



Nanopartículas de óxido de zinco para aplicações biomédicas

Santo André - SP

Junho de 2022

RESUMO

A nanotecnologia vem, durante os últimos anos, se revelando uma abordagem extremamente útil em diversas áreas do conhecimento, possuindo numerosas aplicações que beneficiam o avanço científico e tecnológico. Dentro desse contexto, são notáveis seus usos para fins biomédicos, e este projeto foca nas ações antibacterianas apresentadas por materiais nanoestruturados, utilizando como base as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs). Estudos recentes têm revelado a capacidade antimicrobiana das ZnO NPs contra bactérias Gram-positivas, possuindo a capacidade de penetrar a membrana bacteriana e desorganizá-la. Além da ação antibacteriana, tais estudos indicam que as ZnO NPs não prejudicam as células humanas, possuindo, portanto, baixa citotoxicidade e sendo vistas como promissoras para a criação de medicamentos e técnicas eficientes no combate a diversas doenças humanas. Assim, este projeto objetiva o estudo dessas nanopartículas, abrangendo para isso sua síntese, caracterização estrutural por diversas técnicas, ensaios de citotoxicidade e avaliação de sua ação antibacteriana.

Este projeto faz parte de um projeto maior do(a) orientador(a) (Fapesp, CNPq).

Palavras-chave: nanopartículas de óxido de zinco, ação antibacteriana, citotoxicidade.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização desta proposta

Nas últimas décadas, a nanotecnologia vem recebendo um enfoque considerável e crescente, especialmente por ser uma abordagem interdisciplinar, beneficiando o avanço científico e tecnológico em diversas áreas do conhecimento devido às propriedades promissoras que os nanomateriais apresentam (Wang et al., 2015; Fontanive et al., 2014; Matos, 2016). A presente proposta foca no estudo de nanomateriais que

possuam aplicações biomédicas, com desataque em ações antibacterianas. Para tanto, o projeto engloba a preparação de nanopartículas de óxido de zinco, sua caracterização estrutural e morfológica e avaliação de sua citotoxicidade e de sua ação antibacteriana.

1.2. Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs) para aplicações biomédicas

ZnO é um nanocomponente emergente conhecido por sua eficácia em algumas células cancerígenas, bem como propriedades antimicrobianas seletivas contra bactérias Gram-positivas (Premanathan et al., 2011). O uso de ZnO NPs foi aprovado como seguro (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (Mishra et al., 2013). Devido as suas propriedades físico-químicas, ZnO NPs são amplamente utilizados em cremes dentais, protetores solares, xampus e anti-incrustantes de tintas (Mehta et al. 2019). As ZnO NPs são utilizadas nas indústrias farmacêuticas, cosmética, biomédica na entrega de genes e fármacos, devido suas propriedades antidiabéticas, antimicrobianas e antifúngicas promissoras para o tratamento de feridas cutâneas (Bharat et al., 2019), bem como na agricultura e na embalagem de produtos alimentícios atuando como agentes antibacterianos e antifúngicos (Bharat et al., 2019; Darvishi et al., 2019). Devido sua capacidade de absorver luz ultravioleta, as ZnONPs também podem ser usadas na fabricação de filtros solares para a prevenção de queimaduras solares (Bodke et al., 2018). ZnO NPs são considerados um antimicrobiano eficaz, mitigando completamente patógenos Gram-positivos sem prejudicar células humanas (Reddy et al., 2007). A ação antibacteriana das ZnO NPs é atribuída à capacidade dessas partículas de penetrar na membrana bacteriana, desorganizando-a, e causar a produção de espécies reativas de oxigênio, além de liberar íons Zn^{2+} (Bui et al. 2017). Estudos recentes demonstram a habilidade das ZnO NPs em combater bactérias resistentes e biofilmes (Mahamuni-Badiger et al. 2020). Além da sua ação antibacteriana, ZnO NPs são usadas em aplicações biomédicas na cicatrização de lesões cutâneas e na reepitelização tecidual (Thushara et al. 2013).

Essas nanopartículas podem ser sintetizadas por diversas rotas, entretanto as rotas químicas como a coprecipitação são mais econômicas e convenientes para a obtenção desse tipo de material (Bodke et al., 2018).

