



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Francisca Silvana Camacho Gaspar

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS
DE FILMES FINOS DE ZnO

Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, especialidade em Biomateriais,
orientada pelas Professoras Doutoradas Ana Paula Piedade e Paula Maria Vasconcelos Morais
e apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

Francisca Silvana Camacho Gaspar

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DE FILMES FINOS DE ZNO

Dissertação submetida à Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra para obtenção do
grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadores:

Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade
Professora Doutora Paula Maria Vasconcelos Morais

Coimbra, 2019

Agradecimentos

Realizar um projeto desta dimensão nunca será tarefa fácil e, no meu caso não foi diferente. Trilhar o caminho desta longa viagem não teria sido possível sem o apoio e contributo de algumas pessoas e instituições.

Agradeço à Professora Doutora Ana Paula Piedade, por me ter deixado integrar o seu grupo de trabalho e por toda a orientação prestada, todos os conhecimentos transmitidos, total apoio e disponibilidade ao longo deste ano.

Agradeço à Professora Doutora Paula Vasconcelos, por me acolher na sua equipa e pelo apoio na elaboração desta dissertação sempre com a disponibilização dos recursos necessários.

Agradeço à Doutora Carla Dias, ao Doutor Romeu Francisco e à Doutora Catarina Pinho, por estarem sempre prontos a esclarecer as minhas dúvidas e a ajudar-me nas minhas dificuldades.

Agradeço à Universidade de Coimbra, instituição que me acolheu durante 5 anos e me deixou fazer parte de uma família tão grande.

Agradeço a todo o corpo docente, que com esforço e dedicação me conseguiu proporcionar a melhor formação possível.

Agradeço aos meus amigos que me acompanharam durante o meu percurso académico, por terem tornado esta jornada longe de casa mais fácil de superar e por me mostrarem que não é preciso estar em casa para nos sentirmos em casa. Com especial carinho à Mariana por todo o apoio e companhia, especialmente nestes últimos meses.

Agradeço a Coimbra, por me mostrar o verdadeiro espírito académico e por me fazer levar memórias e pessoas para a vida.

Agradeço à minha família, ao meu irmão e aos meus amigos da Madeira, que apesar de longe nunca deixaram de estar presentes e me apoiar em tudo.

Agradeço aos meus pais, por sempre terem acreditado em mim e por me terem apoiado e incentivado em todas as situações, nunca me deixando desistir.

Um muito obrigada a todos!

Abstract

The aim of the present project is to deepen a study on deposition of ZnO thin films, to coat hospital surfaces, using radio frequency sputtering technique. From this technique, and by varying the deposition power, different surface topographies of ZnO coatings were obtained. All thin films were studied using several characterization techniques and the results showed that the lower the power density during the deposition, the thinner the thickness of the thin films and the respective topography was less angular, with decreased roughness.

ZnO surfaces were used for antimicrobial testing to infer which surface would have the highest activity over three bacterial strains commonly found in a hospital setting: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). The tests were carried out with and without irradiation of ZnO thin films with UV in order to analyze the impact of this type of radiation on bacterial inhibition of surfaces.

Subsequently, one of the thin film types was selected to perform tests together with a natural material, reported in the literature as an antibacterial agent: lemon oil. The inhibition halos evaluated in solid culture medium were satisfactory for *S. aureus* and *E. coli* strains under both conditions, with and without UV light irradiation. However, the diameter of the halos obtained for films exposed to ultraviolet radiation was larger. This study demonstrated the viability of using thin films to coat non-deformable surfaces of hospital equipment.

Keywords: *ZnO thin films, sputtering, antibacterial activity, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, lemon oil.*

Resumo

O objetivo do presente projeto é o de aprofundar um estudo sobre a deposição de filmes finos de ZnO, para revestir superfícies hospitalares, a partir da técnica de pulverização catódica por radiofrequência. Utilizando esta técnica, e pela variação da potência de deposição, foram obtidas diferentes topografias superficiais destas superfícies de ZnO. Todos os filmes finos foram estudados através da utilização de várias técnicas de caracterização. Os resultados evidenciaram que quanto menor a densidade de potência durante a deposição menor a espessura dos filmes finos e a respetiva topografia apresentava-se menos angular, com diminuição de rugosidade.

Numa fase posterior, as superfícies de ZnO foram utilizadas na realização de testes antimicrobianos, de modo a inferir qual das superfícies teria uma maior atividade em relação a três estirpes bacterianas usualmente encontradas em ambiente hospitalar: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Os testes decorreram com e sem irradiação dos filmes finos de ZnO com UV, de modo a analisar o impacto deste tipo de radiação na inibição bacteriana das superfícies.

A partir destes resultados, foi selecionado um dos tipos de filmes finos para a realização de testes conjuntamente com um material natural, reportado na literatura como um agente antibacteriano: o óleo de limão. Os halos de inibição avaliados em meio de cultura sólido foram satisfatórios para as estirpes de *S. aureus* e *E. coli* em ambas as condições, com e sem irradiação de luz UV. No entanto, o diâmetro dos halos obtidos para os filmes expostos a radiação ultravioleta foram superiores. Este estudo demonstrou a viabilidade de utilizar filmes finos para o revestimento de superfícies não deformáveis de equipamentos presentes em ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Filmes finos de ZnO, pulverização catódica, atividade antibacteriana, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, óleo de limão.*

Acrónimos

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AMP	<i>Antimicrobial peptides</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FTIR	<i>Fourier Transform InfraRed Spectroscopy</i>
FWHM	<i>Full width at half maximum</i>
GRAS	Geralmente Reconhecidos como Seguros
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
OEs	Óleos Essenciais
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
R2A	<i>Reasoner's 2A agar</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
UV	Ultra-Violeta
XPS	<i>X-Ray Photoelectron Spectroscopy</i>
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>
ZnX	Filme fino de ZnO depositado na condição X

Elementos, Compostos e Iões

H₂O₂	Peróxido de Hidrogénio
O²⁻	Ião Superóxido
O₂²⁻	Ião Peróxido
Si	Silício
Zn²⁺	Ião Zinco
ZnO	Óxido de Zinco
OH⁻	Ião Hidroxilo

Lista de Figuras

1.1.	Estruturas diferentes das a) bactérias Gram-positivas e b) bactérias Gram-negativas.	4
1.2.	Esquema representativo da transmissão de agentes patogénicos em ambiente hospitalar.....	6
1.3.	Absorção da luz UV pelo ZnO e conseqüente ação antibacteriana pela libertação de ROS.....	14
2.1.	Porta-substratos utilizado nas deposições das lamelas de vidro.....	19
2.2.	Esquema de funcionamento de um microscópio eletrônico de varrimento (SEM).....	22
2.3.	Esquema simplificado do funcionamento de um microscópio de força atômica.....	24
2.4.	Placas de Petri espalhadas com 100µL de cada uma das três suspensões bacterianas no meio de cultura LB.....	26
2.5.	Exemplo dos ensaios realizados em triplicados para cada uma das estirpes.....	27
3.1.	Espectros de UV-visível dos filmes finos de ZnO: Zn1 - azul; Zn2 - laranja; Zn3 - cinzento	30
3.2.	Micrografias SEM dos filmes finos de ZnO da secção transversal (a, b, c) e superficial (d, e, f).....	32
3.3.	Ilustração esquemática da morfologia dos filmes de ZnO com espessura crescente.....	33
3.4.	Diagrama de <i>Thornton</i>	35
3.5.	Modelo de zona de estrutura básica para filmes elementares.....	36
3.6.	Imagens AFM topográficas dos filmes Zn1 (a, b)), Zn2 (c, d)) e Zn3 (e, f)) com imagens de 2x2 µm ² do lado direito e de 5x5 µm ² do lado esquerdo	37

3.7.	Placas inoculadas após 48 horas.....	42
3.8.	Halo de inibição na placa de Petri inoculada com <i>S. aureus</i> pelo filme do tipo Zn1.....	43
3.9.	Halos de inibição para <i>E. coli</i> (a) e b)), <i>S. aureus</i> (c) e d)), e <i>P. aeruginosa</i> (e) e f)).....	46
3.10.	Micrografias SEM das superfícies dos filmes do tipo Zn2 incubados em meio de cultura LB (a, c, e, g, i, k) e em meio de cultura R2A (b, d, f, h, j, l) com e sem irradiação UV (c,d,g,h,k, l) e (a,b, e, f,i, j)), respectivamente. Para as estirpes de <i>E. coli</i> (a,b,c,d)), <i>S. aureus</i> (e,f,g,h)) e <i>P. aeruginosa</i> (i,j,k,l)).....	49
3.11.	Formação de um material tipo goma pelo óleo de limão aquando da ligação do mesmo com os filmes finos do tipo Zn2.....	52

Lista de Tabelas

2.1.	Condições de deposição para os filmes finos de ZnO.....	20
3.1.	Parâmetros de rugosidade.....	39
3.2.	Valor do potencial zeta dos filmes de ZnO.....	40
3.3.	Valores dos halos de inibição para a <i>S.aureus</i> e <i>E.coli</i> para os filmes Zn ₂	47

Conteúdo

Introdução	1
1. Estado da Arte	3
1.1. Infecções hospitalares	3
1.2. Prevenção das infecções nosocomiais.....	7
1.3. Óxido de zinco e o seu impacto na atividade antibacteriana.....	9
1.3.1. Tamanho.....	11
1.3.2. Concentração	12
1.3.3. Radiação Ultravioleta	13
1.4. Materiais biológicos com propriedades antibacterianas	15
2. Materiais e Métodos	19
2.1. Materiais	19
2.2. Pulverização Catódica	20
2.3. Técnicas de Caracterização	21
2.3.1. Espectroscopia de absorvância do UV-Visível.....	21
2.3.2. Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM).....	21
2.3.3. Microscópio de Força Atômica (AFM).....	23
2.3.4. Potencial Zeta.....	24
2.4. Testes Bacterianos	25
2.4.1. Avaliação do halo de inibição: filmes de ZnO	25
2.4.2. Avaliação do halo de inibição: filmes de ZnO com óleo de limão. 27	
3. Resultados e Discussão	29
3.1. Espectroscopia de UV- VIS.....	29
3.2. Morfologia e Topografia	31
3.3. Potencial Zeta (Carga superficial)	39
3.4. Testes Antibacterianos.....	41
3.4.1. Ensaio com os filmes de ZnO	41
3.4.2. Ensaio com os filmes de ZnO com e sem óleo de limão.....	44
Conclusão	53

Introdução

Atualmente, as infecções nosocomiais são consideradas uma das principais causas de mortalidade e morbidade entre os pacientes hospitalizados. Uma infecção nosocomial, também denominada de infecção hospitalar, pode ser definida como uma infecção adquirida numa unidade de saúde por um paciente, admitido por outra razão que não aquela infecção. Estima-se que estas afetem 1 em cada 10 pacientes internados no hospital, resultando anualmente em 37.000 fatalidades e que em média um paciente com infecção nosocomial passa 2,5 vezes mais tempo no hospital. Estas infecções devem-se, entre outros fatores, a uma maior resistência dos agentes patogênicos aos antibióticos, tornando-se numa séria ameaça ao sucesso do tratamento de doenças infecciosas. As bactérias desenvolvem resistência quando adquirem novo material genético que codifica esta resistência e é transferido para outras estirpes. Destacam-se a *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), a *Escherichia coli* (*E. coli*), a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) entre as estirpes mais frequentemente encontradas em ambiente hospitalar [1][2][3].

Assim, existe uma necessidade urgente e contínua de encontrar e investigar novos compostos antimicrobianos e é neste contexto que se insere o objetivo da presente dissertação. Com recurso à técnica de pulverização foram depositados filmes finos de óxido de zinco, ZnO, com o objetivo de avaliar a sua capacidade de superfície antibacteriana para revestirem as superfícies dos materiais não deformáveis nas unidades de saúde.

O (ZnO) é um material inorgânico que se encontra reportado como potencial agente antibacteriano, por destruir a integridade das células ao libertar iões e espécies reativas. Este modo de ação, não específico contra determinadas estirpes de bactérias faz com que o ZnO seja um material ideal, já que este não apresenta riscos de desencadear resistência nestes agentes patogênicos. Deste modo, o seu uso na prevenção e tratamento de doenças infecciosas é potencializado [4][5].

Uma outra maneira de combater as bactérias é a partir dos citrinos que são constituídos por muitos metabolitos secundários biologicamente ativos, como flavonóides, esteróis, óleos voláteis, ácidos orgânicos e alcalóides. Os seus óleos

essenciais são fontes ricas de compostos biologicamente ativos com propriedades antibacterianas excepcionais, com a capacidade de atacar a bicamada fosfolipídica da membrana celular dos microrganismos e interromper os seus sistemas enzimáticos, tornando-se assim muito difícil para os microrganismos desenvolverem resistência a estes materiais biológicos. Como tal, numa fase posterior desta dissertação procedeu-se à ligação do óleo essencial de limão à superfície dos filmes finos de ZnO, na tentativa de reforçar o efeito antibacteriano do material inorgânico [1].

A presente dissertação encontra-se dividida em 3 capítulos:

- O primeiro capítulo apresenta uma revisão da literatura que se inicia com a problemática das infeções nosocomiais, passando pelas atuais técnicas de prevenção, pelos materiais biológicos antibacterianos, e finaliza com diferentes fatores que têm impacto na atividade antibacteriana do ZnO.
- O segundo capítulo aborda os materiais e métodos utilizados durante este trabalho, tais como as técnicas usadas para a deposição e caracterização dos filmes finos de ZnO e por fim o procedimento experimental para os testes antibacterianos.
- O último capítulo apresenta os resultados decorrentes do trabalho experimental, bem como a respetiva discussão.

Capítulo 1

Estado da Arte

1.1. Infecções hospitalares

As infecções hospitalares, também denominadas como infecções nosocomiais, surgem nos pacientes quando estes se encontram sob cuidados médicos num hospital ou em qualquer outra unidade de saúde, e que não existiam antes da admissão do paciente [6].

As infecções nosocomiais estão, já desde há muito tempo, entre as principais causas de mortalidade e atualmente representam um dos problemas mais relevantes na saúde pública a nível mundial. Estudos apontam que este tipo de infeção prejudica o resultado clínico de cerca de 15% dos pacientes hospitalizados, sendo que anualmente, e apenas na comunidade europeia, há uma perda financeira de 6,23 milhões de euros relacionados com este problema. Acresce o facto de que cerca de 3,2 milhões de pacientes adquirem pelo menos um tipo destas infecções hospitalares, dos quais 37.000 destes acabam por falecer como consequência direta destas infecções [7][8][9].

Os microrganismos presentes nos hospitais podem incluir bactérias patogénicas, vírus, fungos e leveduras que são fatores de risco para a saúde dos pacientes, visitantes e profissionais de saúde. As bactérias, resistentes a fármacos, têm-se tornado a via preferencial na propagação deste tipo de infeções, sendo responsáveis por 90% delas. Estes agentes patogénicos para serem considerados multirresistentes têm de resistir à ação terapêutica de pelo menos 3 antibióticos distintos. O desenvolvimento da multirresistência nas bactérias é essencialmente devido ao uso excessivo de antibióticos, bem como à sua utilização de modo distinto do prescrito, nomeadamente tempos mais curtos de toma do fármaco. As bactérias multirresistentes estão, cada vez mais, a tornar-se num problema social, resultando numa maior

dificuldade para tratar este tipo de doenças infecciosas e aumentando o número de mortalidades. As 5 principais bactérias multirresistentes são: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* [10][11].

