inferior à de ZnO-1. A proximidade dos valores em questão é justificada pelas diferentes distribuições de tamanho de poro: um menor volume total de poros distribuído, quase exclusivamente, por poros muito finos, no caso de ZnO-C, assegura-lhe uma área superficial específica comparável à de ZnO-1.

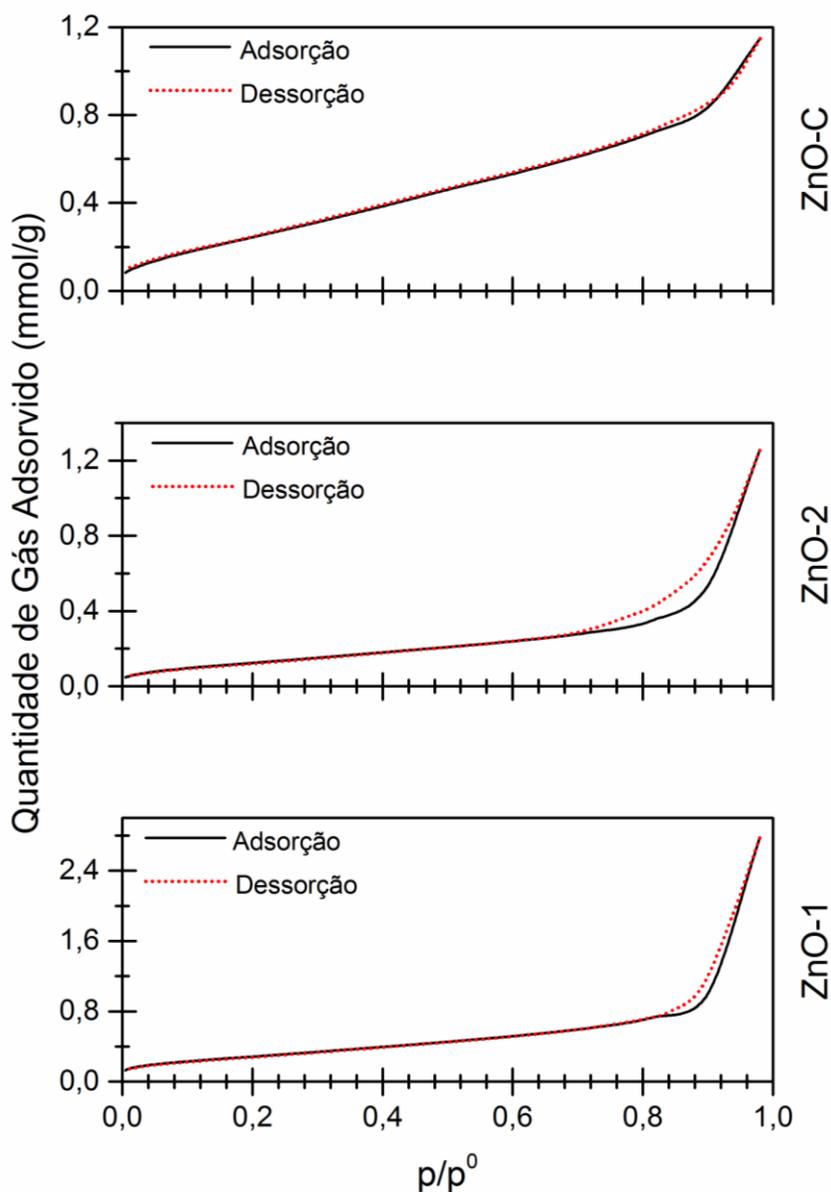


Figura 33 - Isotérmica de adsorção/dessorção de BET dos pós precipitados (ZnO-1 e ZnO-2) e comerciais (ZnO-C) de óxido de zinco.

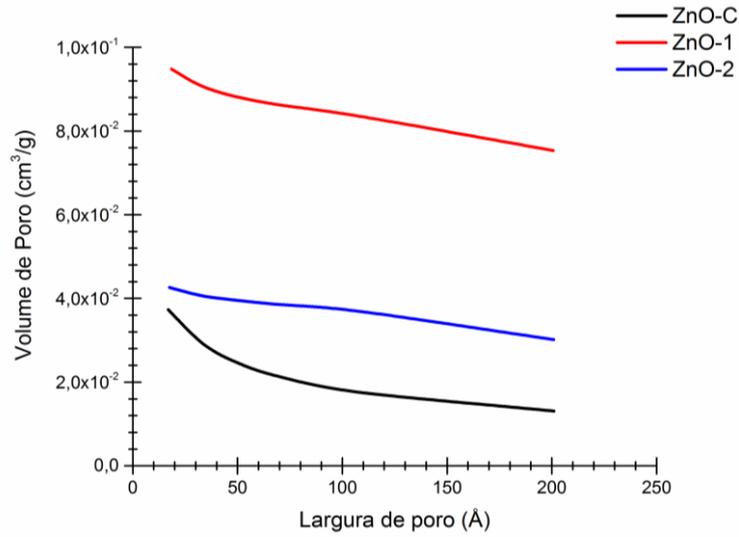


Figura 34 - Curvas cumulativas do volume de poro dos pós precipitados de ZnO-1 e ZnO-2 e comerciais de óxido de zinco.

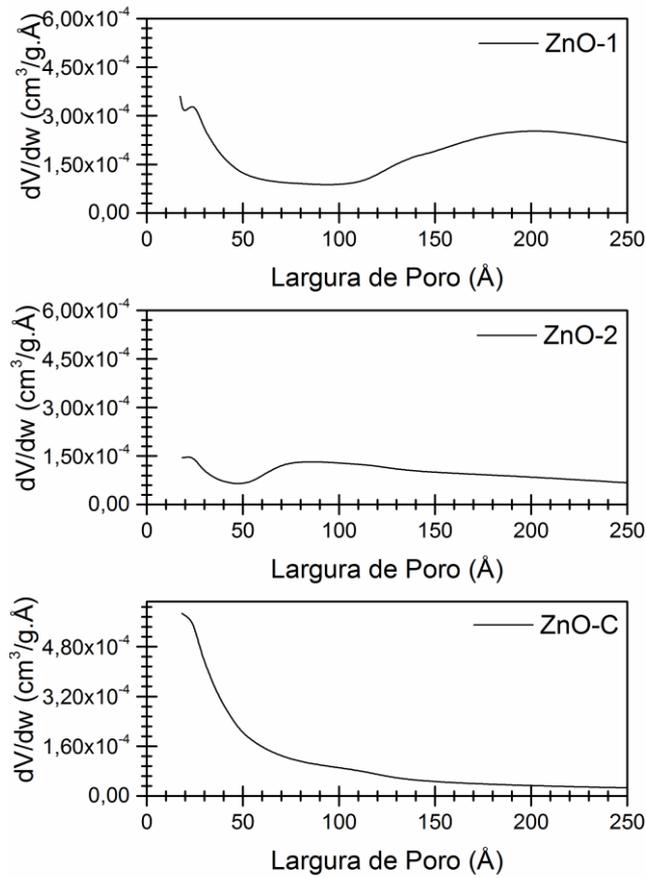


Figura 35 – Curvas de distribuição de tamanho de poro dos pós precipitados ZnO-1 e ZnO-2 e comerciais ZnO-C de óxido de zinco.

Tendo em conta os valores de área superficial específica, obtidos pelo método de BET, e assumindo as partículas dos pós de ZnO como esféricas, foi calculado o diâmetro esférico equivalente, obtendo-se os valores de 48, 108 e 55 nm, para os pós ZnO-1, ZnO-2 e ZnO-C, respectivamente (tabela 6). Este resultado significa que apesar de as partículas precipitadas apresentarem um diâmetro médio de partícula que excede o limite indicado na literatura para serem consideradas partículas nanométricas (100 nm) [49], o valor do diâmetro esférico equivalente, calculado com base na área superficial específica destas partículas, situa-se abaixo ou próximo desse limiar, podendo assim classificar estas partículas como partículas nanoestruturadas.

Na tabela 5 estão sumarizadas algumas características das nanopartículas em análise (ZnO-1, ZnO-2 e ZnO-C).

Tabela 5 - Algumas características dos pós comerciais (ZnO-C) e precipitados (ZnO-1 e ZnO-2).

Pó	Tamanho de Cristalite (nm)	Área Superficial Específica (m ² /g)	Diâmetro Esférico Equivalente da Partícula(nm)
ZnO-1	28	22	48
ZnO-2	24	10	108
ZnO-C	122	20	55

É reportado na literatura que nanopartículas de óxido de zinco, sintetizadas por precipitação química apresentaram valores de área superficial específica de 21 m²/g, valores muito semelhantes aos obtidos para as nanopartículas ZnO-1, sintetizadas no âmbito desta dissertação [108]. Além disso, em outros estudos, é reportado que foram sintetizadas nanoesferas de ZnO mesoporosas, com o objectivo de serem usadas como transportadoras de fármacos, com valores de área superficial de 17 m²/g, valores semelhantes aos obtidos nas nanopartículas ZnO-1 sintetizadas nesta dissertação, e isotérmicas de adsorção/dessorção do tipo IV, tal como as apresentadas pelas nanopartículas sintetizadas nesta dissertação [109].

Como conclusão final da presente secção, pode-se assumir que a manipulação da composição química do meio de precipitação através da variação da quantidade de reagentes permite o controlo da morfologia do precipitado obtido (forma, tamanho, área superficial específica, etc.), mantendo a sua pureza e composição.

4.1.4. Potencial Zeta

Na figura 36 são apresentadas as curvas de potencial zeta dos pós precipitados (ZnO-1 e ZnO-2) e comerciais (ZnO-C) de óxido de zinco.