Na síntese de ZnO NPs por precipitação química as condições experimentais são simples, e ocorre em pressão e temperatura ambiente, representando simplicidade, reprodutibilidade e baixo custo (Bodke et al., 2018; Divya et al., 2018). Além disso, as ZnO NPs também podem ser sintetizadas por rotas verdes, empregando enzimas, microorganismos como algas, fungos e bactérias e também plantas e extratos de folhas, raízes e sementes (Darvishi et al., 2019).

2. OBJETIVOS E METAS

O projeto tem como principal objetivo o desenvolvimento e estudo das propriedades de nanopartículas de óxido de zinco. Para isso, os seguintes objetivos específicos são propostos:

- Síntese das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs);
- Caracterização estrutural e morfológica dos nanomateriais preparados por diversas técnicas;
- Avaliação da citotoxicidade dos nanomateriais preparados em diferentes linhagens celulares;
- Avaliação da ação antibacteriana dos nanomateriais preparados.

3. METODOLOGIA

3.1. Síntese das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs)

As ZnO NPs serão sintetizadas pelo método hidrotermal, através da precipitação de acetato de zinco dihidratado ($\text{Zn}(\text{Ac})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) na presença de uma base (hidróxido de sódio, NaOH). Após a precipitação das ZnONPs, o material será colocado dentro de uma autoclave por um período de 10 horas a uma temperatura de 170 °C. As nanopartículas obtidas serão lavadas com água deionizada e etanol, e secas a uma temperatura de 60 °C (Wang et al., 2016; Divya et al., 2018). A Figura 1 representa esquematicamente a síntese das ZnO NPs.

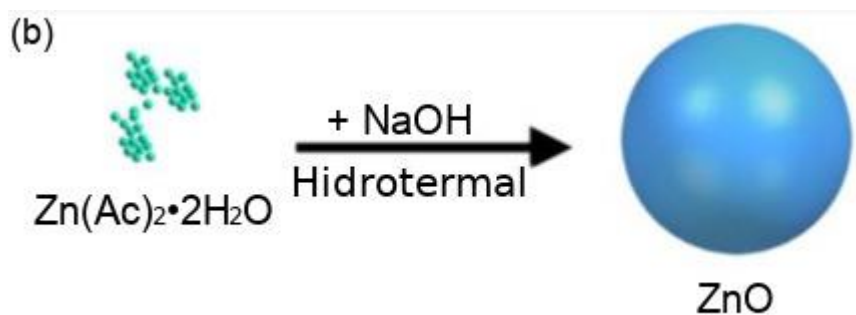


Figura 1. Representação esquemática da síntese de ZnO NPs.

Alternativamente, as ZnO NPs também poderão ser sintetizadas por rotas biológicas, como por exemplo, através do extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) (Senthilkumar et al., 2014). Extratos vegetais, com destaque ao chá verde, vêm sendo usado para a síntese de várias nanopartículas, e o grupo da orientadora já tem experiência na síntese de nanopartículas de óxido de metais por extratos vegetais (Silva et al., 2016).

3.2. Caracterização dos materiais preparados

As ZnO NPs serão caracterizadas por diversas técnicas, conforme descrito abaixo.

3.2.1. Medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS - *Dynamic light scattering*)

O diâmetro hidrodinâmico (% de intensidade), índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta (ζ) de todos os grupos de nanomateriais serão determinados através do equipamento de espalhamento de luz dinâmico (DLS) (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Corp.), a 25 °C em cubetas de poliestireno de 10 mm de caminho óptico. A estabilidade dos nanomateriais preparados será avaliada através do monitoramento por dias/semanas/meses do tamanho médio, PDI e potencial zeta das nanopartículas em dispersão aquosa.

3.2.2. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e varredura (SEM)

As microscopias eletrônicas de transmissão e de varredura serão utilizadas na obtenção de imagens diretas dos nanomateriais preparados, possibilitando a determinação de distribuição de tamanho das nanopartículas e de sua morfologia. Além disso, a espectroscopia dispersiva de raios X (EDS) será utilizada na análise da composição química dos materiais preparados e na distribuição de elementos químicos (Cardozo et al. 2014; Seabra et al. 2014, Urzedo et al. 2020).

3.2.3. Difração de Raios X (DRX)

A estrutura cristalográfica dos nanomateriais sintetizados será confirmada por difração de raios X. A identificação da estrutura cristalina dos nanomateriais será realizada através de comparação com difratogramas obtidos com padrões tabelados e disponíveis no banco de dados Joint Committee on Powder Diffraction Standards – Powder Diffraction File (Santos et al., 2016).