As bactérias podem ser divididas segundo variadas classificações uma das quais tem origem na diferença da estrutura da respetiva parede celular. Neste caso, são considerados dois grandes grupos: as bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas. As Gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa constituída maioritariamente por peptidoglicanos (20-80 nm). Por outro lado, a parede celular das bactérias Gram-negativas é composta por duas membranas; uma membrana externa e uma membrana plasmática com uma fina camada de peptidoglicanos com uma espessura de 7 a 8 nm (Figura 1.1) [12].

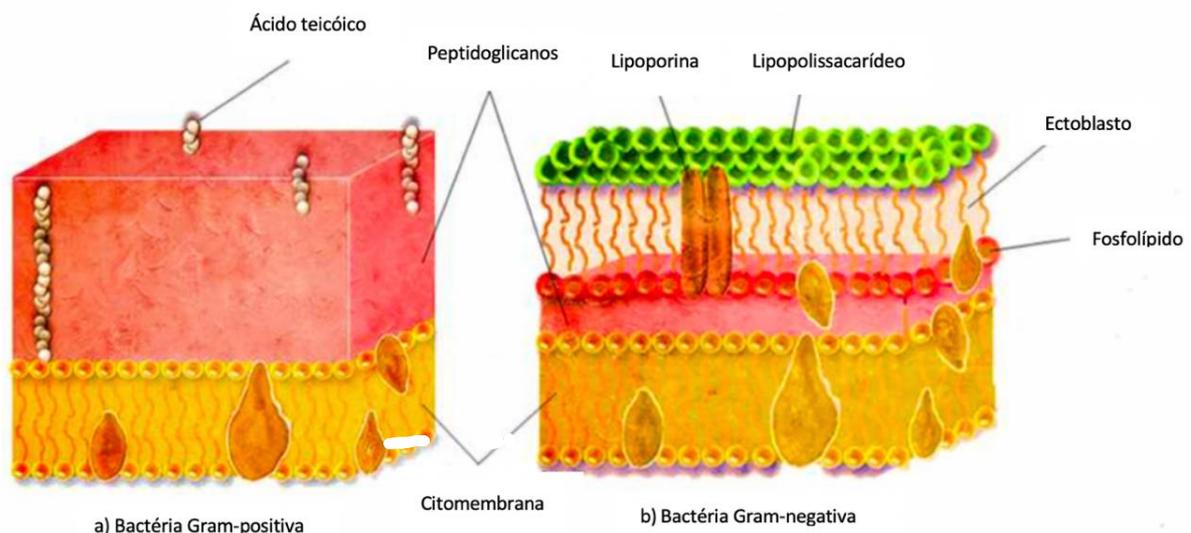


Figura 1.1. Estruturas diferentes das a) bactérias Gram-positivas e b) bactérias Gram-negativas. (adaptado de [13]).

A utilização de um novo antibiótico, para além de ser um acontecimento raro só por si, dado a desaceleração no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, pode ser acompanhado pelo surgimento de resistência bacteriana a esse mesmo fármaco. A mutação de genes que resultam na resistência das bactérias ao tratamento tem sido acelerada por uma série de fatores, entre eles: a prescrição excessiva de agentes antibacterianos, a transferência de genes resistentes entre as bactérias e a disseminação

epidémica de estirpes resistentes entre os pacientes. A evolução rápida da resistência aos antibióticos expõe as deficiências existentes no desenvolvimento de novos fármacos e dificulta o desenvolvimento de soluções para controlar estas infeções. Todos estes fatores ampliam o espectro de infeções que poderão, num futuro muito próximo, ser incontroláveis com os antibióticos disponíveis [7].

Muitas das infeções nosocomiais podem ser transmitidas a partir de uma contaminação generalizada dos agentes patogénicos nas diversas superfícies dos ambientes hospitalares, por não serem eficientemente controladas pelos meios de saneamento convencionais. As superfícies das unidades de saúde são locais de acumulação destes agentes patogénicos que podem ser transmitidos de um paciente afetado para um hospedeiro suscetível, pondo em risco a saúde deste. Esta transmissão, direta ou indireta, ocorre mais frequentemente através de objetos, superfícies e ar contaminados e ainda pelas mãos dos profissionais de saúde que desempenham um papel fundamental, por entrarem em contacto com as áreas ou pacientes contaminados. A sobrevivência dos agentes patogénicos nestes ambientes, que pode variar entre horas a meses, torna a contaminação das superfícies hospitalares ainda mais preocupante, pois desempenham um papel crucial na aquisição destas infeções [8][14][9][15]. Acresce o facto de que os procedimentos de higienização não têm em consideração a diferente eficiência dos produtos utilizados nos distintos tipos de materiais que se encontram nas unidades de saúde: metais, cerâmicos e polímeros.

Os pacientes são a fonte primária de contaminação. Desta forma, as superfícies hospitalares de contacto próximo com os mesmos, tais como as barras da cama, a mesa de cabeceira, as torneiras e os corrimões nas alas hospitalares são consideradas superfícies de fácil contaminação e de elevado risco de transferência tanto para os profissionais de saúde como para os pacientes [14][15].

A contaminação dos quartos dos pacientes não infetados acontece com maior frequência a partir da continuação da viabilidade dos microrganismos partilhados pelos ocupantes anteriores, pela importação através das mãos dos profissionais de saúde ou visitantes e até mesmo pela partilha de portadores assintomáticos (Figura 1.2) [15].

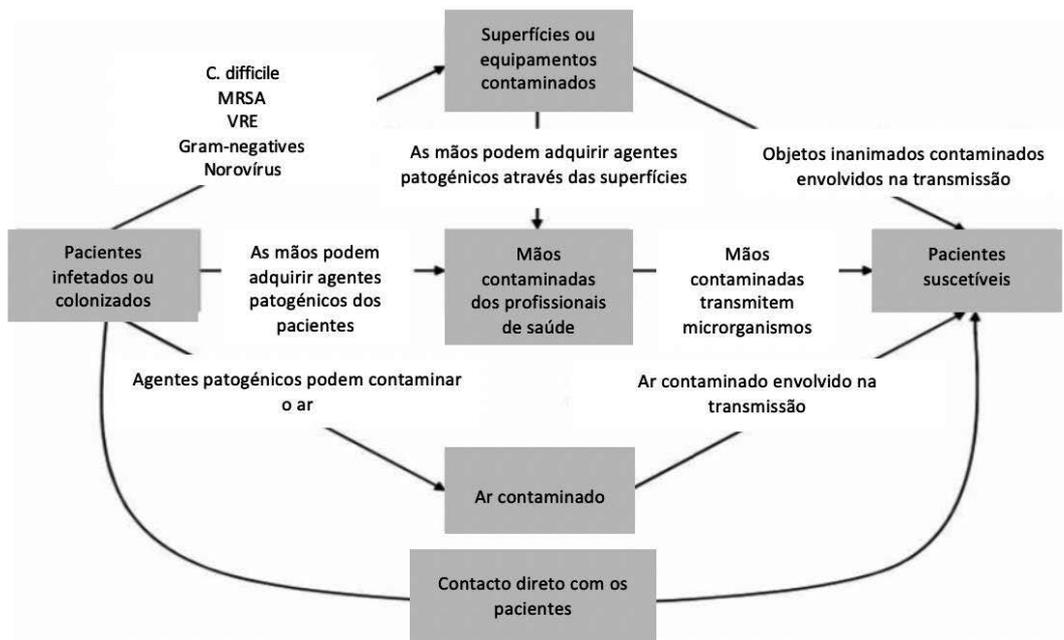


Figura 1.2. Esquema representativo da transmissão de agentes patogénicos em ambiente hospitalar (adaptado de [15]).

Ademais, alguns estudos demonstraram o possível papel desempenhado pelas superfícies dos uniformes, telemóveis, computadores e estetoscópios pessoais dos profissionais de saúde, assim como pelos ventiladores de oxigénio e pelo vestuário de proteção usado nas salas de operações. Algumas outras fontes reconhecidas para o surto de infeções são através dos sistemas de água, da comida e outros equipamentos médicos [6][14][16].

A contaminação das unidades de cuidados intensivos e das salas de operações é considerado um fator de elevado risco, podendo pôr em causa a vida dos pacientes, especialmente quando estes se encontram debilitados ou submetidos a procedimentos cirúrgicos que exigem alto nível de esterilização ambiental [10]. Como estas infeções ocorrem no ambiente hospitalar podem prolongar o tempo de internamento do paciente e provocar a sua incapacidade a longo prazo. Os fatores de risco determinantes para as infeções nosocomiais dependem, essencialmente, do ambiente onde o cuidado de saúde está a ser fornecido, da idade do paciente aliada à sua suscetibilidade e condição física, da falta de consciência do prevaletimento das contaminações entre os funcionários e os profissionais de saúde e da dimensão da própria unidade de saúde. Estes fatores de risco são agravados quando: (i) as condições higiénicas da unidade de

saúde são más; (ii) há uma gestão inadequada de resíduos pela unidade de saúde; (iii) os pacientes sofrem de imunossupressão ou têm uma estadia prolongada nos cuidados intensivos; e (iv) quando são submetidos a um uso prolongado de antibióticos. Outros fatores a ter em consideração são: o uso impróprio de técnicas de injeção, o pouco conhecimento de medidas de controlo básicas para infeções, o uso inapropriado de dispositivos invasivos e a falta de políticas de controlo [6][16].

Atualmente, existem algumas técnicas para evitar a propagação destas infeções nas unidades de saúde que serão abordadas no próximo ponto.

1.2. Prevenção das infeções nosocomiais

Uma vez que as comunidades bacterianas (microbioma) e o uso de antibióticos são diferentes para cada unidade de saúde, naturalmente, a distribuição de bactérias patogénicas e a sua suscetibilidade aos fármacos são também distintas. Por este motivo, é necessário numa primeira instância entender a distribuição e resistência aos fármacos das bactérias em cada unidade hospitalar específica e, a partir destes dados, estabelecer a prevenção e o tratamento. Efetivamente, determinar como é que os microrganismos colonizam, persistem e mudam no ambiente hospitalar tem o potencial de elucidar a maior fonte destas infeções. Contudo, a complexidade do mundo microbial confunde as diversas tentativas em focar a atenção dos investigadores somente num agente patogénico específico [11][16].

Uma mais cuidadosa descontaminação do ambiente contribui para um melhor controlo sob os surtos e reduz as transmissões endémicas. Para melhorar o sistema de higiene deve haver um aprimoramento da eficácia na limpeza e desinfeção. A limpeza convencional com produtos químicos tem várias limitações, pois tem um efeito temporário, um elevado impacto ambiental, não é direcionado a agentes patogénicos específicos e pode contribuir para a seleção de organismos resistentes a desinfetantes e a antibióticos. Por outro lado, os diferentes materiais presentes nas unidades de saúde são afetados de modo distinto pelos agentes de higienização. Acresce o facto de os microrganismos variarem na sua resistência aos desinfetantes, pelo que os agentes de

limpeza devem ser escolhidos cuidadosamente para uma melhor eficácia. Uma escolha não eficaz dos produtos de limpeza e um ambiente hospitalar muito complexo e difícil de limpar podem redirecionar os agentes patogénicos para outras superfícies. Por outro lado, o desenvolvimento de genes de resistência por parte dos microorganismos, que muitas vezes estão contidos em vetores complexos de DNA, podem também induzir resistência a desinfetantes e metais pesados, fazendo com que a contaminação possa persistir ou regressar [8][9][15][16].

Pelas razões apresentadas é importante desenvolver procedimentos de saneamento que sejam capazes de combater doenças e surtos associados à disseminação de agentes patogénicos específicos, pois os desinfetantes convencionais não são capazes de o fazer [8].

Os desenvolvimentos tecnológicos capazes de ajudar no processo de limpeza e desinfeção incluem a introdução de materiais de microfibras. Para além disso, os designers e fabricantes dos equipamentos hospitalares podem ajudar na construção de hospitais menos complexos e mais simples de higienizar [15].

Um fator de risco que pode ser eliminado é o incumprimento das diretrizes atuais de higiene pelos profissionais de saúde, em determinadas situações, que pode catapultar contaminações cruzadas entre o ambiente e os pacientes ou provocar uma transmissão direta de paciente para paciente. Para além disso, uma estratégia que pode ter um impacto significativo é o envolvimento dos pacientes na prevenção e controlo destas infeções [14][17].

Uma outra abordagem para combater as infeções nosocomiais é a baseada no uso de bactérias benéficas, onde se mostrou que estas podem diminuir as bactérias patogénicas sem induzir a resistência a fármacos. No entanto, a ação probiótica não é rápida nem específica. Em contraste, os bacteriófagos têm sido sugeridos como agentes descontaminantes, por serem capazes de matar bactérias específicas muito rapidamente, apesar da sua ação ser limitada temporalmente. Como resultado, com base nas propriedades dos probióticos e bacteriófagos, foi testado o seu uso combinado como um sistema potencial para eliminar, de um modo sustentado, as bactérias responsáveis pelas infeções hospitalares, com especial foco nas multirresistentes. Notavelmente, esta combinação não só resultou numa redução rápida (até > 90%) dos

microrganismos alvo, como também, devido ao efeito estabilizador dos probióticos, os patógenos foram mantidos em níveis baixos (< 99%) em épocas posteriores [8].

O desenvolvimento de superfícies antibacterianas, fortemente estimulado pela necessidade urgente em identificar alternativas à administração de antibióticos, tem-se tornado extremamente relevante para minimizar as infecções nosocomiais. Graças aos recentes avanços em ciências dos materiais, em biotecnologia e ao rápido crescimento sobre o conhecimento do efeito de determinados materiais em diversos ramos da microbiologia, uma extensa variedade de materiais está agora disponível para o revestimento de superfícies com propriedades antibacterianas. Entre estes, destaca-se a prata, conhecida por desativar enzimas ao ligar-se aos grupos tiol e por inibir a cadeia respiratória dos agentes patogénicos. Este material, é de longe o metal mais usado para fins antibacterianos, começando muitas estirpes bacterianas a criar resistência a este metal. Outros estudos revelaram ainda que o cobre é capaz de induzir a peroxidação nas membranas das bactérias e que o zinco tem a capacidade de inibir a atividade enzimática das mesmas [18].

Nesta dissertação pretende-se aferir a capacidade de superfícies revestidas com filmes finos de ZnO possuírem propriedades antibacterianas, contra algumas das estirpes mais prevalentes nas unidades de saúde. Por este motivo, no próximo ponto será discutido com maior profundidade algumas das suas propriedades/características deste composto cerâmico e as suas aplicações como agente antibacteriano.

1.3. Óxido de zinco e o seu impacto na atividade antibacteriana

O óxido de zinco (ZnO) é descrito como um material inorgânico funcional, promissor e versátil, com uma ampla gama de aplicações. É um semiconductor do tipo n com uma banda de 3,3 eV e com uma energia de ligação livre significativamente elevada (60meV), permitindo assim que a emissão de excitação seja eficiente à temperatura ambiente. Aliando estas propriedades à sua biocompatibilidade, propriedades óticas e

piezoelétricas e à sua capacidade de atuar como fotocatalizador fazem com que este composto seja altamente desejável para várias aplicações, incluindo: aditivos alimentares, biossensores, engenharia de tecidos, biossegurança de células, sistemas de detecção de fluorescência, sistemas de entrega de fármacos, diagnóstico de cancro, revestimento de superfícies, fotocatalisador, cosmética, agente antibacteriano e protetor UV. Entre as suas principais vantagens conta-se ainda a sua fácil preparação na forma de filmes finos, nanofios, nanobastões e nanopartículas [4][12][13][19].