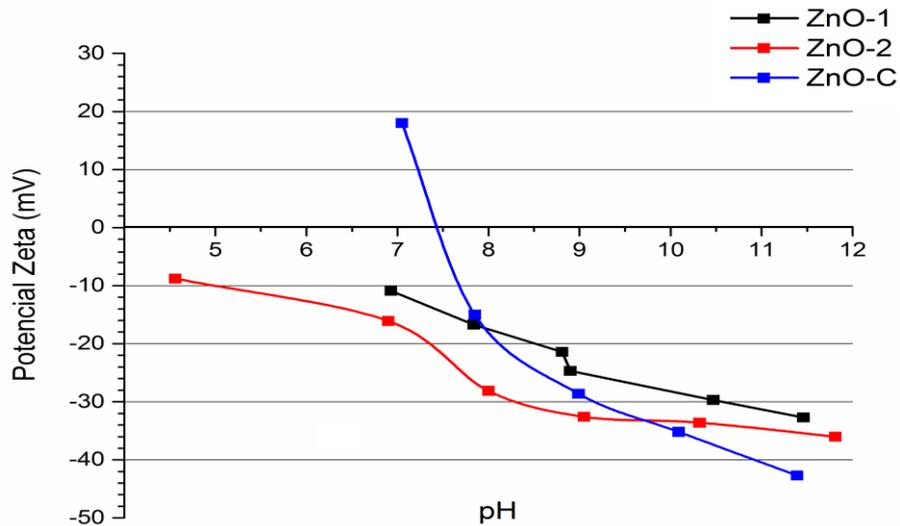


Figura 36 - Curvas de potencial zeta dos pós precipitados (ZnO-1 e ZnO-2) e dos pós comerciais (ZnO-C) de óxido de zinco.

De uma forma geral são evidentes as diferenças nas características de superfície entre todos os pós de óxido de zinco, quer precipitados quer comerciais, traduzidas pelas diferenças de carga eléctrica superficial que cada tipo do pó apresenta. Analisando as curvas correspondentes aos pós de ZnO precipitados podemos verificar que estes apresentam uma carga eléctrica de superfície sempre negativa, sendo que os pós ZnO-2 apresentam uma eletronegatividade mais acentuada quando comparados com os pós ZnO-1. No entanto essa diferença é atenuada para os valores de pH mais baixos e mais elevados. Tendo em conta que a eletronegatividade da superfície está relacionada com os defeitos presentes à superfície de um material, pela análise das curvas de potencial zeta podemos afirmar que os pós precipitados ZnO-2 possuem uma quantidade de defeitos significativamente superior à dos pós precipitados ZnO-1. Essa diferença nas características de superfície de cada material pode ser explicada pelas diferenças no processo de síntese de cada tipo de pó precipitado, que, tal como já foi referido anteriormente, residiu no uso de superiores concentrações de reagentes na síntese dos pós ZnO-2, quando comparados com os pós de ZnO-1.

É reportado na literatura que os defeitos superficiais mencionados provavelmente se devam a lacunas de iões oxigénio, o que vai levar a que as ligações químicas à superfície do material não estejam todas preenchidas, originando carga elétrica à superfície da partícula [110].

Da análise da curva de potencial zeta correspondente aos pós de óxido de zinco comerciais podemos verificar que este material apresenta um ponto isoelétrico para o valor de pH de aproximadamente 7.5. Abaixo deste valor de pH, a superfície das partículas de ZnO-C apresenta uma carga elétrica positiva, e acima desse valor a superfície das partículas apresenta uma carga elétrica negativa. Esta diferença de comportamento das partículas de ZnO-C, quando comparadas com as partículas dos pós precipitados pode ser justificada pelos métodos de síntese, uma vez que as partículas de óxido de zinco comerciais são sintetizadas por métodos diferentes das partículas de óxido de zinco precipitadas.

Em estudos reportados na literatura, partículas sintetizadas pelo mesmo método utilizado neste estudo (precipitação química), apresentam curvas de potencial zeta semelhantes às obtidas no decorrer desta dissertação. As nanopartículas analisadas nos estudos reportados na literatura, à semelhança das sintetizadas neste estudo, apresentam uma carga de superfície sempre negativa, e também numa gama de 0 a -40 mV, ou seja, com valores de carga de superfície muito semelhantes aos obtidos ao longo desta dissertação [108].

4.2. Caracterização do Poliuretano

A caracterização de um material é de extrema importância na área biomédica. O facto de um material ter como finalidade o contacto com o corpo humano torna necessário o conhecimento e a compreensão da forma como o material reage ao contacto com o organismo, e ao mesmo tempo o modo como o próprio organismo reage ao contacto com o material, de forma a evitar a possível ocorrência de complicações desnecessárias resultantes da falta de conhecimento acerca das características do material, como por exemplo a rejeição do material pelo próprio organismo.

Apesar de aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), o poliuretano *Tecoflex*® SG80A, utilizado neste estudo, foi avaliado em termos da sua estrutura e propriedades, para possibilitar a previsão do seu comportamento quer *in vitro* quer *in vivo*.

Na figura 37 é apresentado um difratograma de raios X de um filme de poliuretano puro (C0). Como é possível observar, esta membrana apresenta uma estrutura essencialmente amorfa que é característica do poliuretano.

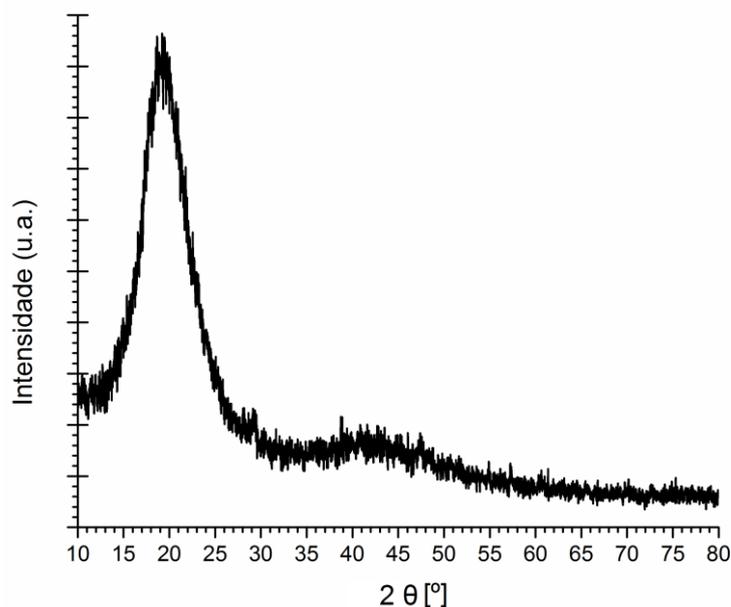


Figura 37 - Difratograma de raios X da membrana de poliuretano puro.

Macroscopicamente, os filmes de poliuretano puro, que foram preparados no âmbito do presente trabalho, apresentam-se como uma membrana flexível, transparente, uniforme e homogénea, com um formato circular, que é o formato do frasco onde foram conformados (Figura 38(a)). Quando observados ao microscópio electrónico de varrimento (SEM) (Figura 38(b)), estes filmes apresentam-se com superfície uniforme, denotando-se somente algumas fissuras, que provavelmente resultam do processo de secagem.

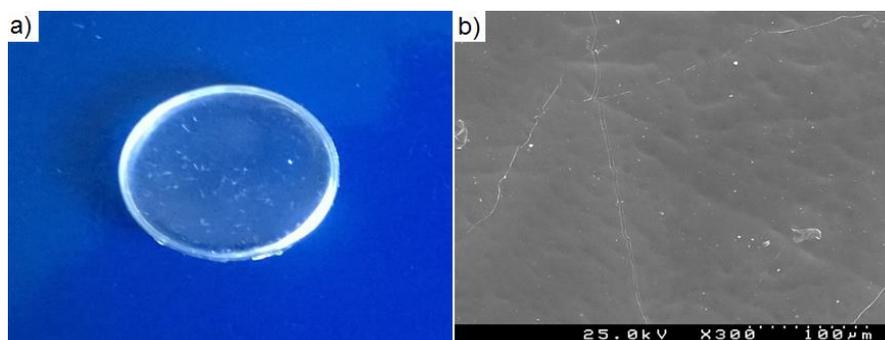


Figura 38 - Fotografia da membrana de poliuretano puro (a), evidenciando o seu aspecto macroscópico, e micrografia do mesmo filme (b), ilustrando o seu aspecto microestrutural, obtida por SEM.

4.3. Caracterização dos compósitos PU/npZnO

Na figura 39 podem ser observados os compósitos preparados durante este estudo com diferentes teores de óxido de zinco. Os compósitos utilizados neste estudo, preparados com um teor de óxido de zinco de 30% (massa de óxido de zinco/massa total do compósito), foram denominados de CC-30, CP1-30 e CP2-30, de acordo com o tipo de óxido de zinco utilizado na sua preparação (ZnO-C, ZnO-1 e ZnO-2, respectivamente). A membrana de poliuretano puro foi denominada de C0. As características das membranas preparadas com os pós ZnO-2, não ilustradas na figura, são semelhantes às das membranas CP1-30, que podem ser observadas na figura 39.

Macroscopicamente e consoante a percentagem de nanopartículas de óxido de zinco usadas e o tipo de pó usado na sua preparação (comercial ou precipitado), os compósitos apresentam características diferentes, nomeadamente a opacidade. Enquanto as membranas de poliuretano puro são completamente transparentes (figura 39), as membranas dos compósitos apresentam-se opacas e com uma tonalidade branca tendo em conta o seu teor em óxido de zinco.



Figura 39 - Fotografia dos vários tipos de compósitos preparados ao longo deste projeto com os pós de óxido de zinco precipitados (CP1-30) e com os pós de óxido de zinco adquiridos comercialmente (CC-30), e o filme de poliuretano puro (C0).

Na figura 40 apresentam-se os difratogramas dos compósitos preparados com os pós precipitados (ZnO-1 e ZnO-2) e com os pós comerciais (ZnO-C) de óxido de zinco.