3.2.4. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR - *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Os estiramentos dos grupos funcionais dos componentes dos nanomateriais preparados serão detectados por espectroscopia vibracional no infravermelho, uma ferramenta útil para identificar as vibrações de estiramento ligante-metal (Santos et al. 2016).

3.3. Ensaios biológicos dos materiais preparados

Os ensaios biológicos das nanopartículas de ZnO NPs serão realizados conforme descrito abaixo.

3.3.1. Ensaio de citotoxicidade em culturas de células

A avaliação da citotoxicidade dos nanomateriais preparados será realizada através de testes *in vitro*. Utilizando culturas de células, os testes *in vitro* permitem a determinação da citotoxicidade basal, assim como o

estabelecimento de uma faixa de concentração biologicamente ativa para um determinado agente. Serão realizados testes de dose-resposta e tempo-resposta das células incubadas com os nanomateriais (Pelegrino et al. 2017, Urzedo et al. 2020). As linhagens celulares serão: fibroblastos de prepúcio humano (HFF-1), células Vero (CCIAL-57, 351 Adolfo Lutz Institute, São Paulo), fibroblastos de camundongo (3T3), células epiteliais (CaCo-2) e melanócitos (Melan-A) obtidos a partir do banco de células do Rio de Janeiro (APABCAM).

3.3.2. Avaliação da ação antibacteriana

A ação antibacteriana dos materiais preparados será avaliada frente a diferentes linhagens de bactérias com relevância médica, a saber: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Salmonella enterica* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 35218) e *Streptococcus mutans* (UA159). Parâmetros como concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima serão obtidos de acordo com protocolo estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Além disso, ensaios de curva de morte bacteriana também serão realizados, conforme descrito anteriormente pelo grupo da proponente (Urzedo et al. 2020). Esses ensaios serão realizados em colaboração já estabelecida com o Prof. Dr. Gerson Nakazato da Universidade Estadual de Londrina.

4. DESCRIÇÃO DA VIABILIDADE DE EXECUÇÃO DO PROJETO

Destaca-se que o projeto é viável. O(a) orientador(a) dispõe de toda a infraestrutura física necessária para a devida realização do projeto proposto. O laboratório do(a) orientador(a) dispõe de espaço físico, equipamentos, reagentes para os experimentos. Além disso, o grupo do(a) orientador(a) tem conhecimento técnico-científico para a devida realização do projeto. Importante, o grupo do(a) orientador(a) tem projetos com financiamento Fapesp, CNPq. Desta forma, o projeto aqui proposto faz parte de um projeto maior da Fapesp do(a) orientador(a).

O projeto proposto representa uma grande oportunidade de aprender mais sobre o método científico e sobre as práticas dentro de um laboratório de pesquisa, além de proporcionar o aprendizado dentro de uma área do conhecimento extremamente promissora e de grande interesse do estudante.

Dessa forma, o projeto possibilita um ponto de partida dentro do âmbito acadêmico que traz diversas outras oportunidades ao estudante e possibilita o contato cada vez mais profundo com a produção de ciência, além de trazer uma proposta interdisciplinar que relaciona conhecimentos de química, física e biologia e permite ao aluno a colaboração com estudantes e profissionais de outras áreas, sendo uma experiência extremamente enriquecedora para seu conhecimento e desenvolvimento acadêmico/profissional.

5. CRONOGRAMA

A tabela abaixo demonstra o cronograma de trabalho para a execução das atividades propostas neste presente projeto de Iniciação Científica, dividida em meses.

Atividades	Meses
Síntese das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO NPs)	01-04
Caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas por diversas técnicas	04-08
Avaliação da citotoxicidade das nanopartículas	08-12
Avaliação da ação antibacteriana das nanopartículas	08-12

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bharat TC, Shubhama, Mondala S, Gupta HS, Singh PK, Das AK. Synthesis of Doped Zinc Oxide Nanoparticles: A Review. *Materials Today: Proceedings*, 2019, 11 767–775.

Bodke MR, Purushotham Y, Dole BN. Comparative study on zinc oxide nanocrystals synthesized by two precipitation methods. *Cerâmica*, 2018, 64, 91- 96.

Bui V, Park D, Lee Y. Chitosan Combined with ZnO, TiO₂ and Ag Nanoparticles for Antimicrobial Wound Healing Applications: a mini review of the research trends. : A Mini Review of the Research Trends. *Polymers*, [s.l.], v. 9, n. 12, p. 21, 9 jan. 2017. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/polym9010021>.