Mais detalhadamente, este material tem sido usado pela indústria de protetores solares devido às suas propriedades óticas apelativas e pela sua capacidade de refletir, dispersar e absorver a radiação UV. Entre as aplicações biológicas, a existência de filmes finos de ZnO mesoporosos pode permitir que vários fármacos e moléculas biologicamente relevantes sejam carregadas e entregues, abrindo assim caminho para aplicações em sistemas de entrega de fármacos. Por outro lado, as estruturas macroporosas deste material que apresentam boas atividades antibacterianas e piezoelétricas podem permitir a criação de novos *scaffolds* para aplicações em engenharia de tecidos e para o revestimento de superfícies [4][19].

De acordo com o American Heritage Medical Dictionary, a atividade antibacteriana é a ação pela qual o crescimento bacteriano é destruído ou inibido e um agente antibacteriano é considerado bactericida se mata as bactérias ou bacteriostático se inibe o seu crescimento. O ZnO pode atuar como agente antimicrobiano por possuir propriedades bactericidas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, potencializando assim o seu uso na prevenção e tratamento de doenças infecciosas. Atualmente, este composto está a ser investigado como agente antibacteriano em formulações à micro e nanoescala. Quando em dimensões nanométricas este exhibe morfologias variadas e apresenta atividade antibacteriana significativa sobre um amplo espectro de estirpes bacterianas [12][19].

O contato direto de nanopartículas de óxido de zinco com as paredes celulares, resulta na destruição da integridade das células bacterianas, devido à libertação de iões com propriedades antimicrobianas, principalmente iões Zn^{2+} e na formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), tais como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e os iões superóxidos (O_2^-). Consequentemente, a morfologia das membranas das bactérias é alterada, provocando um aumento da sua permeabilidade, ocorrendo a disrupção da

regulação do transporte transmembranar, resultando em morte celular. Este modo de ação não específico contra as bactérias fazem com que este agente antimicrobiano seja ideal por não apresentar riscos em desencadear resistência bacteriana [12][19].

Curiosamente, vários estudos relataram ainda que as nanopartículas de ZnO são não-tóxicas para as células humanas e têm uma boa biocompatibilidade com as mesmas, podendo este ser um dos aspetos mais importantes na utilização deste composto como agente antimicrobiano [12].

1.3.1. Tamanho

O tamanho do ZnO, tanto sob a forma de partículas como sob a forma de material já conformado (superfície) afeta as suas propriedades antibacterianas, principalmente porque a área superficial específica, os átomos na superfície, a taxa de absorção ótica e a capacidade de adsorção deste material muda consoante o seu tamanho [13].

No caso de partículas de ZnO, quanto menor o seu tamanho, maior é a sua área de superfície específica, maior a quantidade de átomos na superfície e mais elevada é a sua taxa de absorção da luz. Desta forma, alcançar a superfície da bactéria, causar a disrupção da membrana celular e danificar as moléculas da célula torna-se mais fácil. Ademais, um tamanho mais reduzido deste composto permite produzir mais ROS, aumentando o dano e o efeito endoquímico nas células bacterianas. Consequentemente, as partículas mais pequenas podem penetrar nas células bacterianas, eliminando-as de forma ainda mais eficiente [5]. Com efeito, a vitalidade das células vivas diminui significativamente à medida que o tamanho das nanopartículas de ZnO diminui, isto porque, há um aumento da reação às bactérias, pois o número de H_2O_2 depende sobretudo da área de superfície deste material. Adicionalmente, um estudo demonstrou que a dissolução das nanopartículas de óxido de zinco dando origem aos iões Zn^{2+} , responsável pela toxicidade do composto, era dependente do tamanho [12][20].

Concluindo, um aumento da área superficial específica e a diminuição do tamanho das partículas, bem como da sua cristalinidade, torna a atividade antibacteriana mais forte [21].

1.3.2. Concentração

A concentração desempenha também um papel importante na atividade fotocatalítica do ZnO, porque a área de superfície e as oportunidades de contacto entre a matéria orgânica e inorgânica aumentam com uma maior concentração. Por norma, a taxa da reação inicial aumenta rapidamente com o aumento da concentração do ZnO, contudo a taxa da reação diminui quando a dosagem é muito elevada [22][23][24].

Muitos estudos sugerem que a atividade antimicrobiana, das nanopartículas de ZnO, depende também da sua concentração e estrutura cristalina, demonstrando posteriormente que o aumento da concentração das nanopartículas resultava numa maior atividade antibacteriana contra a *Escherichia coli* (*E. coli*), isto porque uma maior quantidade de H₂O₂, letal para as bactérias, era gerada na superfície do composto. Consequentemente, as nanopartículas deste composto interagiram com a parede da membrana da *E. coli* causando danos consideráveis e desencadeando o colapso da membrana celular [12][25].

Um outro estudo apoiou esta hipótese, mostrando que uma baixa concentração de ZnO era incapaz de inibir as bactérias. Contudo, a atividade antibacteriana deste composto intensificava-se com o aumento da concentração. Acabando por demonstrar que a atividade antibacteriana teria dependido da área externa e da concentração [26][27].

O aumento da concentração de ZnO, para concentrações entre 50-100 mg L⁻¹, potencializa a morte celular dos microrganismos, pelo facto de interromper a função mitocondrial, estimular a perda de lactato desidrogenase e alterar a morfologia da célula, [12].

Concluindo, como vários estudos demonstraram, a concentração de nanopartículas deste material, desempenha um papel importante na atividade

fotocatalítica e antibacteriana, sendo estas favorecidas quando a uma maior concentração se alia uma maior área superficial [13].

1.3.3. Radiação Ultravioleta

Vários estudos demonstraram que as propriedades antibacterianas do ZnO variavam sob diferentes condições de iluminação, sendo que a eficiência antibacteriana do material é maior em condições onde havia irradiação com luz ultravioleta, seguido de luz solar simulada e por fim com ausência de luz. A principal razão para estes resultados é o facto do ZnO incrementar as suas propriedades fotocatalíticas quando submetido a irradiação [28][29][30].

Por outro lado, outros estudos mostraram que a adesão das nanopartículas de ZnO à parede celular das bactérias em condições de ausência de luz, apresentam um risco significativo para os micróbios ambientais devido à entrada dos iões Zn^{2+} no citoplasma das bactérias. Relativamente às condições em luz solar simulada, verificou-se uma produção de radicais hidroxilo, radicais livres de aniões superóxidos e outros materiais com reatividade elevada. A grande quantidade de material ativo produzido sob estas condições pode interagir com a bactéria e destruir a sua estrutura, inibindo efetivamente o crescimento e a reprodução das mesmas. Todavia, O ZnO responde melhor à luz ultravioleta, absorvendo-a intensamente, o que leva a um aumento significativo da sua interação com as bactérias [13][31].

A fotocondutividade deste composto persiste por muito tempo mesmo depois de se desligar a fonte de luz UV. Tal facto é devido à formação de uma região de depleção dos eletrões à superfície e que se encontra fortemente associado às espécies negativas de oxigénio (O_2^- , O_2^{2-}) que se encontram adsorvidas na superfície. A radiação UV causa rapidamente a desadsorção destas espécies resultando na redução da região da superfície de depleção dos eletrões, causando uma melhoria na fotocondutividade [12].

As nanopartículas de ZnO em solução aquosa sob radiação UV têm efeito fototóxico, podendo levar à produção de ROS como o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e

os iões de superóxido (O_2^-). Estas espécies ativas geradas são capazes de penetrar nas células, inibindo ou matando os microrganismos, tal como descrito anteriormente [32].

Além disso, a radiação de elevada intensidade com comprimentos de onda específicos podem matar os microrganismos. Alguns resultados experimentais mostraram que bactérias tais como a *Acinetobacter bauman*, *P. aeruginosa* e *E. coli* podiam ser erradicadas por irradiação direta, numa ferida, com uma luz com comprimento de onda de 400 nm, e que uma luz com comprimento de onda de 405 nm poderia tornar a *Helicobacter pylori* inativa. Adicionalmente, poderia ser efetuada a esterilização da *Salmonella typhimurium* com recurso a uma luz com comprimento de onda de 521 nm [33][34].

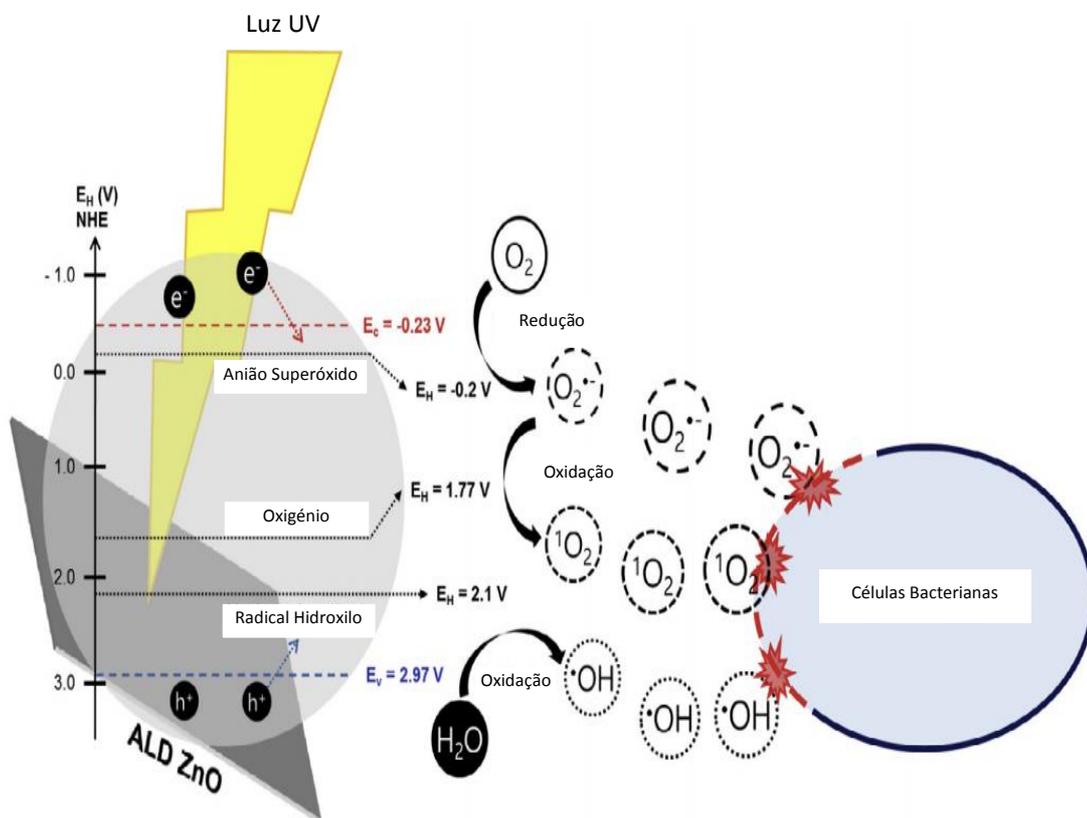


Figura 1.3. Absorção da luz UV pelo ZnO e consequente ação antibacteriana pela libertação de ROS (adaptado de [35]).

1.4. Materiais biológicos com propriedades antibacterianas

Existe uma necessidade extremamente urgente em testar novos agentes antimicrobianos, particularmente para o tratamento de infeções crónicas associadas a uma colonização persistente de bactérias multirresistentes. Nos últimos anos tem havido uma crescente atenção em relação aos agentes antimicrobianos derivados de materiais biológicos naturais como uma alternativa aos antibióticos.

Os compostos naturais são capazes de responder simultaneamente a mais do que um alvo bacteriano, sendo esta a propriedade que os torna menos propensos a permitir o desenvolvimento de resistência bacteriana. Para além deste facto, estes produtos são rotulados como “Geralmente Reconhecidos como Seguros” (GRAS), tendo sido ainda observado que alguns deles poderiam aumentar a atividade de antibióticos, exibindo um efeito sinérgico [36].

Desde os tempos ancestrais que os produtos antimicrobianos naturais têm sido usados por várias culturas espalhadas pelo mundo como uma parte fundamental de tratamentos medicinais, podendo ser obtidos a partir de diferentes fontes que incluem: plantas, animais, bactérias, algas e fungos. Os que mais se destacam como alternativa aos antibióticos convencionais são essencialmente os produtos provenientes de plantas e seus derivados, por serem naturais, baratos e de fácil acesso [18][36][37].

As plantas produzem um vasto repertório de metabolitos secundários, tais como: óleos essenciais, alcalóides, terpenóides, fenólicos e peptídeos. Estes metabolitos desempenham um papel importante na proteção das plantas contra pragas, radiações UV e infeções microbianas, afetando as células destes agentes patogénicos através de vários mecanismos. Estes últimos incluem a rutura da estrutura e função da membrana celular, interrupção da síntese de DNA, interferência com o metabolismo intermediário e indução de coágulos nos constituintes citoplasmáticos [36][37].

Os óleos essenciais (OEs) são reconhecidos há décadas por exibirem atividades biológicas, que incluem propriedades antioxidantes, anticancerígenas e antimicrobianas. São metabolitos secundários com fortes odores, produzidos por plantas aromáticas e destacam-se por serem líquidos, voláteis e solúveis em lípidos e

solventes orgânicos, apresentado uma densidade menor que a água. São constituídos por cerca de 20 a 60 compostos com diferentes concentrações, onde apenas dois ou três componentes principais estão presentes em concentrações relativamente elevadas (20 a 70%) [36][37][38].

As suas propriedades antimicrobianas são bem conhecidas e são atribuídas principalmente à presença de terpenos, terpenóides e compostos aromáticos. Estes compostos naturais podem inibir ou abrandar o crescimento de estirpes de bactérias resistentes a antibióticos, bem como leveduras e fungos recorrendo a uma cascada de reações que envolvem a alteração completa da morfologia celular dos microrganismos. Vários estudos indicam um maior efeito antibacteriano dos OEs contra bactérias Gram-positivas comparativamente às Gram-negativas. Tal é devido ao facto de a membrana celular externa das bactérias Gram-negativas possui características hidrófilas que impedem o contato dos constituintes hidrófobos dos OEs com a célula bacteriana. Contrariamente, estes materiais naturais podem prejudicar diretamente a membrana celular das bactérias Gram-positivas, levando à rutura da mesma e provocando o bloqueio dos sistemas enzimáticos e o incremento da permeabilidade iónica da parede celular. A concentração utilizada dos compostos naturais deve exercer um forte efeito bacteriostático ou bactericida, sem causar problemas colaterais. Por fim, estes podem ser usados isoladamente, ou em conjunto com outros OEs ou agentes sintéticos ativos, uma vez que a sinergia foi observada pela combinação destas substâncias [36][37][39].

Os monoterpenos bioativos, como o timol e carvacrol, encontrados principalmente no óleo de tomilhos e orégãos, e os fenilpropanóides, como o eugenol, encontrados principalmente no óleo essencial de cravo, apresentam uma substancial atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O carvacrol e o timol possuem a capacidade de desintegrar a membrana externa das bactérias Gram-negativas e de romper a membrana celular das bactérias Gram-positivas, contrariando assim o mecanismo de "reduzida permeabilidade da membrana" usado por estirpes multirresistentes. Adicionalmente, os OEs de manjerição, sálvia, alecrim e orégão são eficazes contra estirpes de *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella spp* [36][37].