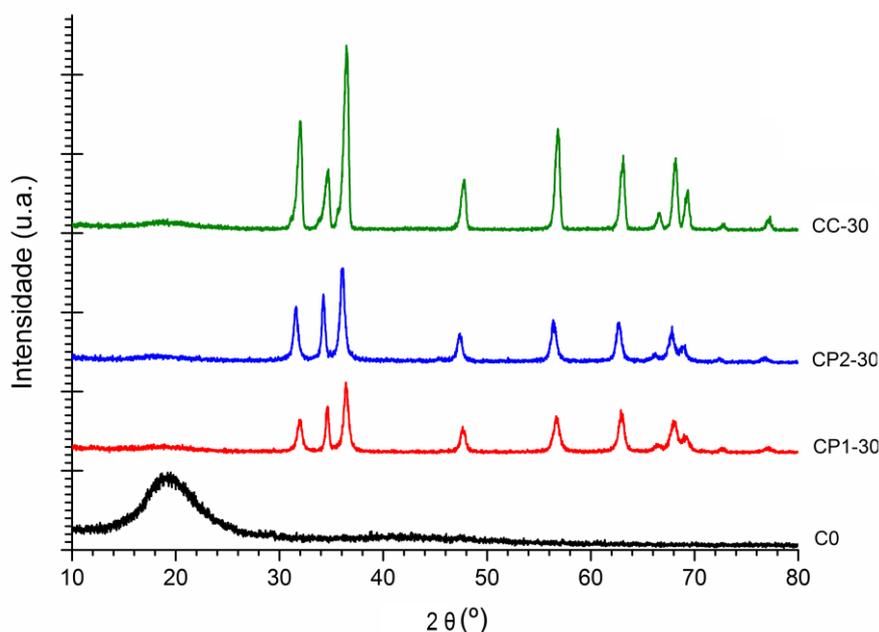


Figura 40 - Difratoograma de raios X da membrana de poliuretano puro e dos compósitos de PU/npZnO.

Os compósitos de poliuretano e óxido de zinco apresentam um difratograma com características semelhantes às do difratograma dos pós de ZnO usados na sua preparação, em que se identificam claramente os picos correspondentes ao óxido de zinco. Por outro lado, na região em torno de $2\theta=20^\circ$ detecta-se uma certa elevação da linha de base, o que denuncia a presença do poliuretano. A razão pela qual o difratograma dos materiais compósitos é praticamente igual aos difratogramas dos pós de óxido de zinco deve-se à elevada percentagem (30 wt%) de óxido de zinco que mascara as características do difratograma do polímero, ressaltando essencialmente as características do difratograma do material inorgânico.

4.4. Estudo das propriedades antibacterianas

Os ensaios bacterianos foram realizados primeiramente com os pós ZnO-1, ZnO-2 e ZnO-C, e de seguida com os compósitos CP1, CP2, CC e com a membrana de poliuretano puro. No caso dos compósitos, foram utilizados os compósitos com um teor de óxido de zinco de 30%. Estes compósitos foram seleccionados uma vez que já haviam sido testadas, em trabalhos anteriormente realizados no Departamento de Engenharia de Materiais e Cerâmica da Universidade de Aveiro (DEMaC), as propriedades antibacterianas de compósitos com um teor de óxido de zinco inferior a 30%, tendo-se

verificado, nesse caso, a ausência de comportamento antibacteriano, quando testados pelo mesmo método usado neste estudo (ASTM 2149) [23].

4.4.1. Comportamento antibacteriano das nanopartículas de Óxido de Zinco

Dado que, na literatura, não foi encontrada informação sobre concentração mínima a partir da qual começam a ser notados os efeitos antibacterianos do óxido, optou-se por iniciar os ensaios com uma concentração de 1mg/ml e testar concentrações sucessivamente crescentes até se obter uma elevada redução da viabilidade bacteriana.

Nos ensaios com os pós de óxido de zinco precipitados (ZnO-1 e ZnO-2) e comerciais (ZnO-C) testaram-se assim as concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 mg/ml (massa de ZnO/volume de suspensão bacteriana) para conseguir avaliar as diferenças nas propriedades antibacterianas entre os diferentes pós.

Na figura 41 é apresentado o conjunto global de resultados desse ensaio, resultados esses que são apresentados caso a caso nas figuras 42 a 46, consoante a concentração de pó de óxido de zinco usada no ensaio. A partir da figura 41 podemos observar que o pó ZnO-C não apresenta resultados globalmente consistentes, quando comparado com os restantes pós testados (pós precipitados): estes, a partir da concentração de 10 mg/ml (massa de pó/volume de suspensão bacteriana), demonstram denotada actividade antibacteriana, chegando mesmo a aproximar-se de uma redução da viabilidade bacteriana total para concentrações de pó mais altas, comportamento este não observado no pó ZnO-C.

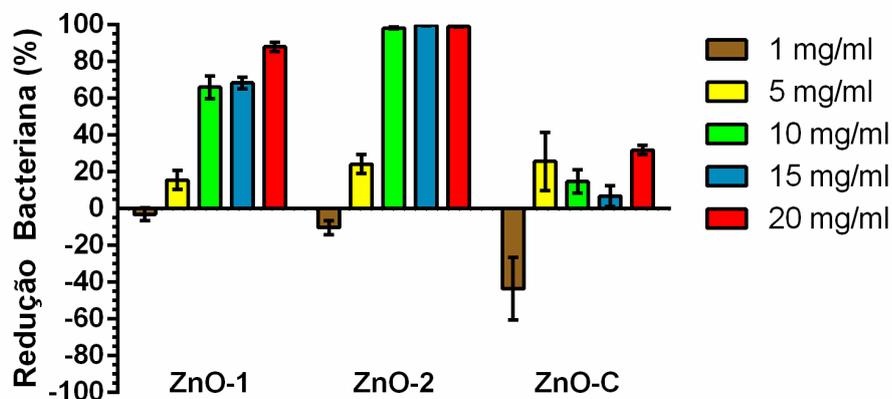


Figura 41 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana com os pós de óxido de zinco.

Como se pode verificar, para a concentração de 1 mg/ml (Figura 42) não foi verificada redução da viabilidade bacteriana para nenhum dos materiais testados. No caso dos pós ZnO-C verificou-se mesmo um significativo aumento da viabilidade bacteriana, o que sugere que, de alguma forma, este material pode induzir a divisão celular.

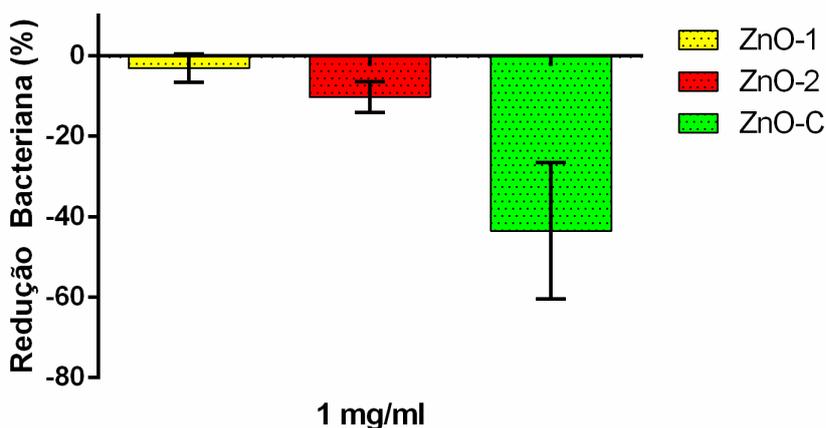


Figura 42 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, efectuados com os pós de ZnO, usando uma concentração de 1 mg/ml.

Para a concentração de 5 mg/ml (figura 43), podemos verificar que os pós ZnO-1 induzem alguma redução da viabilidade bacteriana, que ronda os 13%, ao passo que, para os pós ZnO-2 e ZnO-C, a redução bacteriana atinge os valores de 24% e 26%, respectivamente. No entanto, e tendo em conta o erro associado a este tipo de ensaio, as diferenças entre os resultados obtidos para os diferentes pós não são significativas.

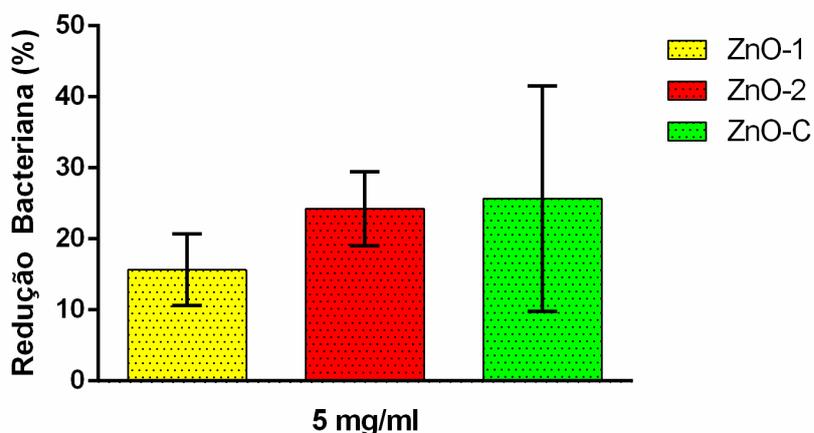


Figura 43 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, efectuados com os pós de ZnO, usando uma concentração de 5 mg/ml.

No caso da concentração de 10 mg/ml (figura 44), observa-se que os efeitos antibacterianos das amostras de pós precipitados são superiores aos do pó comercial, conseguindo-se uma redução da viabilidade bacteriana de, aproximadamente, 66% e 98% para os pós de ZnO-1 e ZnO-2, respectivamente; o pó ZnO-C, para esta concentração, evidencia apenas uma redução da viabilidade bacteriana de 14%.

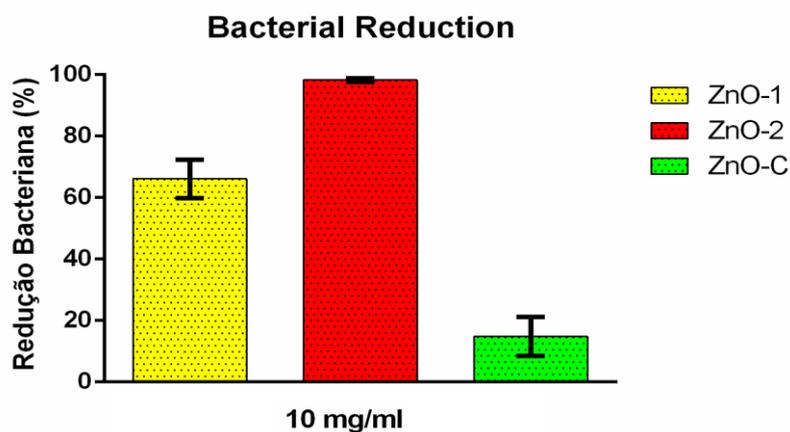


Figura 44 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, efectuados com os pós de ZnO, usando uma concentração de 10 mg/ml.