Cardozo VF, Lancheros CAC, Narciso AM, Valereto ECS, Kobayashi RKT, Seabra AB, Nakazato G. Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide-releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *International Journal of Pharmaceutics* 2014; 473:20-29.

Darvishi E, Kahrizi D, Arkan E. Comparison of different properties of zinc oxide nanoparticles synthesized by the green (using *Juglans regia* L. leaf extract) and chemical methods. *Journal of Molecular Liquids*, 2019 286, 110831.

Divya B, Karthikeyan C, Rajasimman M. Chemical Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles and Its Application of Dye Decolourization. *Int. Journal Nanoscience Nanotechnology*, 2018, 14, 4, 267-275.

Fontanive VCP, Khalil NM, Cotica LF, Mainardes RM. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 2014, 35 (4), 549-558.

Mahamuni-Badiger, Pranjali & Patil, Pooja & Badiger, Manohar & Patel, Pratiksh & Gadgil, Bhagyashi & Pandit, Abhay & Bohara, Raghvendra. (2019). Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. 108. 110319. 10.1016/j.msec.2019.110319.

MATOS, Hannah Larissa Siqueira. Síntese de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas para remoção de Pb²⁺. 2016. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

Mehta M, Allen-Gipson D, Mohapatra S, Kindy M, Limayem A. Study on the therapeutic index and synergistic effect of Chitosan-zinc oxide nanomicellar composites for drug-resistant bacterial biofilm inhibition. *International Journal Of Pharmaceutics*, [s.l.], v. 565, p. 472-480, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.003>.

Mishra, M., Paliwal, J.S., Singh, S.K., Selvarajan, E., Subathradevi, C., Mohanasrinivasan, V., 2013. Studies on the inhibitory activity of biologically synthesized and characterized zinc oxide nanoparticles using lactobacillus sporogens against staphylococcus aureus. *J. Pure Appl. Microbiol.* 7 (2), 1263–1268.

Pelegrino MT, Silva LC, Watashi CM, Haddad PS, Rodrigues T, Seabra AB. Nitric oxide-releasing nanoparticles: synthesis, characterization, and cytotoxicity to tumorigenic cells. *Journal of Nanoparticle Research* 2017 19:57.

Premanathan, M., Karthikeyan, K., Jeyasubramanian, K., 2011. Manivannan G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 7 (2), 184–192.

Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A. 2007. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl. Phys. Lett.* 90 (21), 213902.

Santos MC, Seabra AB, Pelegrino MT, Haddad PS. Synthesis, characterization and cytotoxicity of glutathione- and PEG-glutathione-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for nitric oxide delivery. *Applied Surface Science*, 2016, 367:26-35.

Seabra AB, Pasquoto T, Ferrarini ACF, Santos MC, Haddad PS, de Lima R. Preparation, characterization, cytotoxicity and genotoxicity evaluations of thiolated- and S-nitrosated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Implications for cancer treatment. *Chemical Research in Toxicology*, 2014, 27, 1207-1218.

Senthilkumar SR, Sivakumar T. GREEN TEA (CAMELLIA SINENSIS) MEDIATED SYNTHESIS OF ZINC OXIDE (ZNO) NANOPARTICLES AND STUDIES ON THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITIES. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 6:6.

Silva BSO, Seabra AB. Characterization of iron nanoparticles produced with green tea extract: A Promising material for nitric oxide delivery. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 2016, 6:1280-1287.

Thushara J. Athauda, Ruya R. Ozer, Justin M. Chalker, Investigation of cotton functionalized with ZnO nanorods and its interaction with *E. coli*, *RSC Adv.* 3 (2013) 10662–10665.

Urzedo AL, Gonçalves MC, Nascimento MH, Lombello CB, Nakazato G, Seabra AB. Cytotoxicity and antibacterial activity of alginate hydrogel containing nitric oxide donor and silver nanoparticles for topical applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2020. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.9b01685

Wang Y, Santos A, Evedokiou A, Losic D. An overview of nanotoxicity and nanomedicine research: principles, progress and implications for cancer therapy. *Journal of Material Chemistry B*, 2015, 3:7153-7172.

Wang Q, Liu S, Wang H, Yang Y. Preparation and photocatalytic properties of magnetically reusable Fe₃O₄@ZnO core/shell nanoparticles. *Physica E*, 2016, 5, 66–71.