Por outro lado, o geraniol que é um constituinte dos OEs, mostrou ter uma atividade inibidora contra algumas estirpes multirresistentes das bactérias Gram-

negativas, nomeadamente: *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. A suscetibilidade destas bactérias a estes compostos foi incrementada pela combinação de fármacos comumente usados, como os β -lactâmicos, cloranfenicol e quinolonas com o geraniol [39].

Diferentes estudos também demonstraram que os óleos provenientes do limão possuem atividade antibacteriana, sendo este mais eficiente do que aqueles encontrados na laranja e toranja. O óleo de limão citral e o linalol são eficientes contra *E. coli* e *Salmonella enterica* e inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, e *S. aureus*). Adicionalmente, foi demonstrado em dois estudos *in vitro*, que o sumo de limão é também um eficiente agente antibacteriano, inibindo o crescimento de bactérias multirresistentes isoladas de ambientes clínicos (*S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella aerogenes*, e *Klebsiella pneumoniae*). De realçar que o componente ativo em ambos os estudos foi o ácido cítrico [40].

Uma outra alternativa biológica natural aos antibióticos convencionais são os peptídeos antimicrobianos (AMP), onde os seus mecanismos de ação são, atualmente, ativamente investigados. Os AMPs são moléculas que normalmente contêm entre 8 a 50 aminoácidos diferentes e as suas fontes de isolamento são variadas (bactérias, protozoários, fungos, plantas, insetos, animais). O seu papel nos organismos vivos é a capacidade de atuar como protetores nos mecanismos naturais de defesa, pois devido à sua carga positiva e propriedades anfipáticas, as suas estruturas tridimensionais favorecem as interações com as membranas bacterianas. As catelicidinas são pequenas moléculas armazenadas principalmente nos neutrófilos e macrófagos. Estes peptídeos possuem um amplo espectro de atividade contra bactérias, fungos e vírus. O papel das catelicidinas na proteção anti-infecciosa passa pela supressão da sua própria síntese, induzindo assim a sensibilidade do organismo a infeções. Muitos estudos demonstraram a importância da síntese de peptídeos de estruturas similares e derivados de catelicidinas no tratamento de infeções contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* resistentes a antibióticos [37].

As defensinas são peptídeos antimicrobianos catiónicos, semelhantes às catelicidinas. No entanto, o seu modo de ação consiste na lise direta dos microrganismos através de um aumento da permeabilidade da membrana celular, resultando numa

formação de ligações eletrostáticas entre os grupos de arginina da defensina e a membrana fosfolipídica. Uma baixa concentração de defensinas pode inibir a síntese de peptidoglicanos na parede celular da bactéria. Este tipo de peptídeos pode ainda ligar-se a moléculas polianiónicas, como o DNA, após a sua penetração na célula bacteriana. As lactoferrinas pertencem à família das transferrinas e têm a capacidade de se ligar ao ferro, sendo esta a propriedade que lhes permite ser antibacterianas e antifúngicas. Esta glicoproteína pode ser encontrada no leite e no sistema imunitário inato (nas secreções lacrimais, salivares, nasais e genitais). As maiores vantagens destes peptídeos antimicrobianos são: a sua ação rápida, o seu vasto espectro de atividade e o seu baixo nível para desencadear resistência [37].

Nesta dissertação vai ser avaliada a ação antimicrobiana de filmes finos de ZnO com e sem a imobilização de óleo de limão.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1. Materiais

Nesta dissertação foi utilizado como alvo o óxido de zinco (Goodfellow de pureza 99,99%) com 10 mm de diâmetro e 3 mm de espessura. A deposição foi efetuada em modo não reativo, utilizando penas como gás de descarga argon com 99,9999% de pureza (Praxair)

Em virtude das distintas técnicas de caracterização empregues, os filmes foram depositados sobre três substratos: (i) lâminas e lamelas de vidro; (ii) aço inoxidável 316L (AISI) e (iii) silício (Si). Estes substratos foram submetidos a um banho de ultrassons com etanol e, posteriormente, com acetona durante 15 minutos cada. Seguidamente foram secos sob corrente de ar quente e posteriormente colados ao porta-substratos com cola de prata. No caso em que os substratos foram lamelas de vidro (espessura de 1 mm e diâmetro de 10 mm) foi utilizado um porta-substratos especial (Figura 2.1) que permitiu que as lamelas estivessem seguras após terem sido coladas com fita-cola de cobre.



Figura 2.1. Porta-substratos utilizado nas deposições das lamelas de vidro.

2.2. Pulverização Catódica

A pulverização catódica é uma técnica para a produção de revestimentos em que se designa como alvo o material que se pretende depositar e como substrato, o material sobre o qual se pretende que o alvo seja depositado.

Esta técnica ocorre numa atmosfera rarefeita quando se aplica uma diferença de potencial entre um cátodo (alvo) e um ânodo (substrato), estabelecendo-se assim entre ambos uma descarga elétrica (plasma). Deste modo, é possível acelerar os iões, provenientes da descarga do plasma, que se encontram no interior da câmara de deposição, orientando-os na direção do cátodo. As partículas que neste caso provieram da ionização do Árgon, usadas para o bombardeamento da amostra, possuem energia suficiente para ejetar os átomos da superfície do alvo, onde a maior parte destes são direcionados e depositados sobre o substrato [41].

As características dos filmes dependem das condições de deposição. Neste contexto, apenas será avaliado o impacto da densidade da potência fornecida ao alvo para cada conjunto de filmes diferentes. Para facilitar a identificação dos diversos tipos de filmes finos de ZnO recorreu-se a uma nomenclatura dependente do valor da densidade de potência (D_{dep}) à qual os filmes foram depositados de acordo com o sumariado na tabela 2.1.

Após inserção na câmara de deposição foi efetuada uma limpeza por plasma ao alvo e substratos, que se encontravam separados por um anteparo amovível de modo a evitar contaminação cruzada. A limpeza foi efetuada a uma pressão de 0,7 Pa, com potência de 150 W tanto para o alvo como para os substratos, durante 5 minutos.

Tabela 2.1. Condições de deposição para os filmes finos de ZnO.

	$P_{inicial}$ (Pa)	$T_{inicial}$ (°C)	P_{dep} (Pa)	t_{dep} (s)	D_{dep} (W.cm ⁻²)
Zn1	$2,1 \times 10^{-4}$	21	0,7	1200	191
Zn2	$2,7 \times 10^{-4}$	21	0,7	1200	318
Zn3	$2,2 \times 10^{-4}$	21	0,7	1200	446

2.3. Técnicas de Caracterização

2.3.1. Espectroscopia de absorvância do UV-Visível

A espectroscopia de absorvância do UV-Visível é uma técnica de caracterização frequentemente usado para o estudo de materiais em nanoescala que permite investigar as suas características, incluindo tamanho, propriedades óticas, forma, concentração, estado de agregação e até mesmo bioconjugação quando os perfis de absorção dos nanomateriais são distintos. Nesta técnica, uma amostra é colocada entre uma fonte de luz e um fotodetector e a intensidade do feixe de luz é medido antes e depois de passar pela amostra. Posteriormente, a luz que é absorvida e refletida pela amostra é quantificada, comparando-a com a intensidade de luz refletida e absorvida por um material de referência [42][43][44].

A obtenção dos espectros foi feita com o espectrofotômetro Jasco V-530 sobre as lamelas de vidro revestidas. Dado que se trata de um espectrofotômetro com duplo feixe, no local de referência foi colocada uma lamela de vidro não revestida.

2.3.2. Microscopia Eletrônica de Varrimento (SEM)

A microscopia eletrônica de varrimento (SEM) é uma técnica analítica usada para estudar a morfologia de um material. Este método de caracterização fornece imagens extremamente detalhadas, aliadas a uma profundidade de campo que permite o estudo da amostra com a definição pretendida. No entanto, em algumas análises específicas ou para determinados tipos de materiais, há a necessidade de revestir a amostra impedindo a sua análise por outros métodos de caracterização [42][43][45][46].

Ao contrário da microscopia ótica que usa fontes de luz e lentes de vidro para iluminar amostras e obter assim imagens ampliadas, o SEM usa feixes de elétrons acelerados e lentes eletrostáticas ou eletromagnéticas para gerar imagens de resolução muito maior, pois os elétrons possuem comprimentos de onda muito menores do que os fótons da luz visível. O feixe de elétrons de elevada energia incidente varre a

superfície da amostra e interage com a mesma para gerar sinais, refletindo a sua composição atômica e detalhes morfológicos da superfície (Figura 2.2.). Os elétrons incidentes causam emissões de dispersão elástica de elétrons (elétrons “*backscattered*”), dispersão inelástica de elétrons (elétrons secundários de baixa energia) e raios X característicos. Entre estas emissões, a detecção dos elétrons secundários é o modo mais comum em SEM, podendo alcançar uma resolução menor que 1 nm [43][45].

Neste estudo foi utilizado um equipamento do tipo FEG-SEM (FEG-Field Emission Gun) da marca JOEL e modelo XL30. Devido à natureza isolante dos materiais dos filmes finos, bem como das espécies biológicas, antes da observação as amostras foram revestidas, por pulverização catódica, com uma camada de 10 nm de espessura de Au-Pd.

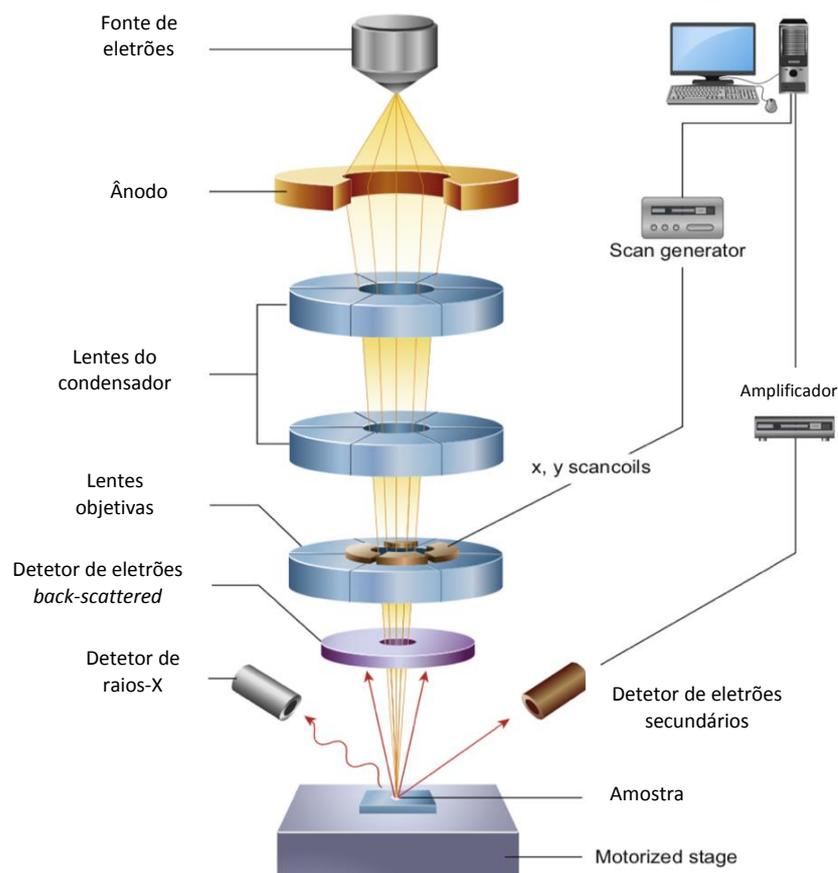


Figura 2.2. Esquema de funcionamento de um microscópio eletrônico de varrimento (SEM) (Adaptado de [47]).

2.3.3. Microscópio de Força Atômica (AFM)

A Microscopia de Força Atômica (AFM) permite a avaliação da topografia de superfícies à escala nanométrica e por poder ser aplicada a materiais não condutores, em meio húmido, seco, ou em vácuo, permitindo a análise de muitos e variados materiais. Como tal, o AFM é usado para investigar o tamanho, a forma, a rugosidade, bem como a sorção de outras espécies na superfície de um material [42][43][46][48][49].

Os diferentes modos de varrimento empregues nos estudos de AFM incluem o modo sem contato (também chamado de modo estático), modo de contato e modo de contato intermitente com a amostra (também chamado de modo dinâmico ou *tapping mode*). O AFM não requer qualquer modificação de superfície ou revestimento prévio, no entanto, exhibe tempos de varrimento mais lentos do que qualquer microscópio eletrónico [42][43].

A imagem AFM efetua o varrimento da superfície linha por linha com uma ponta fina acoplada a um *cantilever* muito flexível e colocado em contato ou muito perto da amostra. Durante o varrimento, a força da interação entre a amostra e a ponta é mantida constante. Esta força resulta principalmente de forças eletrostáticas atrativas ou repulsivas de longo alcance, forças de van der Waals atraentes e forças interatómicas repulsivas. A ponta é geralmente feita de silício ou nitreto de silício, e o final da mesma tem um raio de curvatura de alguns nanómetros para detetar a deflexão do *cantilever*, causada pela interação da ponta com a amostra. A deflexão é detetada por fotodiodo de quatro quadrantes que utiliza o sinal para ajustar a força aplicada à amostra por meio de um sistema de feedback usando cerâmicos piezoelétricos que ajustam a altura da amostra. As forças são finalmente calculadas combinando as informações da variação do laser e a rigidez conhecida do *cantilever* e os deslocamentos verticais são posteriormente explorados para reconstruir a topografia da superfície da amostra (Figura 2.3.) [42][43][50].

O microscópio utilizado foi do modelo Dilnova da marca Veeco com uma ponta de nitreto de silício da marca Bruker, com frequência de ressonância, f_0 , de 150kHz e

constante de mola, k , entre 10 N.m^{-1} em modo de contacto intermitente. O tratamento de imagens e de dados foi efetuado no software Gwyddion®.

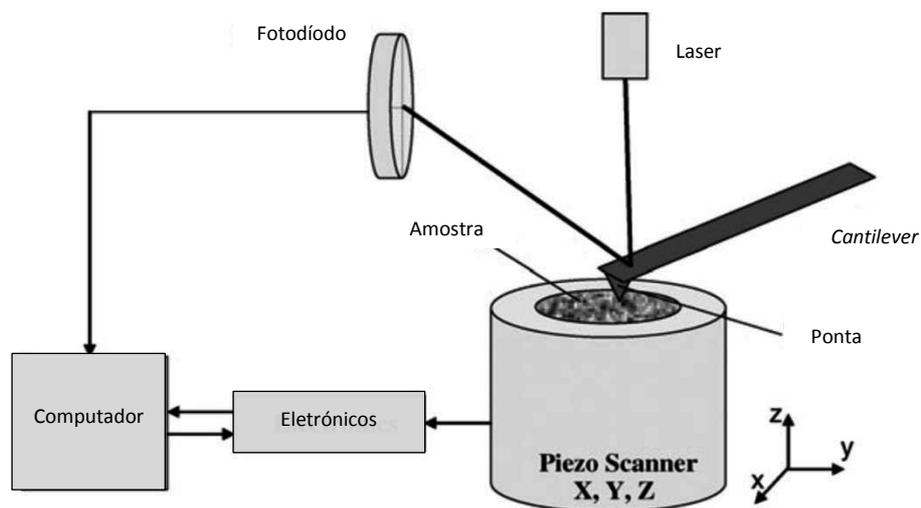


Figura 2.3. Esquema simplificado do funcionamento de um microscópio de força atômica [51].