Com o aumento da concentração de pó para 15 mg/ml (figura 45), os pós ZnO-1 e ZnO-2 revelaram um comportamento antibacteriano acentuado, ainda que com uma significativa diferença entre eles, conseguindo-se uma redução da viabilidade bacteriana de aproximadamente 68% e 99%, respectivamente. Quanto ao pó ZnO-C, proporcionou uma redução da viabilidade bacteriana de apenas 6%, valor claramente inferior aos obtidos com os restantes pós e para concentrações mais baixas do mesmo pó.

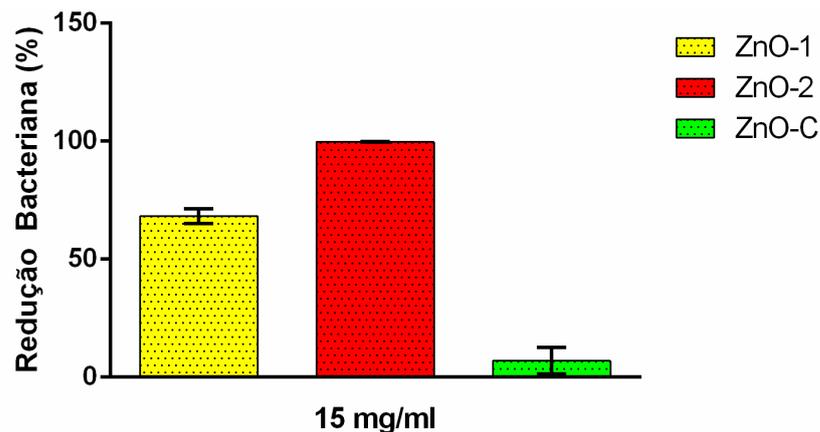


Figura 45 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os pós, usando uma concentração de 15 mg/ml.

Os resultados obtidos para o valor máximo da concentração testada, 20 mg/ml, apresentam-se na figura 46. Observa-se que os pós precipitados propiciam uma redução da viabilidade bacteriana quase total, atingindo os valores de 88%, para o ZnO-1, e de 99%, para o ZnO-2. O comportamento do pó ZnO-C traduz-se por uma redução da viabilidade bacteriana de somente 31%.

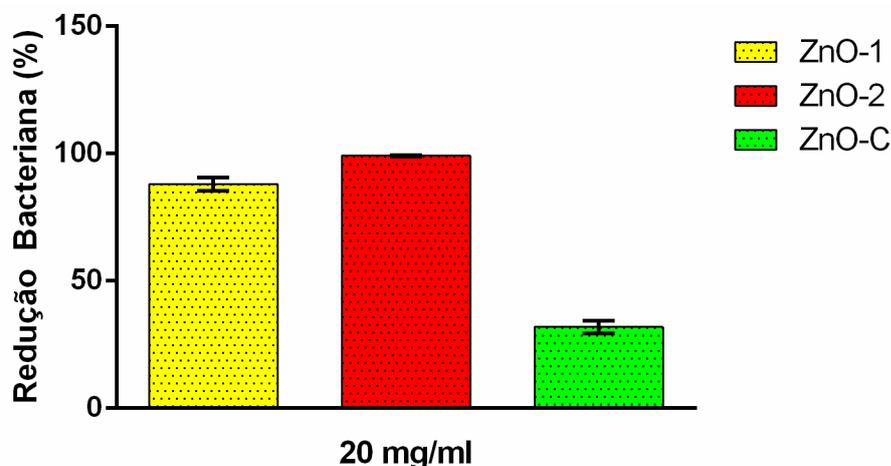


Figura 46 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os pós, usando uma concentração de 20 mg/ml.

No que se refere à concentração de 1 mg/ml, é evidenciada uma indução da proliferação bacteriana (figura 42). Os resultados obtidos suportam a ideia de que possa ter ocorrido uma ligeira dissolução das nanopartículas de ZnO, libertando íons zinco (Zn^{2+}) para o meio do ensaio que, existindo em baixa concentração, tenham possivelmente atuado como nutriente para as bactérias levando à sua proliferação [72].

Os resultados, obtidos para concentrações superiores de 5, 10, 15 e 20 mg/ml, indicam que os pós precipitados possuem um acentuado comportamento antibacteriano, verificando-se que os pós precipitados ZnO-2 começam a manifestar esse comportamento a concentrações mais baixas, quando comparado com os pós ZnO-1. Quanto aos pós comerciais, os resultados sugerem que este pó possui características antibacterianas menos acentuadas, relativamente à bactéria *E. Coli*, do que os restantes pós.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios para determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os pós de óxido de zinco, podemos afirmar que o comportamento antibacteriano dos pós de ZnO precipitados é dependente da concentração de pó usada no ensaio, sendo tanto mais acentuado quanto maior for a concentração, o que é evidenciado pela diminuição da viabilidade bacteriana com o aumento progressivo da concentração de pó testada. Este comportamento é suportado por resultados reportados na literatura, onde também são reportados resultados de ensaios para determinação da viabilidade bacteriana usando nanopartículas de óxido de zinco, em concentrações de 0.1 e 0.25 g/l, em estirpes de *E. Coli*., resultados esses que apresentam uma forte dependência da redução da viabilidade bacteriana na concentração das nanopartículas de óxido de zinco, ou seja, com o aumento da concentração de nanopartículas se verifica uma diminuição da viabilidade bacteriana [111].

Os resultados dos ensaios para determinação da viabilidade bacteriana mostram ainda que os pós ZnO-2, que apresentam uma área superficial específica (SSA) de 10 m²/g, o menor valor de SSA de todos os pós em teste, e menor tamanho médio de partícula (2 µm), são os que evidenciam o comportamento antibacteriano mais acentuado, para o mesmo valor de concentração de pó em teste (10, 15 e 20 mg/ml), quando comparados com os restantes pós de óxido de zinco, que apresentam valores de SSA mais elevados. Estes resultados contrariam o que é reportado por *Padmavathy et al.*, que afirmam que o comportamento antibacteriano das nanopartículas de ZnO é tanto mais acentuado quanto maior for o seu valor de área superficial específica (SSA), uma vez que maiores valores de SSA traduzem-se em maior produção de espécies reativas de oxigénio, que por sua vez levam ao aumento do stress oxidativo e consequente morte celular [72]. É possível que os pós ZnO-2, apesar de serem os que apresentaram menor valor de área superficial específica, tenham apresentado o maior potencial antibacteriano devido às suas características superficiais. Ou seja, embora o valor de área superficial específica seja inferior, esta superfície pode conter mais defeitos, quando comparada com a superfície dos restantes pós de ZnO testados. E como é sabido, a produção de

espécies reativas de oxigénio, por parte das partículas de óxido de zinco, envolve a formação de radicais livres por interação da radiação UV/Visível com a superfície das partículas, ou mesmo a participação de lacunas de iões oxigénio da superfície em interações com as moléculas de água do meio, dando início à formação de ROS [72]. Os resultados de potencial zeta, mostraram que os pós ZnO-2 foram os que se apresentaram mais eletronegativos, quando comparados com os restantes pós analisados (ZnO-1 e ZnO-C), o que indicia que estes pós apresentam um estado químico de superfície diferente. Estes resultados de potencial zeta podem pois suportar a hipótese de ROS originadas a partir de defeitos de superfície serem responsáveis pelo efeito antibacteriano do óxido de zinco, indicando, no caso das partículas de ZnO-2, a existência de uma superfície mais propensa à produção de espécies reativas de oxigénio, que origine uma acrescida redução da viabilidade celular. Novos estudos de caracterização, como a da quantificação da produção de espécies reativas de oxigénio são necessários para corroborar que a produção de ROS está efetivamente na origem do comportamento antibacteriano do óxido de zinco usado neste estudo.

4.4.2. Comportamento antibacteriano dos compósitos PU/npZnO

Nos ensaios com os compósitos de poliuretano e nanopartículas de óxido de zinco optou-se por se iniciar os ensaios usando uma concentração de compósitos de 20mg/ml (massa de compósito/volume de suspensão de bactérias) e testar concentrações sucessivamente crescentes até se obter uma elevada redução da viabilidade bacteriana. Foi seleccionada esta concentração dado que no compósito as partículas de óxido de zinco estão dispersas numa matriz de poliuretano que pode atenuar os efeitos do óxido de zinco. Selecionou-se assim a concentração de 20 mg/ml que foi a concentração para a qual se registou o comportamento antibacteriano mais acentuado do pó de óxido de zinco.

Os ensaios foram realizados com compósitos (CP1-30, CP2-30, CC-30) e com uma membrana de poliuretano puro. As concentrações testadas foram de 20, 40 e 60 mg/ml de compósito. Na figura 47 são apresentados o conjunto global de resultados desse ensaio, resultados esses que serão apresentados caso a caso nas figuras 48 a 50, consoante a concentração de compósito usada no ensaio. A partir da figura 47 podemos desde já observar que o compósito CC-30 não apresentou comportamento

antibacteriano, para todas as concentrações testadas. A membrana de poliuretano puro (C0) apresentou um ligeiro incremento do comportamento antibacteriano com o aumento da concentração de membrana utilizada no ensaio. Os compósitos preparados com os pós precipitados apresentaram um comportamento antibacteriano acentuado, especialmente nos ensaios em que se usou uma concentração de 60 mg/ml.

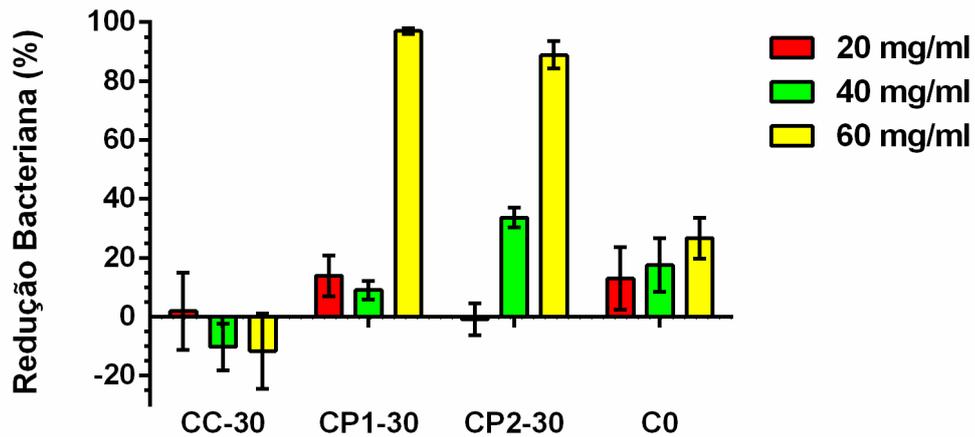


Figura 47 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos de poliuretano e óxido de zinco.