2.3.4. Potencial Zeta

O potencial zeta de um material é um indicador chave para a caracterização da estabilidade de diversas amostras, ao revelar informações sobre a carga elétrica efetiva na superfície das nanopartículas. A partir desta medição é possível ainda extrair informações acerca da concentração, distribuição, adsorção, ionização e exposição de uma amostra [42][45][52][53]. Quer se trate de suspensões coloidais ou de superfícies já conformadas, a determinação do potencial zeta dá informação sobre a carga da superfície, nomeadamente a distribuição de grupos químicos com tendência a dar origem a cargas positivas ou negativas.

Numa solução iónica, a superfície de uma partícula carregada está firmemente ligada a iões carregados, formando uma fina camada líquida intitulada por camada de Stern, que é englobada por uma camada externa difusa que consiste em iões fracamente associados. Essas duas camadas formam a dupla camada elétrica e o potencial elétrico na superfície de corte é chamado de potencial zeta (ζ). Quando em valores no intervalo

de +30 a -30 mV e sobretudo em suspensões coloidais, normalmente indica partículas com condições de instabilidade, agregação, coagulação ou floculação. Muitos fatores podem influenciar o potencial zeta, incluindo pH, concentração e força iónica da solução, bem como a temperatura a que são efetuados os ensaios [43][48][52].

Os filmes foram analisados pelo equipamento SurPASS, da AntonPaar com uma célula de medição de aperto. O eletrólito utilizado nas medições foi uma solução com 1mM de KCl com pH = 7,0.

2.4. Testes Bacterianos

Antes da realização dos testes, os filmes de ZnO foram colocados em placas mutiwells e lavados com 1mL de etanol a 70% para esterilizar quimicamente as superfícies. Em seguida, foi efetuada lavagem dos resíduos do álcool com 1 mL de água destilada e esterilizada.

2.4.1. Avaliação do halo de inibição: filmes de ZnO

Para avaliar o possível efeito antibacteriano dos distintos filmes de ZnO, concebidos com diferentes valores de potência e depositados em silício, realizaram-se testes em meio sólido com três estirpes bacterianas pertencentes à coleção da cultura do Laboratório de Microbiologia da FCTUC (Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra). Para a seleção das estirpes a usar nos testes antibacterianos, foram eleitas aquelas que usualmente são encontradas em ambiente hospitalar, sendo elas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Estes ensaios foram executados em meio de cultura *Lysogeny broth* (LB) com 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de cloreto de sódio e 15 gramas de agar em 1L de água desionizada e distribuído em caixas de Petri com cerca de 20 mL de meio em cada. Posteriormente, foram preparados 10 mL de três suspensões bacterianas, provenientes das três estirpes, com 0,5 unidades de turbidez na escala de McFarland, num meio com 10 mL de cloreto de sódio a 0,85% (p/v). Deste modo, numa câmara de fluxo, em

ambiente estéril, e com uma alça de Drigalsky procedeu-se ao espalhamento homogéneo, no meio de cultura LB, de 100µL de cada suspensão bacteriana preparada (Figura 2.4.).

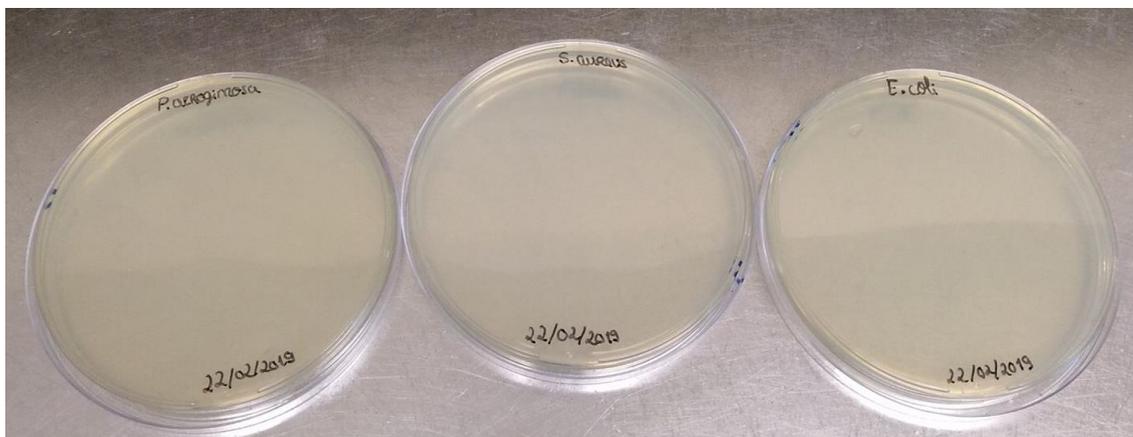


Figura 2.4. Placas de Petri espalhadas com 100µL de cada uma das três suspensões bacterianas no meio de cultura LB.

Os testes realizados com os diferentes filmes de ZnO ocorreram segundo duas condições diferentes para cada estirpe: uma normal em que as superfícies dos filmes foram colocadas diretamente no meio de cultura com as bactérias (Condição 1) e outra com uma precedente irradiação UV, com comprimento de onda de 254nm, dos filmes durante 15 minutos a uma altura de 13,8 cm (Condição 2).

Nestas condições foram realizados dois ensaios independentes, em dois dias diferentes, com o propósito de demonstrar a reprodutibilidade dos ensaios e para obter resultados comparáveis.

Estes testes foram efetuados em triplicados para cada uma das estirpes bacterianas selecionadas (Figura 2.5.).

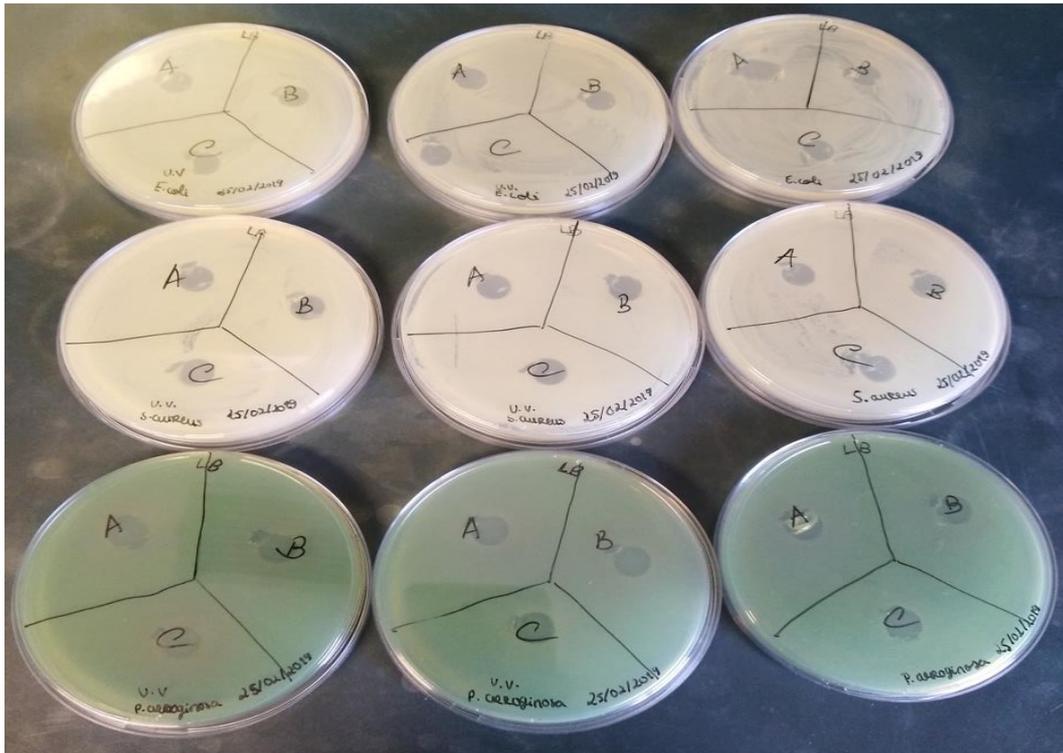


Figura 2.5. Exemplo dos ensaios realizados em triplicados para cada uma das estirpes.

2.4.2. Avaliação do halo de inibição: filmes de ZnO com óleo de limão

Para a realização destes testes utilizou-se apenas um tipo de filmes de ZnO (Zn2) e meios de cultura LB e *Reasoner's 2A agar* (R2A) para comparar e verificar se o meio teria alguma influência na atividade antibacteriana dos filmes de ZnO. Na preparação do meio de R2A foi utilizado 1g de extrato de levedura, 1g de peptona, 1g de casaminoácidos, 1g de amido, 0,6g de piruvato, 0,6g de fosfato de potássio, 0,048 g de sulfato de magnésio e 30g de agár em 2L de água desionizada. O meio LB foi preparado da mesma forma que no teste anterior e posteriormente ambos foram distribuídos em caixas de Petri com cerca de 20mL de meio em cada. As bactérias selecionadas foram as mesmas e a preparação das suas suspensões e respetivo espalhamento nos meios de cultura foram efetuados da mesma forma. O material biológico antibacteriano escolhido para a realização destes testes foi o óleo de limão (produzido pela F.J. Campos).

Para ter um meio de comparação entre a atividade antibacteriana conjunta dos filmes com o material biológico e o seu efeito isolado na inibição do crescimento destes microrganismos, realizaram-se testes de controlo em triplicados. Também com o objetivo de comparar os resultados destes testes com os anteriores, as condições a que os filmes foram expostos mantiveram-se inalteradas. Nos testes de controlo, os filmes foram colocados diretamente no meio de cultura com as bactérias e o óleo de limão (2 μ L) foi pipetado diretamente para um papel absorvente estéril e colocado em contacto com os microrganismos. Para cada estirpe realizaram-se três testes, sendo que dois deles foram realizados em meio de cultura LB e o restante em meio R2A.

Numa fase posterior, procedeu-se à ligação dos filmes de ZnO com o material biológico numa placa multiwell com a parte ativa dos filmes virada para cima para permitir que a ligação ocorresse. Neste contexto, nos poços das multiwells adicionou-se 50 μ L de óleo de limão e 50 μ L de uma solução tampão de acetato 0,1M pH=4 com carbodiimida (4mg/mL) (da Sigma-Aldrich), ficando a incubar a 4 °C num shaker durante 24 horas.

Para que os filmes de ZnO pudessem ser observadas em SEM após os testes com as bactérias, estes tiveram de passar previamente por um processo de lavagem, fixação química e desidratação com etanol. Todas estas etapas foram executadas em multiwells. Para o primeiro passo, as superfícies foram lavadas duas vezes com 1mL de cloreto de sódio a 0,85% num shaker a 50 rotações por minuto durante 10 minutos, com o objetivo de remover as células que não estariam devidamente aderidas à superfície. Na fixação, os filmes foram tratados com 1mL de uma solução de glutaraldeído a 2,5% num shaker a 50 rpm durante 15 minutos, de forma a garantir a conservação das estruturas celulares antes de se passar para o processo de desidratação. Nesta última etapa, removeu-se novamente o sobrenadante resultante do processo de fixação e posteriormente desidrataram-se as superfícies com 1mL de cada uma das soluções de etanol a 70%, 80%, 90%, 95% e finalmente a 100% num shaker a 50 rpm e durante 15 minutos, removendo sempre o sobrenadante entre cada desidratação e repetindo o último passo com etanol a 100%. Todas as soluções para este último processo foram preparadas a partir de etanol absoluto. Por fim, as superfícies foram deixadas a secar, por evaporação do etanol, na câmara de fluxo laminar.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

Esta dissertação tem como objetivo complementar os resultados de uma outra dissertação de mestrado efetuada há dois anos [41]. O tema era também a deposição de filmes finos de ZnO, pela mesma técnica, mas com tempos de deposição menores, o que deu origem a filmes com superfícies menos rugosas e mais niveladas.

Algumas das propriedades/características são comuns aos filmes finos depositados nesta dissertação e na anterior, pois foi constatado que a espessura não afetava as características que se encontram a seguir discriminadas:

- Estrutura: filmes finos nanocristalinos com elevada percentagem de amorfismo;

- Química: filmes finos com Zn, O e C na sua composição; as análises por FTIR e XPS permitiram identificar as seguintes ligações e grupos químicos funcionais Zn-O, O-H, C=O e -COOH.

- Molhabilidade: todos os filmes finos de ZnO apresentavam ângulos de contacto estático com a água de cerca de 65 °.

3.1. Espectroscopia de UV-Vis

Dado que a aplicação final dos filmes finos de ZnO, desde que apresentem as propriedades antibacterianas desejadas, é o revestimento de superfícies de equipamentos não críticos em ambiente hospitalar, a caracterização foi iniciada pela avaliação da transparência dos revestimentos para comprimentos de onda na gama do UV-visível (Figura 3.1.).

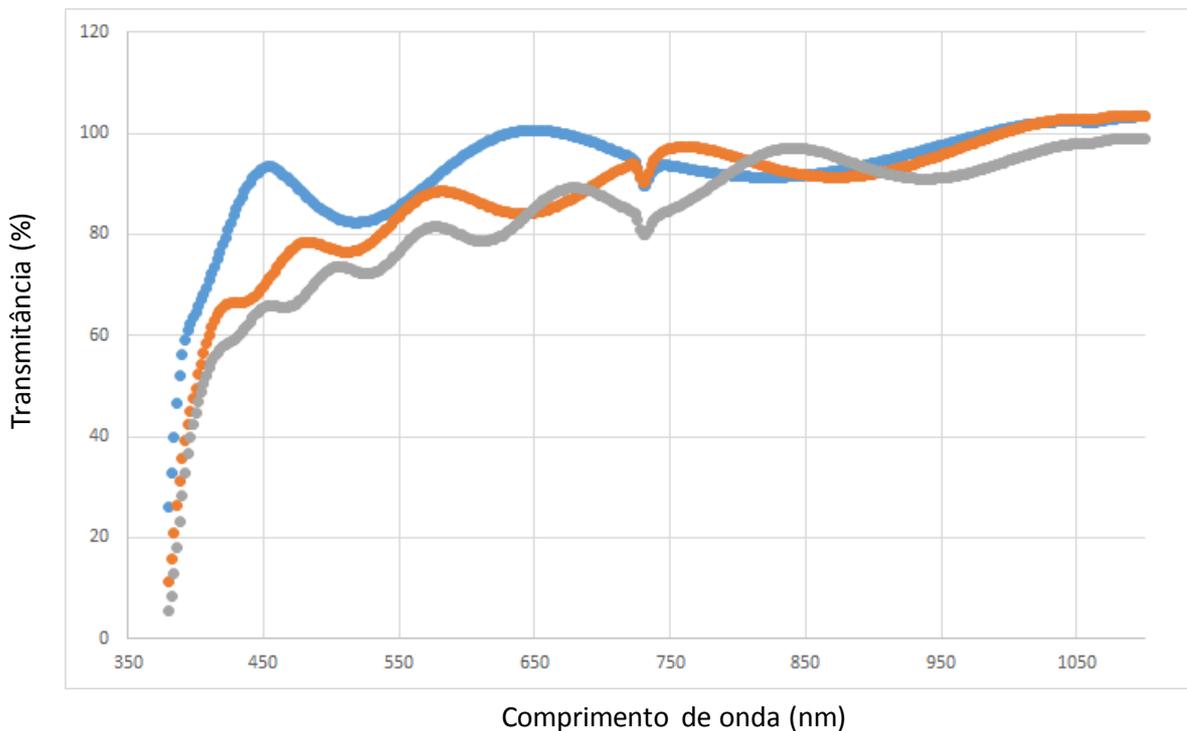


Figura 3.1. Espectros de UV-visível dos filmes finos de ZnO: Zn1 - azul; Zn2 - laranja; Zn3 - cinzento.

A análise do espectro dos UV-VIS dos filmes de ZnO, depositados sobre lamelas de vidro, decorreu na faixa entre 350 a 1100 nm. Tal como seria expectável a *Clique ou toque para introduzir uma data.*transmitância é maior para os filmes finos menos espessos, se bem que a diferença só se torna mais significativa para os comprimentos de onda menores. Pela análise geral dos espectros é possível observar que para valores de comprimento de onda inferiores a 400 nm a transmitância decresce abruptamente, devido à absorção da luz visível e UV pelo vidro que serve de substrato. É ainda possível observar um decréscimo de transmitância na zona dos 700 nm, o qual corresponde a uma falha do equipamento [41][54][55].

De um modo geral pode afirmar-se que os filmes finos de ZnO possuem uma transparência ótica na região do visível que permite a sua utilização sobre superfícies transparentes, como, por exemplo, ecrãs de computador.

3.2. Morfologia e Topografia

Os filmes finos podem ser constituídos por grãos (estrutura cristalina) que variam desde alguns nanômetros até vários micrômetros e a sua formação é descrita como um processo cinético de adsorção e difusão de átomos individuais. O processo tem o seu início pela nucleação das espécies que chegam ao substrato, seguida da coalescência e subsequentemente o aumento da espessura, pelo que todos os estados podem ser influenciados pelos parâmetros de deposição. A nucleação começa com a formação de ilhas tridimensionais concebidas a partir do crescimento e criação de núcleos que dependem das energias de interação dos átomos do substrato com os adátomos que aí chegam. O mecanismo mais comum para este passo, e que ocorre na maioria dos materiais metálicos, é o de Volmer-Weeber. O passo seguinte, denominado de processo de coalescência, consiste no crescimento das ilhas até ao ponto em que estas se tocam para formarem uma rede contínua. A transição de ilhas isoladas para uma rede contínua pode ser caracterizada por uma espessura de limiar de percolação [56].

As micrografias SEM dos filmes finos de ZnO estão apresentadas na Figura 3.2. e serão utilizadas para analisar as secções transversais e superficiais das amostras. Esta análise terá em conta o impacto da potência fornecida aos alvos na morfologia e topografia dos filmes finos, pois este foi o único parâmetro que diferenciou na deposição das diferentes superfícies.

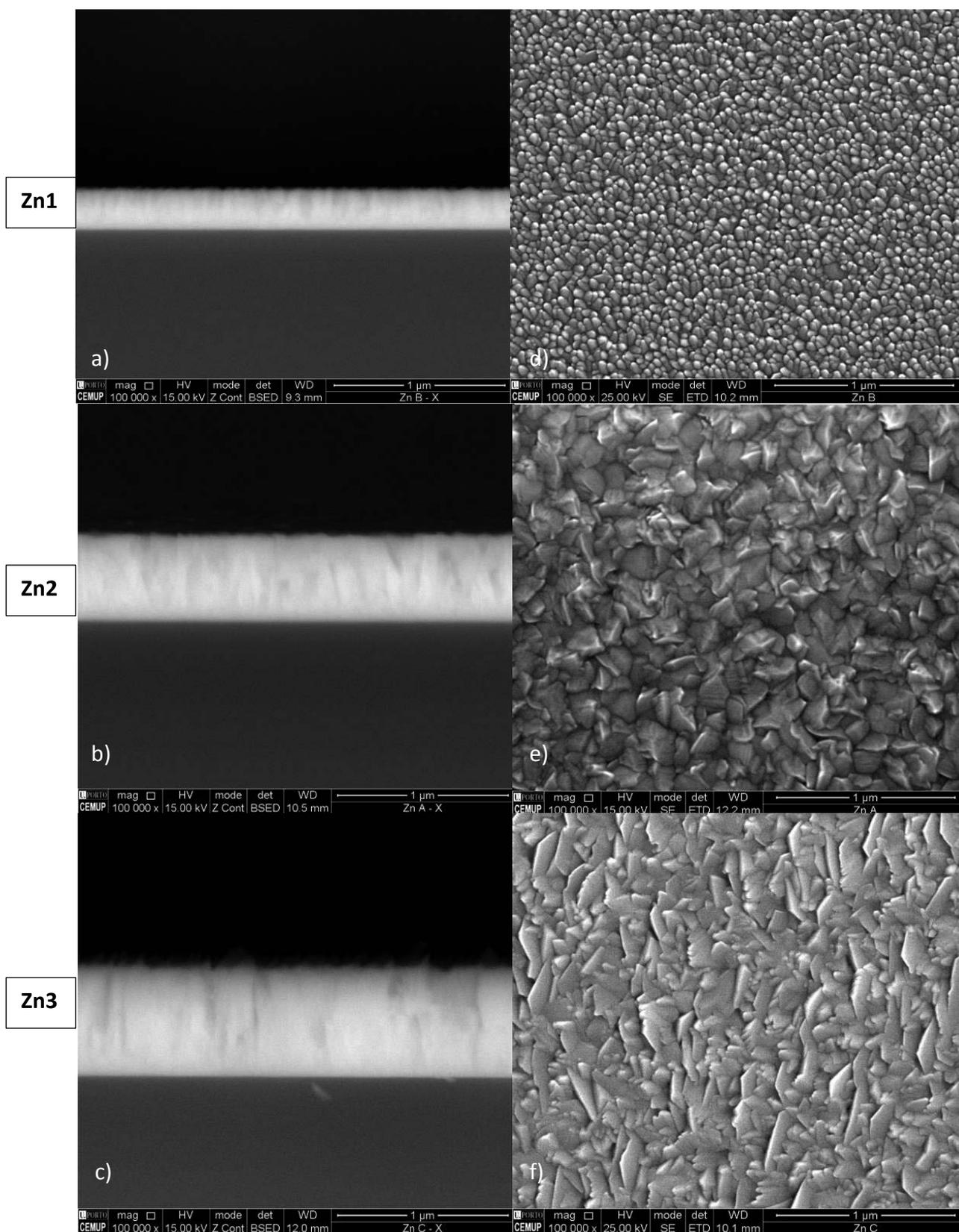


Figura 3.2. Micrografias SEM dos filmes finos de ZnO da secção transversal (a, b, c) e superficial (d, e, f).

A partir das micrografias da secção transversal dos filmes finos é possível observar que quanto maior a densidade da potência mais espesso é o filme, apresentado valores médios de 283 nm, 567 nm e 750 nm para os filmes Zn1, Zn2 e Zn3, respetivamente. Tal resultado é expectável, pois quanto maior a densidade de potência, maior a densidade de espécies ejetadas e que vão contribuir, após deposição no substrato, para o aumento da espessura do filme fino.

Uma vez que as micrografias transversais representam diferentes fases de crescimento dos filmes finos de ZnO é possível inferir que estes possuem uma morfologia colunar em forma de V, observando-se um aumento da largura das colunas com o aumento da espessura dos revestimentos, associado a uma maior densidade de potência fornecida ao alvo. Estes filmes finos apresentam uma estrutura típica do ZnO, sendo densos nas regiões inferiores e abrindo-se em colunas nas regiões superiores [57].

O mecanismo de formação da estrutura colunar em forma de V é atribuído ao crescimento competitivo devido a diferenças na energia superficial das faces cristalinas vizinhas na superfície livre dos filmes finos. Uma ilustração esquemática da morfologia do ZnO com espessura crescente é apresentada na Fig. 3.3. [57].

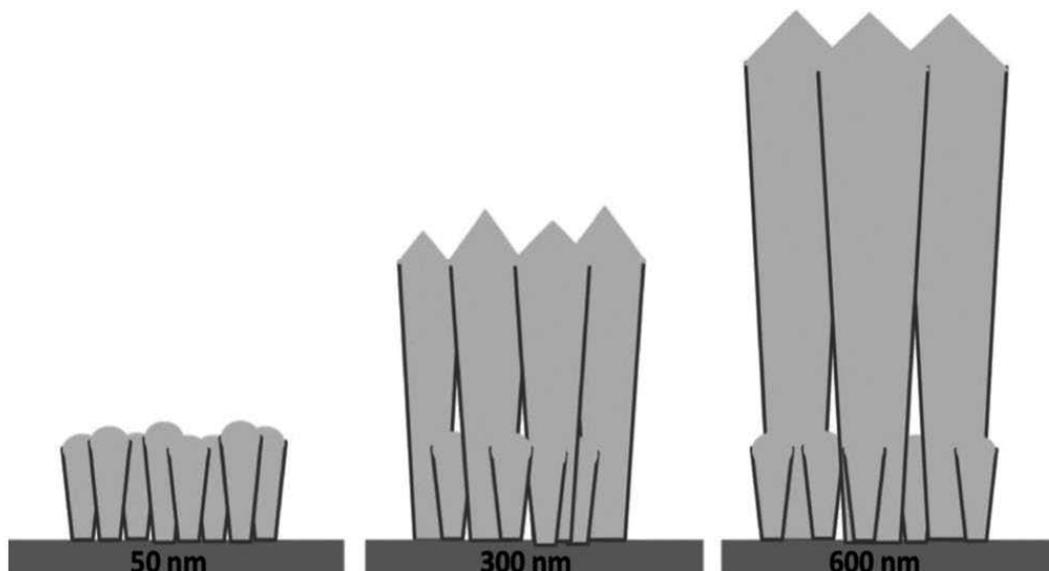


Figura 3.3. Ilustração esquemática da morfologia do ZnO com espessura crescente [57].

Um estudo demonstrou que amostras com espessuras entre 50 a 100 nm apresentavam menor inibição bacteriana quando comparadas com superfícies mais espessas (200-600 nm) e que a razão para este acontecimento seria o aumento da área da superfície dos filmes, pois um maior comprimento das colunas levaria a uma maior difusão por parte dos íons Zn^{2+} . Para valores superiores a 200 nm as superfícies apresentaram uma atividade antibacteriana semelhante, o que sugere que existe uma espessura máxima acima da qual a taxa de inibição bacteriana não é alterada de forma significativa. A partir deste estudo retirou-se ainda que as espessuras ideais para a obtenção de filmes finos de ZnO antibacterianos se encontrava entre 200 e 600 nm [57].

Visto que todos filmes finos depositados (Zn1, Zn2 e Zn3) possuem espessuras superiores a 200 nm é expeável que os resultados para os testes bacterianos sejam análogos. Contudo, como o Zn3 é o único filme que se encontra fora do intervalo ideal de espessura, então teoricamente, este seria o material menos indicado para servir de revestimento antibacteriano de superfícies.

A área de superfície ativa depende de três fatores: comprimento da coluna, largura da coluna e percentagem de espaços vazios entre as colunas [57].

As micrografias superficiais evidenciam que quanto maior a densidade de potência aplicada ao alvo, mais angulares e rugosas serão as superfícies das amostras, consequência do crescimento referido anteriormente, aumentando assim a sua área de superfície e possibilitando uma maior interação com as bactérias.

De modo a fundamentar o que foi acima discutido serão apresentado os modelos de zona de estrutura que têm sido amplamente utilizados para classificar a morfologia dos filmes finos. O modelo inicial foi proposto por Movchan e Demchishin (MD) e descreve a morfologia de filmes metálicos evaporados a partir de T/T_m , onde T é a temperatura do substrato e T_m a temperatura de fusão do material depositado, ambos em Kelvin. Posteriormente, Thornton acrescentou ao modelo inicial de MD a pressão de deposição como um parâmetro no modelo de zona da estrutura para descrever o efeito da mobilidade dos adátomos, induzidos pelo bombardeamento de partículas energéticas, no sistema de pulverização catódica [58].

O diagrama de Thornton (Figura 3.5.) consiste em quatro zonas, cada uma com a sua própria estrutura característica [58]:

- i) zona 1, e o filme resulta numa estrutura porosa com granulação fina.
- ii) zona de transição T, na qual a difusão superficial rege a morfologia dos filmes como na zona 2, contudo os filmes são lisos e densos, preservando ainda uma textura fibrosa, como na zona 1.
- iii) Na zona 2, a difusão superficial é o principal processo na evolução morfológica e o filme é composto por grãos colunares com maior largura.
- iv) Na zona 3, o filme resulta numa estrutura granular equiaxial irregular.

A partir deste diagrama, é possível observar a morfologia superficial e transversal expetável para as superfícies em questão.

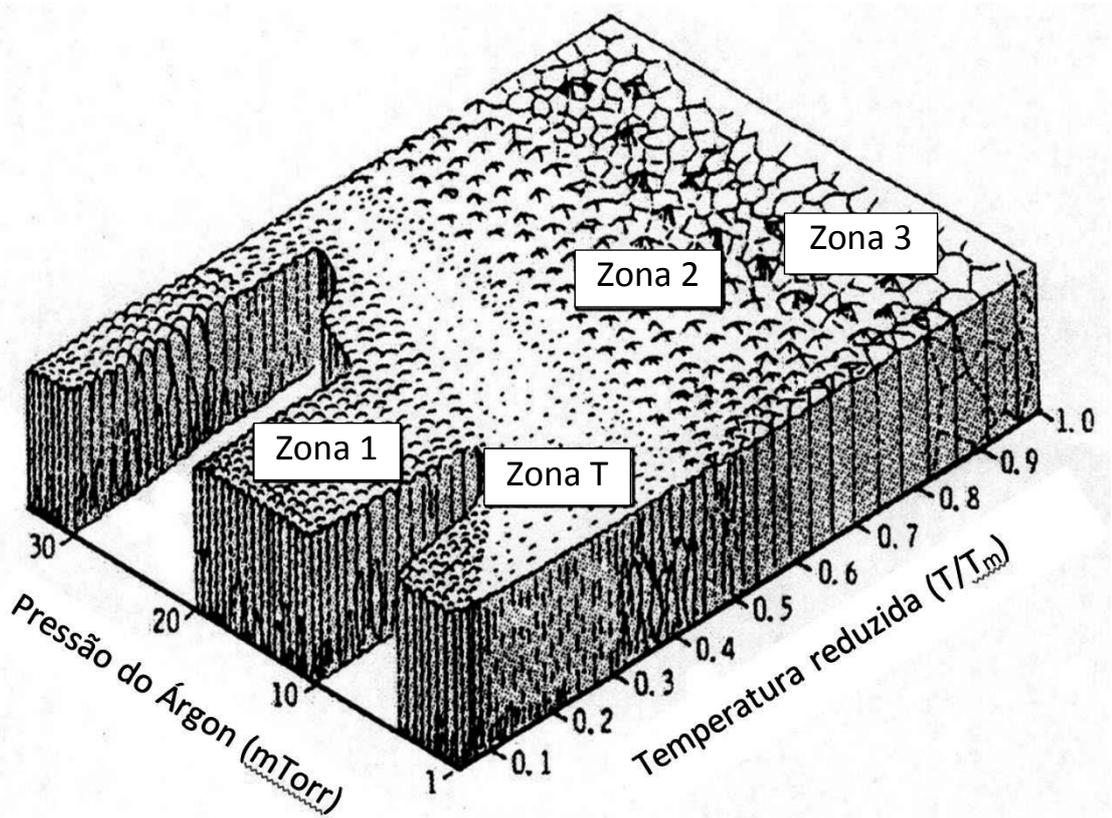


Figura 3.4. Diagrama de *Thornton* (Adaptado de [59]).