Como se pode verificar, para os ensaios com uma concentração de 20 mg/ml de compósito (figura 48) não foi observada uma significativa redução da viabilidade bacteriana, à excepção dos compósitos preparados com os pós ZnO-1 (CP1-30), para os quais se verificou um valor de aproximadamente 6%, valor este muito próximo do valor também exibido pela membrana de poliuretano puro.

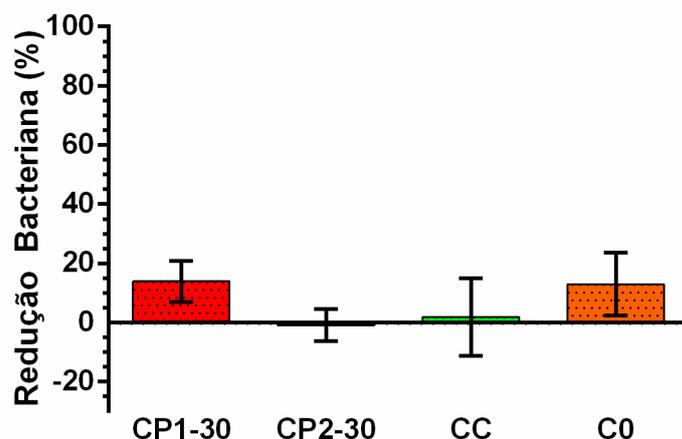


Figura 48 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos, usando uma concentração de 20 mg/ml.

Para a concentração de 40 mg/ml (figura 49), podemos observar que os compósitos preparados com os pós ZnO-C (CC-30) não evidenciam qualquer redução da viabilidade bacteriana ao passo que os compósitos preparados com os pós ZnO-1 (CP1-30) evidenciam uma atenuação da viabilidade bacteriana de aproximadamente 9% e os compósitos sintetizados com os pós ZnO-2 (CP2-30) uma atenuação de aproximadamente 33%; o valor atingido para a membrana de poliuretano puro (C0) foi de aproximadamente 17%.

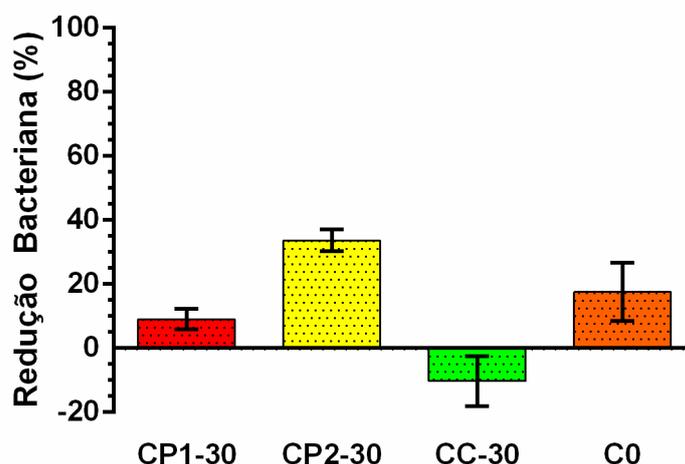


Figura 49 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos, usando uma concentração de 40 mg/ml.

Com o aumento da concentração para o valor máximo testado (60 mg/ml) (figura 50), os compósitos preparados com os pós precipitados atingiram uma redução da

viabilidade bacteriana quase total, apresentando valores de 96% e 88%, para CP1-30 e para CP2-30, respectivamente. Os compósitos preparados com os pós ZnO-C continuam sem apresentar qualquer actividade antimicrobiana. A membrana de poliuretano puro (C0) atingiu uma redução da viabilidade bacteriana de 26%.

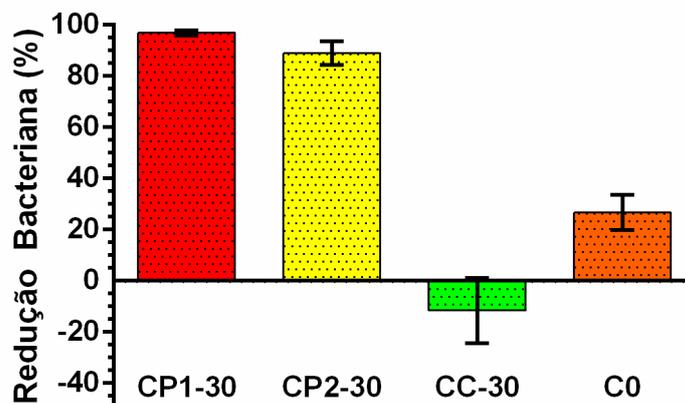


Figura 50 - Resultados dos ensaios de determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos, usando uma concentração de 60 mg/ml.

Tendo em conta estes resultados, pode afirmar-se que o facto de as partículas de óxido de zinco estarem envolvidas por um polímero, neste caso o poliuretano, atenua os efeitos antibacterianos do óxido de zinco dado que foi necessário aumentar significativamente a concentração de material no ensaio (20 mg/ml para os ensaios com os pós, comparado com 60 mg/ml nos ensaios com os compósitos) para se conseguir obter um efeito antibacteriano semelhante. Sugere-se que este efeito se deva ao envolvimento das nanopartículas pelo polímero, o que vai limitar a exposição das nanopartículas, com consequente limitação dos mecanismos de ação antibacteriana destas partículas.

Com base nos resultados obtidos nos ensaios para determinação da redução da viabilidade bacteriana, com os compósitos PU/npZnO, podemos afirmar que o comportamento antibacteriano dos compósitos preparados com os pós de ZnO precipitados (CP1-30 e CP2-30), à semelhança do observado com os ensaios realizados com os pós de ZnO, é dependente da concentração de compósito usada no ensaio e é tanto mais acentuado quanto maior for essa concentração. É de salientar que os compósitos CP2-30 apresentaram comportamento antibacteriano acentuado a concentrações mais baixas, quando comparados com os compósitos CP1-30. A justificação para estes resultados tem como base a mesma justificação dos comportamentos antibacterianos apresentados pelos pós de ZnO. Uma vez que, tal como

já foi referido, os pós de ZnO-2, que apresentam uma superfície com mais defeitos, podem propiciar de forma mais acentuada a formação de ROS, é natural que o mecanismo do comportamento antibacteriano dos compósitos CP2-30, que foram preparados com os pós ZnO-2, seja semelhante ao dos pós ZnO-2, tendo por base a ideia de que as espécies reativas de oxigênio são potencialmente responsáveis pelo efeito biocida apresentado pelos compósitos CP2-30.

Por fim, é ainda surpreendente observar que a membrana de poliuretano puro apresenta propriedades antibacterianas, resultado que contraria alguns estudos existentes na literatura onde a membrana de poliuretano fomentou a proliferação celular [23], [24]. Futuros estudos antibacterianos com membranas preparadas com diferentes tipos de poliuretano serão necessários a fim de melhor compreender este comportamento do polímero.

Na literatura não são reportados estudos de propriedades antibacterianas com óxido de zinco e poliuretano. No entanto é reportado um estudo onde os autores estudaram as propriedades antibacterianas de um compósito de óxido de zinco e poliéster, em bactérias *E. Coli*, e reportam que o comportamento antibacteriano do compósito se acentua com o aumento do teor de óxido de zinco no compósito [112]. Contudo na literatura não são reportados estudos em que a concentração de material compósito em teste seja analisada, impossibilitando assim ter um termo comparativo com os resultados obtidos nesta dissertação.

Capítulo 5

Conclusões e Futuros Desenvolvimentos

5. Conclusões e Futuros Desenvolvimentos

O presente estudo focou-se nas propriedades antibacterianas de nanoestruturas de óxido de zinco e de compósitos de poliuretano e nanopartículas de óxido de zinco. O óxido de zinco apresenta-se como um material polivalente adequado a várias aplicações na área biomédica, não só graças às suas propriedades eléctricas (como por exemplo sensor de gás), mas também graças às suas propriedades antibacterianas e citotóxicas. Contudo os mecanismos de ação do comportamento antibacteriano destas nanoestruturas e das suas capacidades citotóxicas ainda não estão completamente estudados. Uma forma de controlar esse comportamento é o envolvimento das nanopartículas de óxido de zinco numa matriz polimérica, como por exemplo o poliuretano, dando origem aos compósitos de poliuretano e nanopartículas de óxido de zinco.

Com este objectivo sintetizaram-se nanopartículas de óxido de zinco pelo método de precipitação química. Através da cuidadosa manipulação das condições experimentais (concentração de reagentes e pH do meio) conseguiram-se obter dois tipos de nanopartículas de óxido de zinco precipitadas (ZnO-1 e ZnO-2) com diferentes características, nomeadamente tamanho médio de partícula, área superficial específica (ZnO-1 apresentou uma área superficial específica de $22\text{m}^2/\text{g}$ e o ZnO-2 de $10\text{m}^2/\text{g}$) e morfologias diferentes (ZnO-1 apresentou-se como uma flor esférica nanoestruturada e o ZnO-2 como uma esfera nanoestruturada). Ambos os tipos de nanopartículas precipitadas resultam do aglomerar de placas de tamanhos nanométricos (ZnO-1 apresentou placas com uma espessura média de 42 nm e ZnO-2 apresentou placas com uma espessura média de 27 nm). Quando comparadas com as nanopartículas de óxido de zinco comerciais, as nanopartículas ZnO-1 apresentaram uma área superficial específica superior, menor cristalinidade e tamanho médio de partícula inferior e as nanopartículas ZnO-2 apresentaram uma área superficial específica inferior, cristalinidade inferior e um tamanho médio de partícula superior.

Foram ainda preparados compósitos de poliuretano e nanopartículas de óxido de zinco, quer com os pós de ZnO precipitados, quer com os pós comerciais, e com teores de óxido de zinco de 30% (massa de óxido de zinco/massa total de compósito).