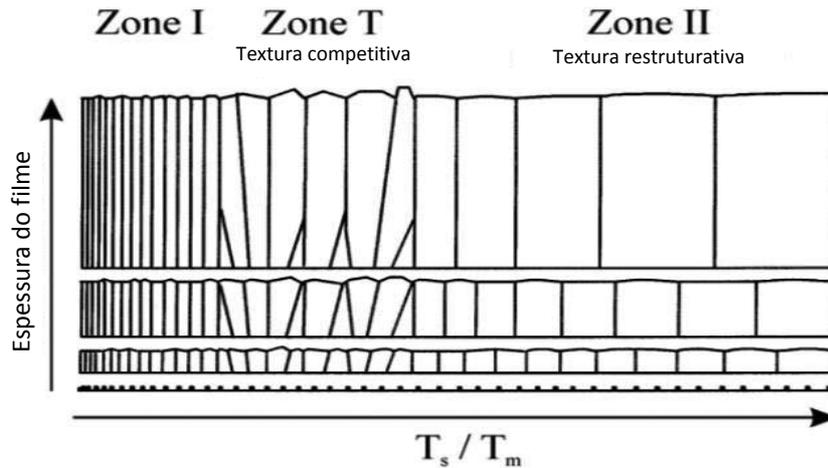


Figura 3.5. Modelo de zona de estrutura básica para filmes elementares (Adaptado de [60]).

Os filmes foram depositados a uma pressão de deposição de 0,7 Pa, o que equivale a $7\mu\text{bar}$ e a 10mTorr. Estes valores nas duas figuras (Fig. 3.4. e Fig. 3.5.) indicam que todas as superfícies se encontram dentro da Zona T, e que estão de acordo com a morfologia transversal observada nas micrografias SEM.

A zona T é onde o regime de crescimento é mais influenciado pela difusão dos adátomos devido ao aumento da temperatura. Os filmes desta zona caracterizam-se por possuírem uma morfologia colunar em forma de V atribuído ao crescimento competitivo entre os aglomerados vizinhos (Figura 3.5.). Este tipo de superfícies apresentam zonas mais densas nas regiões inferiores e abrem-se em colunas nas regiões superiores, sustentando assim o que foi discutido nas micrografias SEM dos filmes finos [57]

A quantificação dos parâmetros de rugosidade superficial foi analisada com maior precisão pela análise das superfícies por AFM. Estas imagens topográficas obtidas com esta técnica encontram-se apresentadas na Figura 3.6., tendo sido efetuados varrimento em duas áreas distintas: $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ e $5 \times 5 \mu\text{m}^2$.

Estudo da Rugosidade

As imagens tridimensionais de topografia em AFM, fornecem dados quantitativos, na nanoescala, sobre a rugosidade das superfícies dos filmes finos. Estes

dados podem ser pertinentes na discussão do impacto das condições de deposição nas superfícies das amostras.

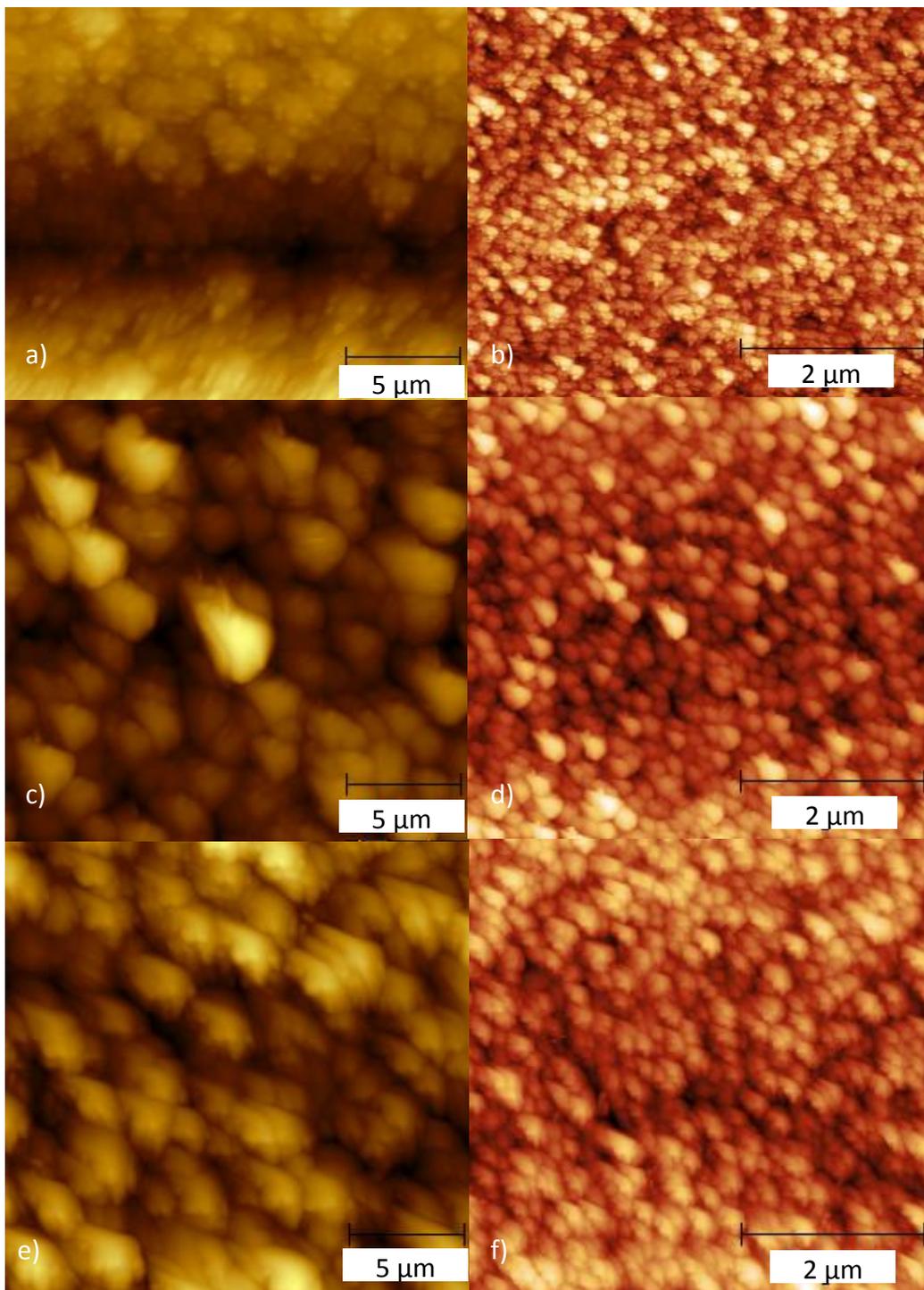


Figura 3.6. Imagens AFM topográficas dos filmes Zn1 (a, b)), Zn2 (c, d)) e Zn3 (e, f)) com imagens de $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ do lado direito e de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ do lado esquerdo.

Os parâmetros de rugosidade calculados no AFM incluem:

$$S_{rms} \text{ (Rugosidade superficial média quadrada)} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i^2}$$

$$S_a \text{ (Rugosidade superficial média)} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i$$

onde z_i representa a altura num determinado pixel i e N é o número total de pixels na imagem. Para as equações, o símbolo S é utilizado em vez do R no caso da amostra ser uma superfície, o que acontece neste contexto [61].

As superfícies menos irregulares são caracterizadas por apresentarem valores de S_{rms} e S_a análogos. Por outro lado, as superfícies mais irregulares apresentam valores de S_{rms} mais elevados do que os de S_a . Tal é devido a um maior número de picos e vales, variando assim de uma forma mais drástica a altura nos diferentes pixels. A partir da relação S_{rms}/S_a é ainda possível avaliar se existe uma distribuição Gaussiana, caso os valores estiverem entre 1,25 e 1,31, para as rugosidades das superfícies das amostras. Se o valor calculado, não estiver dentro deste intervalo é possível aplicar o conceito de *Kurtosis* (S_{ku} - adimensional) e concluir que:

- i) $S_{ku} < 3$, as superfícies são consideradas achatadas.
- ii) $S_{ku} = 3$, as superfícies apresentam uma disposição completamente aleatória, entre picos e vales.
- iii) $S_{ku} > 3$, as superfícies são consideradas pontiagudas.

Por fim, foi ainda determinado sobre o plano médio, o valor para a simetria das variações, pelo modelo estatístico de *skewness* (S_{sk} - adimensional) [41].

Todos estes valores foram calculados automaticamente pelo software Gwyddion® e encontram-se apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Parâmetros de rugosidade.

	S_a (nm)	S_{ms} (nm)	Skewness	Kurtosis	Área de superfície (μm^2)
Zn1	7,000	8,900	0,501	0,127	25,800
Zn2	14,900	19,000	0,608	0,433	26,100
Zn3	20,100	24,700	0,198	-0,279	26,800

Como seria de esperar, pela observação das micrografias SEM superficiais dos filmes de ZnO, as superfícies mais rugosas são as que foram depositadas com uma densidade de potência mais elevada, nomeadamente as Zn3, seguidas pelas Zn2 e por fim pelas Zn1. Pela análise da tabela 3.1. é possível retirar que a rugosidade superficial média quadrática (S_{ms}) e a rugosidade superficial média (S_a) é superior para os filmes finos Zn3.

Todos os filmes exibem valores de *Kurtosis* muito inferiores a 3, sendo desta forma consideradas superfícies mais achatadas com irregularidades suaves, como tal não existem picos e vales com amplitudes, em relação à linha média, demasiado díspares.

Em relação à análise de *Skewness*, todos os valores apresentados na tabela são positivos o que indica uma grande quantidade de número de picos.

Por fim, a área de superfície está de acordo com o já esperado, pois o filme mais rugoso (Zn3) é aquele que apresenta um maior valor para este parâmetro, seguido respetivamente pelo Zn2 e pelo Zn1.

3.3. Potencial Zeta

Através da determinação do potencial zeta, foi possível obter valores para a carga da superfície dos filmes de ZnO quando estes se encontram em contacto com este eletrólito [41].

Sabendo que na superfície das bactérias Gram-negativas e das Gram-positivas existem grupos químicos funcionais, que podem ser básicos ou ácidos e que estes por sua vez estão intimamente ligados a fosfolípidos, lipossacarídeos ou peptidoglicanos, então é possível calcular o seu potencial zeta. Na generalidade, as bactérias que existem nos diferentes ecossistemas apresentam valores negativos de superfície para o

potencial zeta. Por este motivo, e em princípio, os filmes que também apresentem cargas negativas na sua superfície, são teoricamente considerados os que terão uma melhor capacidade em não permitirem a adesão irreversível destes microrganismos, por repelirem as cargas existentes na superfície dos mesmos [41][62].

Os valores para o potencial zeta, avaliados para as superfícies dos filmes finos de ZnO, encontram-se representados na tabela 3.2. A partir destes dados podemos afirmar que o valor da carga superficial para todos os filmes é negativo, o que favorece e potencializa a ação antibacteriana dos mesmos, pela repulsão das bactérias cuja superfície apresenta carga negativa [41]. Contudo, é de salientar que os filmes do tipo Zn1 são os que apresentam um valor mais negativo e, por isso, teoricamente, seriam estes que iriam repelir os agentes patogénicos de forma mais eficaz, seguidos pelos filmes Zn3 e por fim pelos Zn2. No entanto, deve também ser considerado que Zn1 são os filmes com menor rugosidade superficial, o que, teoricamente, induz uma melhor adesão por parte dos microrganismos.

Tabela 3.2. Valor do potencial zeta dos filmes de ZnO.

	<i>Potencial zeta (mV)</i>	$\sigma (\pm)$
Zn1	-23,6	0,8
Zn2	-14,7	2,3
Zn3	-21,0	0,9

Todas as caracterizações efetuadas, de per si, não são suficientes para concluir a potencial ação das superfícies contra as bactérias, pois todo este processo é muito complexo e depende de uma variedade muito grande de fatores. Por esta razão os testes realizados com os microrganismos para avaliar a ação antibacteriana destes filmes finos foram, numa primeira etapa, efetuados para todas as superfícies em estudo.

3.4. Testes Antibacterianos

3.4.1. Ensaio com os filmes de ZnO

Para determinar e analisar os halos de inibição das culturas bacterianas foi realizado um estudo qualitativo e quantitativo da atividade antibacteriana dos filmes, após inoculação em meio sólido com as estirpes de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A atividade antibacteriana dos filmes contendo ZnO foi analisada para diferentes condições de deposição (Zn1, Zn2 e Zn3) para avaliar qual dos filmes teria uma maior inibição bacteriana, sendo esses posteriormente selecionados para novos ensaios de forma isolada e em conjunto com o óleo de limão. Como já foi mencionado anteriormente, os ensaios foram também realizados em duas condições de luminosidade diferentes (Condição 1 e Condição 2), para aferir se estas teriam algum impacto na atividade antibacteriana das superfícies de ZnO.

A análise das placas de Petri inoculadas decorreu às 24 e 48 horas após o início da incubação das mesmas. Contudo, os resultados serão discutidos apenas para o tempo de incubação de 48 horas (Fig. 3.7), visto que na primeira análise apenas se verificou a existência ou não de contaminação em alguma das placas.

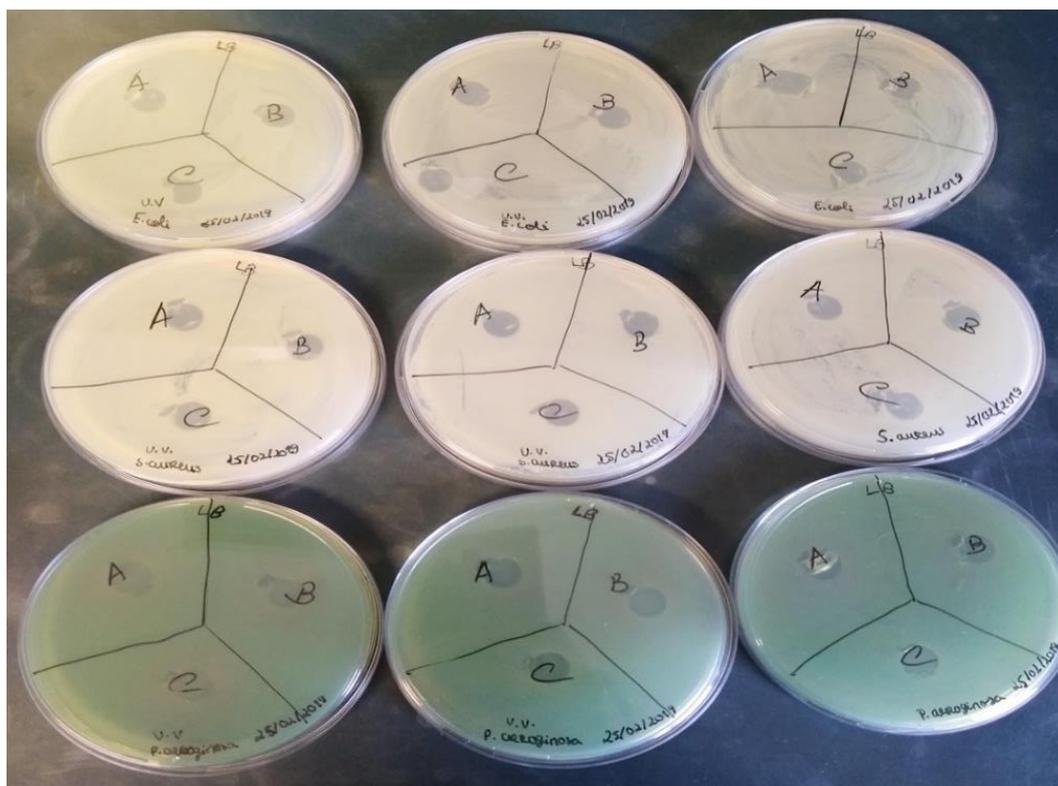


Figura 3.7. Placas inoculadas após 48 horas.