Os estudos para determinação da viabilidade bacteriana, realizados com a estirpe bacteriana *Escherichia Coli* ATCC 25922, permitiram avaliar qualitativamente as capacidades antibacterianas dos pós precipitados e dos pós comerciais de ZnO, bem

como dos compósitos PU/npZnO preparados com um teor de ZnO de 30%. Com estes ensaios pudemos concluir que as propriedades antibacterianas do ZnO e dos compósitos são efectivamente dependentes da concentração de material usada no ensaio (massa de material/volume da suspensão de bactérias), que para elevadas concentrações de material se consegue uma praticamente total redução da viabilidade bacteriana e que para concentrações muito diminutas de material propiciam a proliferação bacteriana. Podemos ainda concluir que os resultados obtidos nos ensaios para determinação da redução da viabilidade bacteriana suportam a teoria de que a produção de espécies reativas de oxigénio é o mecanismo responsável pelo comportamento antibacteriano dos pós de óxido de zinco. Por fim, verificou-se ainda que o facto de as nanopartículas de ZnO estarem envolvidas numa matriz de poliuretano se traduz num atenuar das capacidades antibacterianas do óxido de zinco.

Trabalho futuro

Os resultados obtidos no presente trabalho remeteram a algumas sugestões para a continuação deste trabalho, bem como ao aprofundamento de certos aspectos no sentido de clarificar certos resultados. Deste modo sugere-se:

- Quantificação das espécies reativas de oxigénio produzidas quer pelas nanopartículas de óxido de zinco, quer pelos compósitos PU/npZnO, de forma a conseguir perceber se a produção de ROS é a justificação dos comportamentos antibacterianos apresentados pelas nanoestruturas e pelos compósitos.
- Realização de análises por microscopia electrónica de varrimento, com vista a avaliar a interação das nanoestruturas de óxido de zinco com a membrana celular.
- Sintetizar nanoestruturas de óxido de zinco com outras morfologias e testar a sua capacidade antibacteriana.
- Realizar ensaios para determinação da viabilidade bacteriana com compósitos PU/npZnO que tenham superiores conteúdos de npZnO.

6. Referências

- [1] S. J. Pearton, D. P. Norton, K. Ip, Y. W. Heo, and T. Steiner, "Recent progress in processing and properties of ZnO," *Superlattices Microstruct.*, vol. 34, pp. 3–32, 2003.
- [2] S. A. Vanalakar, V. L. Patil, N. S. Harale, S. A. Vhanalakar, M. G. Gang, J. Y. Kim, P. S. Patil, and J. H. Kim, "Controlled growth of ZnO nanorod arrays via wet chemical route for NO₂ gas sensor applications," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 221, pp. 1195–1201, 2015.
- [3] M. Gupta, J. He, T. Nguyen, F. Petzold, D. Fonseca, J. B. Jasinski, and M. K. Sunkara, "Nanowire catalysts for ultra-deep hydro-desulfurization and aromatic hydrogenation," *Appl. Catal. B Environ.*, vol. 180, pp. 246–254, 2016.
- [4] S. V. Elangovan, N. Sivakumar, and V. Chandramohan, "Magnesium doped zinc oxide nanocrystals for photo-catalytic applications," *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 26, no. 11, pp. 8753–8759, 2015.
- [5] A. I. Abou-Kandil, A. Awad, and E. Mwafy, "Polymer nanocomposites part 2: Optimization of zinc oxide/high-density polyethylene nanocomposite for ultraviolet radiation shielding," *J. Thermoplast. Compos. Mater.*, vol. 28, no. 11, pp. 1583–1598, Sep. 2014.
- [6] M. Premanathan, K. Karthikeyan, K. Jeyasubramanian, and G. Manivannan, "Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 7, no. 2, pp. 184–192, 2011.
- [7] S.-H. Xie, A.-L. Liu, Y.-Y. Chen, L. Zhang, H.-J. Zhang, B.-X. Jin, W.-H. Lu, X.-Y. Li, and W.-Q. Lu, "The role of Intracellular Redox Imbalance in Nanomaterial Induced Cellular Damage and Genotoxicity: A Review," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 56, pp. 11–124, 2015.
- [8] A. Kumar, A. K. Pandey, S. S. Singh, R. Shanker, and A. Dhawan, "Engineered ZnO and TiO₂ nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 51, no. 10, pp. 1872–1881, 2011.
- [9] M. Hashemi, S. Ghavami, M. Eshraghi, E. P. Booy, and M. Los, "Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 557, no. 1, pp. 9–19, 2007.

- [10] D. Guo, C. Wu, H. Jiang, Q. Li, X. Wang, and B. Chen, "Synergistic cytotoxic effect of different sized ZnO nanoparticles and daunorubicin against leukemia cancer cells under UV irradiation," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 93, no. 3, pp. 119–126, 2008.
- [11] C. F. Klingshirn, "ZnO: Material, physics and applications," *ChemPhysChem*, vol. 8, pp. 782–803, 2007.
- [12] W. H. De Jong and P. J. a Borm, "Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 2, pp. 133–149, 2008.
- [13] S. Plitzko, N. Dziurawitz, C. Thim, C. Asbach, H. Kaminski, M. Voetz, U. Goetz, and D. Dahmann, "Workplace exposure to nanoparticles," 2013.
- [14] M. Ahamed, M. J. Akhtar, M. Raja, I. Ahmad, M. K. J. Siddiqui, M. S. AISalhi, and S. a. Alrokayan, "ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and bax/bcl-2 pathways: Role of oxidative stress," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 7, no. 6, pp. 904–913, 2011.
- [15] J. Li, D. Guo, X. Wang, H. Wang, H. Jiang, and B. Chen, "The Photodynamic Effect of Different Size ZnO Nanoparticles on Cancer Cell Proliferation In Vitro," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 5, no. 6, pp. 1063–1071, 2010.
- [16] C. T. Chalfoun, G. A. Wirth, and G. R. D. Evans, "Tissue engineered nerve constructs: Where do we stand?," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 10, no. 2, pp. 309–317, 2006.
- [17] J. T. Seil and T. J. Webster, "Decreased astroglial cell adhesion and proliferation on zinc oxide nanoparticle polyurethane composites," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 4, pp. 523–531, 2008.
- [18] R. Chandra and R. Rustgi, "Biodegradable Polymers," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 23, no. 97, pp. 1273–1335, 1998.
- [19] K. Gorna and S. Gogolewski, "Preparation, degradation, and calcification of biodegradable polyurethane foams for bone graft substitutes.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 67, pp. 813–827, 2003.
- [20] V. L. Gott, D. E. Alejo, and D. E. Cameron, "Mechanical heart valves: 50 years of evolution.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 76, pp. 2230–2239, 2003.
- [21] B. Saad, T. D. Hirt, M. Welti, G. K. Uhlschmid, P. Neuenschwander, and U. W. Suter, "Development of degradable polyesterurethanes for medical applications: In

- vitro and in vivo evaluations,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 36, pp. 65–74, 1997.
- [22] P. Vermette, H. Griesser, G. Laroche, and R. Guidoin, *Biomedical applications of polyurethanes*. Georgetown, Texas, USA, 2001.
- [23] J. Baltazar and D. Almeida, “O papel antibacteriano das nanoestruturas de óxido de zinco em matrizes de poliuretano,” 2014.
- [24] J. L. Luís, “Compósitos PU / ZnO para aplicações biomédicas,” Universidade de Aveiro, 2011.
- [25] A. Pires, “Sistemas compósitos de PU/ZnO para entrega de fármacos,” Universidade de Aveiro, 2012.
- [26] D. E. A. Seabra, “Estudos de bioatividade de nanoestruturas de óxido de zinco,” Universidade de Aveiro, 2013.
- [27] J. H. Li, R. Y. Hong, M. Y. Li, H. Z. Li, Y. Zheng, and J. Ding, “Effects of ZnO nanoparticles on the mechanical and antibacterial properties of polyurethane coatings,” *Prog. Org. Coatings*, vol. 64, pp. 504–509, 2009.
- [28] P. H. A. of Canada, “Escherichia coli , enterohemorrhagic - Material Safety Data Sheets (MSDS).” pp. 1–6, 2010.
- [29] R. Jayakumar, S. Nanjundan, and M. Prabakaran, “Metal-containing polyurethanes, poly(urethane-urea)s and poly(urethane-ether)s: A review,” *React. Funct. Polym.*, vol. 66, pp. 299–314, 2006.
- [30] B. D. Ulery, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, “Biomedical applications of biodegradable polymers,” *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 49, pp. 832–864, 2011.
- [31] H. B. P. Machado, “Suportes compósitos Poliuretano/HA para aplicações ósseas de longo termo,” University of Aveiro, 2007.
- [32] G. T. Howard, “Biodegradation of polyurethane: A review,” *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 49, no. 4, pp. 245–252, 2002.
- [33] J. Y. Cherng, T. Y. Hou, M. F. Shih, H. Talsma, and W. E. Hennink, “Polyurethane-based drug delivery systems,” *Int. J. Pharm.*, vol. 450, no. 1, pp. 145–162, 2013.
- [34] L. S. Nair and C. T. Laurencin, “Biodegradable polymers as biomaterials,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, pp. 762–798, 2007.

- [35] I. Rehman, E. H. Andrews, and R. Smith, "In vitro degradation of poly(ester-urethanes) for biomedical applications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 17–20, 1996.
- [36] K. Gorna and S. Gogolewski, "Biodegradable polyurethanes for implants. II. In vitro degradation and calcification of materials from poly(epsilon-caprolactone)-poly(ethylene oxide) diols and various chain extenders.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 60, no. 4, pp. 592–606, Jun. 2002.
- [37] Z. L. Wang, "Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 16, pp. R829–R858, 2004.
- [38] S. Xu and Z. L. Wang, "One-Dimensional ZnO Nanostructures: Solution Growth and Functional Properties," *Nano Res.*, vol. 4, no. 11, pp. 1013–1098, 2011.
- [39] Y. Zhang, M. K. Ram, E. K. Stefanakos, and D. Y. Goswami, "Synthesis, characterization, and applications of ZnO nanowires," *J. Nanomater.*, vol. 2012, p. 22, 2012.
- [40] Ü. Özgür, Y. I. Alivov, C. Liu, A. Teke, M. a. Reshchikov, S. Doğan, V. Avrutin, S. J. Cho, and H. Morkoç, "A comprehensive review of ZnO materials and devices," *J. Appl. Phys.*, vol. 98, pp. 1–103, 2005.
- [41] "Systematic Design of Complex Wurtzites and Zinc Blendes." [Online]. Available: <http://www.chemexplore.net/wurtzites.htm>. [Accessed: 18-Nov-2015].
- [42] A. Mills and S. Le Hunte, "An overview of semiconductor photocatalysis," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 108, no. 1, pp. 1–35, 1997.
- [43] C. Richard, F. Bosquet, and J.-F. Pilichowski, "Photocatalytic transformation of aromatic compounds in aqueous zinc oxide suspensions: effect of substrate concentration on the distribution of products," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 108, no. 1, pp. 45–49, 1997.
- [44] O. Yamazaki, T. Mitsuyu, and K. Wasa, "ZnO Thin-Film SAW Devices," *Sonics Ultrason. IEEE Trans.*, vol. 27, no. 6, pp. 369–378, 1980.
- [45] F. S. Hickernell, "Zinc Oxide Films for Acoustoelectric Device Applications," *IEEE Trans. Sonics Ultrason.*, vol. 32, no. 5, pp. 621–629, Sep. 1985.
- [46] A. Hatamie, A. Khan, M. Golabi, A. P. F. Turner, V. Beni, W. C. Mak, A. Sadollahkhani, H. Alnoor, B. Zargar, S. Bano, O. Nur, and M. Willander, "Zinc Oxide Nanostructure-Modified Textile and Its Application to Biosensing,

- Photocatalysis, and as Antibacterial Material,” *Langmuir*, vol. 31, no. 39, pp. 10913–10921, 2015.
- [47] C. Buzea, I. I. Pacheco, and K. Robbie, “Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity.,” *Biointerphases*, vol. 2, no. 4, pp. MR17–R71, 2007.
- [48] A. P. Kumar, D. Depan, N. Singh Tomer, and R. P. Singh, “Nanoscale particles for polymer degradation and stabilization-Trends and future perspectives,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, pp. 479–515, 2009.
- [49] W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke, and Q. Chaudhry, “A complementary definition of nanomaterial,” *Nano Today*, vol. 5, no. 3, pp. 165–168, 2010.
- [50] K. M. Parida, S. S. Dash, and D. P. Das, “Physico-chemical characterization and photocatalytic activity of zinc oxide prepared by various methods,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 298, pp. 787–793, 2006.
- [51] H. Cheng, J. Cheng, Y. Zhang, and Q.-M. Wang, “Large-scale fabrication of ZnO micro and nano-structures by microwave thermal evaporation deposition,” *J. Cryst. Growth*, vol. 299, no. 1, pp. 34–40, 2007.
- [52] S. C. Lyu, Y. Zhang, H. Ruh, H.-J. Lee, H.-W. Shim, E.-K. Suh, and C. J. Lee, “Low temperature growth and photoluminescence of well-aligned zinc oxide nanowires,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 363, pp. 134–138, 2002.
- [53] L. C. Zhang, Y. F. Ruan, D. L. Wang, and C. X. Qiu, “Synthesis and photoluminescence properties of ZnO nanowire arrays,” *Cryst. Res. Technol.*, vol. 46, no. 4, pp. 405–408, 2011.
- [54] X. Y. Ma and W. D. Zhang, “Effects of flower-like ZnO nanowhiskers on the mechanical, thermal and antibacterial properties of waterborne polyurethane,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 94, no. 7, pp. 1103–1109, 2009.
- [55] C. Chen, P. Liu, and C. Lu, “Synthesis and characterization of nano-sized ZnO powders by direct precipitation method,” *Chem. Eng. J.*, vol. 144, no. 3, pp. 509–513, 2008.
- [56] J. W. Rasmussen, E. Martinez, P. Louka, and D. G. Wingett, “Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications,” *Expert Opin Drug Deliv.*, vol. 7, no. 9, pp. 1063–1077, 2010.
- [57] B. Liu and H. C. Zeng, “Hydrothermal synthesis of ZnO nanorods in the diameter regime of 50 nm,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, pp. 4430–4431, 2003.

- [58] N. Heng-Kan, Z. Qiang, F. Xing, W. Sen, W. Hui, and X. Tao, "Production of ZnO Nanobelts and Meso-Scale Study of Mechanical Properties," *Chinese Phys. Lett.*, vol. 27, no. 11, p. 116801, 2010.
- [59] J. Y. Lao, J. Y. Huang, D. Z. Wang, and Z. F. Ren, "ZnO nanobridges and nanonails," *Nano Lett.*, vol. 3, no. 2, pp. 235–238, 2003.
- [60] J. Liu, X. Huang, Y. Li, X. Ji, Z. Li, X. He, and F. Sun, "Vertically Aligned 1D ZnO Nanostructures on Bulk Alloy Substrates: Direct solution Synthesis, Photoluminescence, and Field Emission," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, pp. 4990–4997, 2007.
- [61] Z. L. Wang, X. Y. Kong, and J. M. Zuo, "Induced growth of asymmetric nanocantilever arrays on polar surfaces.," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 91, no. 18, pp. 185502(1–4), 2003.
- [62] L. Yu, F. Qu, and X. Wu, "Facile hydrothermal synthesis of novel ZnO nanocubes," *J. Alloys Compd.*, vol. 504, pp. 1–4, 2010.
- [63] C. Zhu, B. Lu, Q. Su, E. Xie, and W. Lan, "A simple method for the preparation of hollow ZnO nanospheres for use as a high performance photocatalyst," *Nanoscale*, vol. 4, p. 3060, 2012.
- [64] S. M. Lam, J. C. Sin, A. Zuhairi Abdullah, and A. Rahman Mohamed, "Green hydrothermal synthesis of ZnO nanotubes for photocatalytic degradation of methylparaben," *Mater. Lett.*, vol. 93, pp. 423–426, 2013.
- [65] B. Ashe, "A Detail investigation to observe the effect of zinc oxide and Silver nanoparticles in biological system.," National Institute of Technology, 2011.
- [66] O. Yamamoto, "Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide," *Int. J. Inorg. Mater.*, vol. 3, no. 7, pp. 643–646, 2001.
- [67] G. Appierot, A. Lipovsky, R. Dror, N. Perkas, Y. Nitzan, R. Lubart, and A. Gedanken, "Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 6, pp. 842–852, 2009.
- [68] A. Sirelkhatim, S. Mahmud, A. Seenii, N. H. M. Kaus, L. C. Ann, S. K. M. Bakhori, H. Hasan, and D. Mohamad, "Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism," *Nano-Micro Lett.*, vol. 7, no. 3, pp. 219–242, 2015.
- [69] S. Ahmed, M. G. Rasul, W. N. Martens, R. Brown, and M. A. Hashib,

- “Heterogeneous photocatalytic degradation of phenols in wastewater: A review on current status and developments,” *Desalination*, vol. 261, no. 1–2, pp. 3–18, 2010.
- [70] P. J. P. Espitia, N. de F. F. Soares, J. S. dos R. Coimbra, N. J. de Andrade, R. S. Cruz, and E. A. A. Medeiros, “Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 5, no. 5, pp. 1447–1464, 2012.
- [71] O. Seven, B. Dindar, S. Aydemir, D. Metin, M. . Ozinel, and S. Icli, “Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO₂, ZnO and Sahara desert dust,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 165, no. 1–3, pp. 103–107, 2004.
- [72] N. Padmavathy and R. Vijayaraghavan, “Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study,” *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 9, no. 3, pp. 35004–35011, 2008.
- [73] P. Held, “An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells,” Vermont, USA, 2012.
- [74] C. Hanley, A. Thurber, C. Hanna, A. Punnoose, J. Zhang, and D. G. Wingett, “The influences of cell Type and ZnO Nanoparticle Size on Immune Cell Cytotoxicity and Cytokine Induction,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 4, pp. 1409–1420, 2009.
- [75] K. R. Raghupathi, R. T. Koodali, and A. C. Manna, “Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles,” *Langmuir*, vol. 27, no. 7, pp. 4020–4028, 2011.
- [76] R. G. S. V Prasad, D. Basavaraju, and C. Mtcc-, “Nanostructured TiO₂ and TiO₂ - Ag antimicrobial thin films,” *IEEE*, pp. 1–6, 2011.
- [77] L. K. Adams, D. Y. Lyon, and P. J. J. Alvarez, “Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions,” *Water Res.*, vol. 40, no. 19, pp. 3527–3532, 2006.
- [78] R. Brayner, R. Ferrari-Iliou, N. Brivois, S. Djediat, M. F. Benedetti, and F. Fiévet, “Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium,” *Nano Lett.*, vol. 6, no. 4, pp. 866–70, 2006.
- [79] R. Raman, R. G. Thomas, M. W. Weiner, C. R. Jack, K. Ernstrom, P. S. Aisen, P. N. Tariot, and J. F. Quinn, “Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties,” *ACS Nano*, vol. 2, no. 10, pp. 2121–2134, 2008.

- [80] Y. Kim, S. Farrah, and R. H. Baney, "Silanol - A novel class of antimicrobial agent," *Electron. J. Biotechnol.*, vol. 9, no. 2, pp. 176–180, 2006.
- [81] D. P. Jones, "Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance.," *Methods Enzymol.*, vol. 348, pp. 93–112, 2002.
- [82] K. Kowalska, M. Zalewska, and H. Milnerowicz, "The Application of Capillary Electrophoresis in the Determination of Glutathione in Healthy Women ' s Blood," *J. Chromatogr. Sci.*, no. 21, pp. 1–7, 2014.
- [83] M. A. Baker, G. J. Cerniglia, and A. Zaman, "Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples," *Anal. Biochem.*, vol. 190, no. 2, pp. 360–365, Nov. 1990.
- [84] K. W. Ng, S. P. K. Khoo, B. C. Heng, M. I. Setyawati, E. C. Tan, X. Zhao, S. Xiong, W. Fang, D. T. Leong, and J. S. C. Loo, "The role of the tumor suppressor p53 pathway in the cellular DNA damage response to zinc oxide nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 32, no. 32, pp. 8218–8225, 2011.
- [85] C. Hanley, J. Layne, A. Punnoose, K. M. Reddy, I. Coombs, K. Feris, and D. Wingett, "Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles," *Nanotechnology*, vol. 19, no. 29, 2008.
- [86] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. San Diego, California, USA: Academic Press, 1996.
- [87] C. Guo, Z. Zheng, Q. Zhu, and X. Wang, "Preparation and Characterization of Polyurethane/ZnO Nanoparticle Composites," *Polym. Plast. Technol. Eng.*, vol. 46, no. 12, pp. 1161–1166, 2007.
- [88] T. Takada, M. Kiyama, H. Torii, T. Asai, M. Takano, and N. Nakanishi, "Effect of pH Values on the Formation and Solubility of Zinc Compounds," *Bull. Inst. Chem. Res.*, vol. 56, no. 5, pp. 242–246, 1978.
- [89] M. P. Seabra, L. Grave, C. Oliveira, A. Alves, A. Correia, and J. A. Labrincha, "Porcelain stoneware tiles with antimicrobial action," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 4, pp. 6063–6070, 2014.
- [90] A. A. of T. C. and Colorists, "AATCC Test Method 100-1999, Antibacterial finishes on textile materials: Assessement of," in *Technical Manual of the American Association of Textile Chemists and Colorists*, 2003, pp. 149–151.
- [91] A. A. of T. C. and Colorists, "AATCC Test Method 147-1998, Antibacterial activity

- assessment of textile materials: parallel steak method,” in *Technical Manual of the American Association of Textile Chemists and Colorists*, 2003, pp. 261–262.
- [92] “Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers ATCC ® 25922&tra.” [Online]. Available: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/25922.aspx>. [Accessed: 23-Nov-2015].
- [93] L. Pereira, “Produção e caracterização de silício policristalino e sua aplicação a TFTs,” Universidade Nova de Lisboa, 2008.
- [94] B. D. Cullity and S. R. Stock, *Elements of X-Ray Diffraction*, Third Edit. Prentice Hall, 2001.
- [95] C. A. Evans and S. Wilson, *Materials characterization*. London, United Kingdom: Butterworth-Heinemann, 1992.
- [96] Y. Leng, *Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*. Singapore: John Wiley & Sons, 2008.
- [97] P. W. Atkins, *Physical chemistry*, Sixth Edit. Oxford University Press, 1998.
- [98] A. L. Patterson, “The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, no. 10, pp. 978–982, 1939.
- [99] M. Knoll and G. Lubszynski, “Microscopic electron illustration through secondary electrons,” *Phys. Zeitschrift*, vol. 34, pp. 671–674, 1933.
- [100] R. Brundle, C. Evans, and S. Wilson, *Encyclopedia of Materials Characterization – Surfaces, Interfaces and thin films.*, First Edit. London, United Kingdom: Butterworth-Heinemann, 1992.
- [101] K. S. W. Sing, D. H. Everet, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouqueroll, and T. Siemieniewska, “Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 57, no. 4, pp. 603–619, 1985.
- [102] S. Brunauer, P. H. Emmett, and E. Teller, “Adsorption of Gases in Multimolecular Layers,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 60, no. 2, pp. 309–319, Feb. 1938.
- [103] F. Rouquerol, L. Rouquerol, and K. Sing, *Adsorption by Powders and Porous Solids: Principles, Methodology and Applications*, 1st ed. London, United Kingdom: Academic Press, 1999.

- [104] W. L. Suchanek, "Systematic study of hydrothermal crystallization of zinc oxide (ZnO) nano-sized powders with superior UV attenuation," *J. Cryst. Growth*, vol. 312, no. 1, pp. 100–108, 2009.
- [105] Malvern Instruments Ltd., "Zetasizer Nano User Manual." 2013.
- [106] S. Chakraborty, A. Kole, and P. Kumbhakar, "Room temperature chemical synthesis of flower-like ZnO nanostructures.," *Mater. Lett.*, vol. 67, pp. 362–364, 2012.
- [107] R. P. Rupasinghe, "Dissolution and aggregation of zinc oxide nanoparticles at circumneutral pH : a study of size effects in the presence and absence of citric acid.," University of Iowa, 2011.
- [108] J. Majeed, J. Ramkumar, S. Chandramouleeswaran, and A. K. Tyagi, "Effect of Synthesis Protocol on the Surface Charge of Zinc Oxide Nanoparticles and its Consequence on Sorption Ability," *Sep. Sci. Technol.*, vol. 50, no. 3, pp. 404–410, 2015.
- [109] H. B. Bakrudeen, M. Sugunalakshmi, and B. S. R. Reddy, "Auto-fluorescent mesoporous ZnO nanospheres for drug delivery carrier application," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 56, pp. 335–340, 2015.
- [110] C. Peng, J. Guo, W. Yang, C. Shi, M. Liu, Y. Zheng, J. Xu, P. Chen, T. Huang, and Y. Yang, "Synthesis of three-dimensional flower-like hierarchical ZnO nanostructure and its enhanced acetone gas sensing properties," *J. Alloys Compd.*, vol. 654, pp. 371–378, 2016.
- [111] L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, and D. York, "Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 9, no. 3, pp. 479–489, 2007.
- [112] B. Shirkavand Hadavand, M. Ataefard, and H. Fakharizadeh Bafghi, "Preparation of modified nano ZnO/polyester/TGIC powder coating nanocomposite and evaluation of its antibacterial activity," *Compos. Part B Eng.*, vol. 82, pp. 190–195, 2015.

7. Anexos

O procedimento experimental dos ensaios para determinação da viabilidade bacteriana tem a duração de três dias e envolve os seguintes passos:

1. Dia 1:

- a. Preparou-se o meio de cultura LA (*Luria agar, VWR*), e o meio de cultura LB (*Luria broth, VWR*), de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultura foi de seguida esterilizado usando autoclave.
- b. Prepararam-se as placas de petri com meio de cultura LA. Utilizaram-se placas com 90mm de diâmetro. As placas são conservadas a 4°C. Todo este processo foi conduzido em condições de assepsia numa câmara de fluxo laminar e na proximidade de uma chama, de forma a evitar contaminações do meio de cultura por microorganismos.
- c. Seguidamente procedeu-se à pesagem do material a testar, pós ZnO-1, ZnO-2, ZnO comercial e, nos ensaios com os compósitos, dos compósitos preparados com ZnO-1, ZnO-2, ZnO comercial, com 30%, em peso, de ZnO, e da membrana de PU. Foram escolhidos somente os compósitos com um conteúdo de óxido de zinco de 30%, em peso, visto que, na literatura, compósitos com um conteúdo de 2% e 10% de óxido de zinco não apresentaram redução da viabilidade bacteriana significativos [23], [26].
- d. Por fim, preparou-se uma cultura de *Escherichia Coli* ATCC 25922 em meio de cultura LB, incubada a 37°C, com agitação (180 rpm), durante pelo menos 16 horas.

2. Dia 2:

- a. Foi feita a leitura da densidade óptica da cultura de bactérias, preparada no dia anterior, num espectrofotómetro, com radiação de comprimento de onda de 600 nm. Uma amostra de meio de cultura LB foi usada como branco.
- b. Procedeu-se à lavagem de 5 ml da cultura de bactérias por centrifugação com substituição do sobrenadante por tampão fosfato (pH=7.2). Este

procedimento foi repetido duas vezes para garantir a eliminação de restos de meio de cultura.

- c. De seguida, ressuspendeu-se, novamente, a cultura em tampão usando um volume que garanta uma concentração de bactérias de 2.4×10^9 /ml. A quantidade de tampão fosfato utilizada foi determinada com base nas medições de densidade óptica realizadas no início do procedimento, assumindo que uma unidade de densidade óptica corresponde a uma concentração bacteriana de 8×10^8 /ml.
- d. Entretanto, suspendeu-se o pó de cada amostra a testar em 900 µl de tampão fosfato (pH=7.2), em microtubos de 1.5 ml. No caso dos compósitos, foram utilizados microtubos de 2 ml, uma vez que em tubos de menor capacidade a membrana de compósito ficava imobilizada impedindo, assim, que o ensaio fosse dinâmico.
- e. Adicionou-se, então, 100 µl da suspensão de células a cada uma das amostras em teste, bem como a um microtubo somente com 900 µl de tampão fosfato (pH=7.2), que serviu como controlo, cuja concentração bacteriana foi de 2.4×10^8 /ml.
- f. Incubou-se cada um destes microtubos, em agitação constante, durante uma hora, à temperatura ambiente.
- g. Seguidamente, foram feitas diluições decimais de cada um dos testes. Para cada diluição decimal (denominadas de -1, -2, -3, -4, -5) foi preparado um microtubo com 900 µl de solução salina (0.9% NaCl) ao qual se adicionou 100 µl da diluição imediatamente anterior.
- h. Por fim, foram inoculadas as placas de cultura por sementeira à superfície. Este procedimento consiste em adicionar 100 µl de cada diluição a cada placa e espalhar a suspensão, com recurso a um “espalhador” de vidro. As sementeiras foram realizadas em triplicado para cálculo da média e desvio padrão.
- i. As placas inoculadas foram incubadas 16-24h a 37°C.

3. Dia 3:

- a. Procedeu-se à contagem do número de UFC (Unidades Formadoras de Colónias) em cada placa. As contagens realizadas nas placas inoculadas com as suspensões de pó de óxido de zinco e bactérias ou com as suspensões de compósitos e bactérias são comparadas com as contagens

referentes às placas inoculadas somente com a suspensão de controlo, permitindo assim a determinação da redução da viabilidade bacteriana, com base na seguinte equação (13):

$$R = 100 - \frac{UFC_p \times 100}{UFC_c} \quad (13)$$

Onde, "UFC_p" é o número de Unidades Formadoras de Colónias ponderada, em UFC/ml, calculada da seguinte forma (14):

$$UFC_p = UFC \times V \times F_D \quad (14)$$

Onde, "UFC" é a contagem de Unidades Formadoras de Colónias de uma placa de petri inoculada, "V" é o volume de suspensão teste semeada na placa (0.1ml) e "F_D" é o factor de diluição.