A partir da análise macroscópica das caixas de Petri não foi observado nenhum halo de inibição, em qualquer uma das estirpes e independentemente das condições de luminosidade e de deposição dos filmes. No entanto, existiu um pequeno halo de inibição, com cerca de 1mm, na placa de Petri inoculada com a *S. aureus* pelo filme do tipo Zn1, segundo a Condição 1. O facto de ter apenas existido um halo e na condição em que os filmes não foram irradiados, é contraditório ao que se pode encontrar na literatura, uma vez que a radiação ultravioleta, como já foi referido anteriormente, pode levar à produção de ROS capazes de penetrar as células, inibindo ou matando os microrganismos, aumentando assim a eficiência antibacteriana dos filmes.



Figura 3.8. Halo de inibição, para o filme Zn1 (B) na placa de Petri inoculada com *S. aureus*.

Para as caixas de Petri inoculadas com *P. aeruginosa* e *E. coli* não foi possível observar nenhum halo de inibição em nenhuma das condições, nem para nenhum dos diferentes filmes finos. Tal observação pode ser justificada pelo facto de que para inibir o crescimento de bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) é necessária uma maior concentração de ZnO quando em comparação com as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*) que, por sua vez, poderá estar relacionado à maior suscetibilidade das mesmas a este composto. Esta disparidade deve-se essencialmente às diferenças na constituição da parede celular que existem para estes dois grupos de bactérias, tal como referido e explicado no capítulo 1. Aparentemente, e considerando apenas este ensaio é possível concluir que a ligação das partículas de ZnO à membrana da parede celular das bactérias foi mais eficiente no caso da *S. aureus* [63][64].

Os resultados para estes testes acabaram por ser insatisfatórios pelas poucas conclusões que puderam ser retiradas a partir dos mesmos. É importante realçar que para este tipo de testes é crucial que a concentração de ROS seja suficiente para inibir o crescimento das bactérias e que estes sejam capazes de difundir pelo meio sólido. Só desta forma é que os halos de inibição podem ser eficientes e observados a olho nu. A partir daqui, podemos concluir que a concentração de ROS que alcançou as superfícies das estirpes não foi suficiente para obter halos de inibição satisfatórios. Isto aliado a

possíveis lapsos no decorrer dos ensaios ou até mesmo a contaminações das caixas de Petri impercetíveis a olho nu, pode ter contribuído para os resultados insatisfatórios apresentados [41].

Como, de uma forma geral, os halos de inibição para cada um dos diferentes tipos de filmes não foram muito díspares e tendo em conta que o Zn3 foi o único tipo de filme que se encontra fora do intervalo ideal de espessura (200 a 600 nm) e que uma maior densidade de potência origina superfícies mais angulares e rugosas, aumentando a área de superfície de contacto com as bactérias, procedeu-se à seleção do filme fino do tipo Zn2 para a realização dos ensaios com o óleo de limão.

3.4.2. Ensaios com os filmes de ZnO com e sem óleo de limão

Na realização destes ensaios, os testes de inibição foram executados para o óleo de limão, pipetado diretamente para um papel absorvente em contacto com a caixa de Petri inoculada com as bactérias, e para os filmes do tipo Zn2, cujo procedimento decorreu da mesma forma do que no ensaio anterior, mantendo-se também todas as condições. Estes materiais foram utilizados como teste de controlo na tentativa de comparar o efeito que teriam de forma isolada e conjunta.

O óleo de limão foi o selecionado para estes ensaios dado que este material biológico é conhecido há muitos anos pelas suas propriedades antimicrobianas. Estas características são atribuídas essencialmente à presença de terpenos, terpenóides e compostos aromáticos, responsáveis por afetar as células de diversos agentes patogénicos através de uma grande variedade de mecanismos. Vários estudos confirmaram as propriedades antibacterianas do óleo essencial de limão que mostrou ser inibidor contra muitas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas [36][37][1][65].

Contudo nos ensaios realizados no presente trabalho, o óleo de limão não originou nenhum halo de inibição independentemente da estirpe, como pode ser observado pela figura 3.9.

Concentrações de óleo de limão insuficientes para desencadear a ruptura da membrana celular das bactérias podem ser a justificativa para a observação anterior. Como já foi mencionado anteriormente, a quantidade utilizada foi de 2µL, pois era esta a concentração máxima que poderia ser usada para não fazer com que o óleo de limão transbordasse o papel absorvente. Ainda assim, este valor é muito reduzido o que pode explicar a ausência de halos para este material.

Por outro lado, para este ensaio os halos de inibição para o Zn²⁺ foram surpreendentemente positivos, sendo possível observá-los a olho nu para as duas condições de luminosidade e para as estirpes *S. aureus* e *E. coli*. Estes resultados devem-se à liberação de espécies reativas, como o H₂O₂, OH⁻, O₂ e Zn²⁺, pelo ZnO no meio de cultura, que desencadearam um efeito prejudicial na membrana celular das bactérias causando o vazamento de material genético, lipídios e proteínas das suas células, levando à morte celular [64][66].

É importante realçar que a *P. aeruginosa* possui propriedades muito complexas, incluindo a sua parede celular, o que dificulta a inibição e o aparecimento de halos para este tipo de bactéria. Esta estirpe representa uma das maiores preocupações a nível hospitalar devido à sua multirresistência e por ser muito difícil de erradicar e, por isso os resultados obtidos para a mesma eram já esperados.

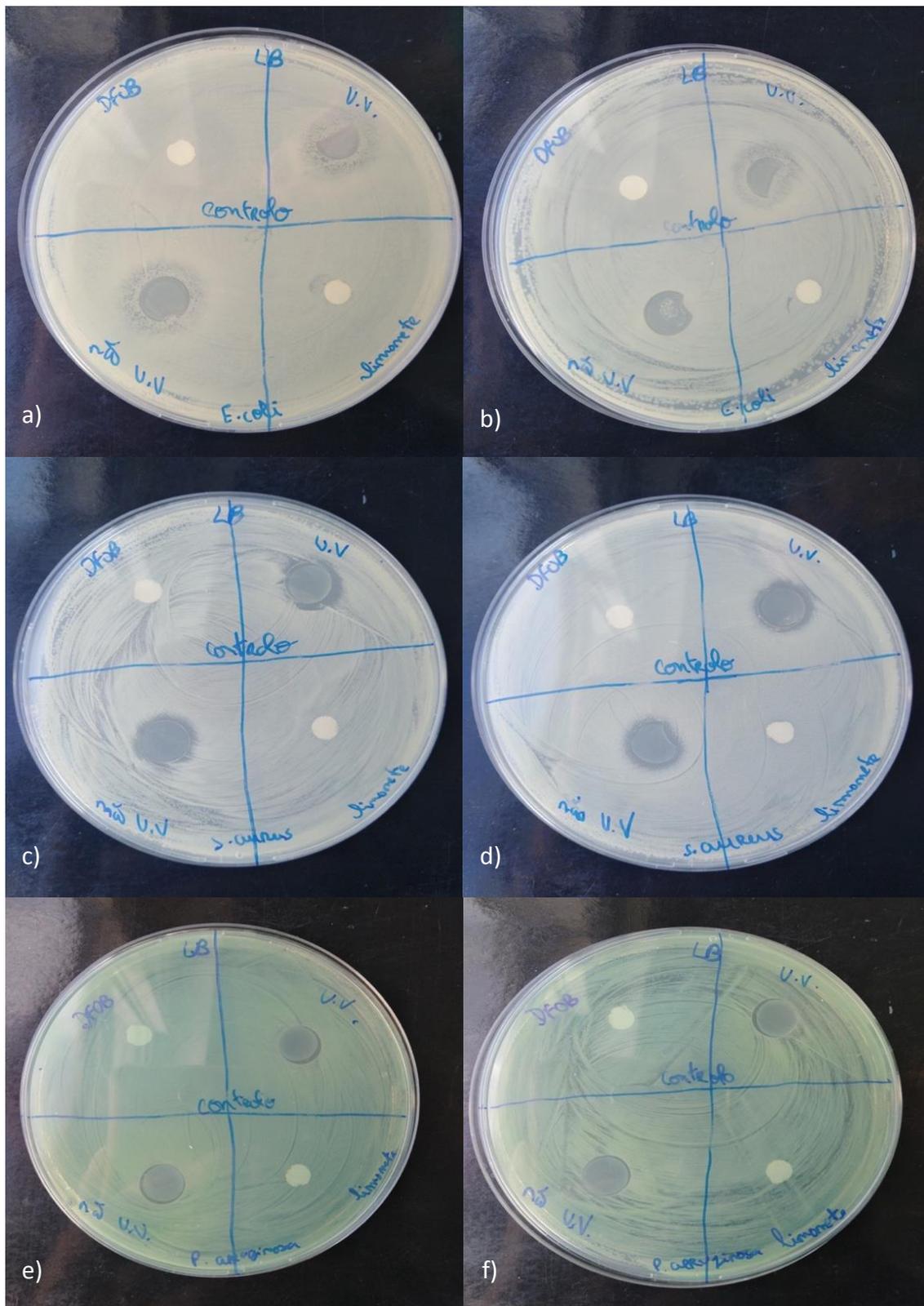


Figura 3.9. Halos de inibição para *E. coli* (a) e b)), *S. aureus*(c) e d)), e *P. aeruginosa* (e) e f)).

Na tabela 3.3. estão representados os valores para os halos de inibição dos filmes Zn₂, em mm, para cada condição e estirpe, mas apenas para os resultados obtidos em meio de cultura LB, já que para o meio R2A não existiram halos de inibição total, apenas uma diminuição de densidade das bactérias para a *S. aureus*. A medição dos halos foi realizada desde o limite dos discos até à zona onde deixa de haver inibição bacteriana.

Tabela 3.3. Valores dos halos de inibição para a *S. aureus* e *E. coli* para os filmes Zn₂.

Halos de inibição (mm)				
Estirpe	Com irradiação UV	Média ± σ	Sem irradiação UV	Média ± σ
<i>E.coli a)</i>	5,00	5,00 ± 0,00	0,00	1,80 ± 2,50
<i>E.coli b)</i>	5,00		3,50	
<i>S. aureus c)</i>	2,50	2,25 ± 0,04	2,00	2,00 ± 0,00
<i>S. aureus d)</i>	2,00		2,00	

Apesar da *P. aeruginosa* não ter apresentado nenhum halo visível em qualquer um dos controlos, foi possível observar uma cor verde mais fluorescente em redor dos filmes.

A partir dos valores resumidos na tabela podemos inferir que os halos de inibição quando comparados com os da dissertação anterior são maiores, facto que poderá ser um indicativo de que os filmes selecionados para estes ensaios, pela sua diferente morfologia e estrutura, apresentam uma maior atividade antibacteriana, já que a sua textura mais irregular e angular contribuiu para fisicamente destruir a parede celular das bactérias e também por apresentarem uma maior área de contacto com os microrganismos [63].

Os valores apresentados na tabela estão de acordo com os encontrados na literatura, pois os halos de inibição para a condição em que os filmes foram irradiados são superiores para todas as estirpes. Tal é consequência do ZnO ter absorvido a radiação ultravioleta de uma forma intensa, potenciando assim uma maior libertação de ROS que ajudou a interagir e destruir a estrutura das bactérias de uma maneira mais eficiente.

Analisando as duas condições de luminosidade podemos concluir que:

i) Os halos de inibição dos filmes do tipo Zn₂ irradiados foram maiores para a *E.coli* quando comparados com os halos observados para a *S.aureus* na mesma condição.

ii) Para a condição sem irradiação na *E. coli* o filme não apresentou qualquer tipo de halo, algo que pode estar relacionado com algum erro no decorrer do teste, podendo mesmo a superfície dopada com Zn₂ não ter ficado em contacto direto com o meio de cultura, dada a dificuldade de perceber qual das faces do filme está depositada com o ZnO, pois estes são transparentes.

iii) A irradiação com UV para os filmes na estirpe de *S. aureus*, apesar de num dos casos ter sido superior, não diferenciou muito quando comparado com os filmes que não foram irradiados.

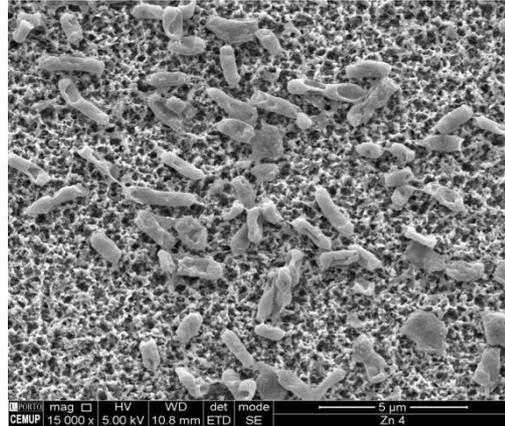
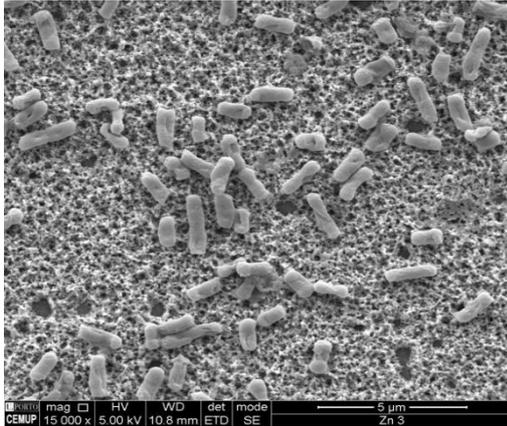
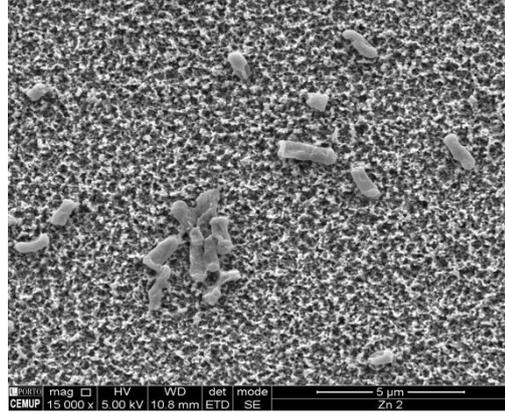
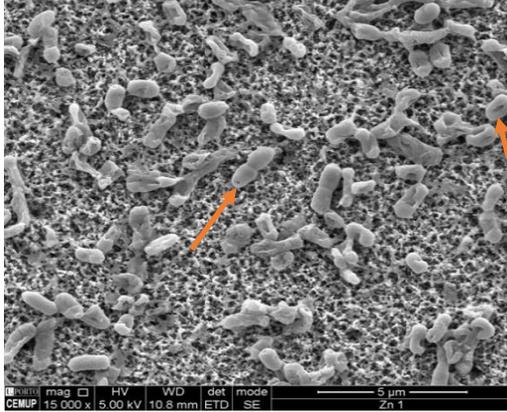
Com o objetivo de entender o comportamento das superfícies de ZnO perante as diferentes estirpes bacterianas recorreu-se ao SEM para analisar com melhor detalhe a capacidade inibitória das amostras. Como o propósito destes filmes é o revestimento de materiais em ambiente hospitalar é de extrema importância avaliar o que sucedeu nas superfícies dos mesmos.

Meio de cultura LB

Meio de cultura R2A

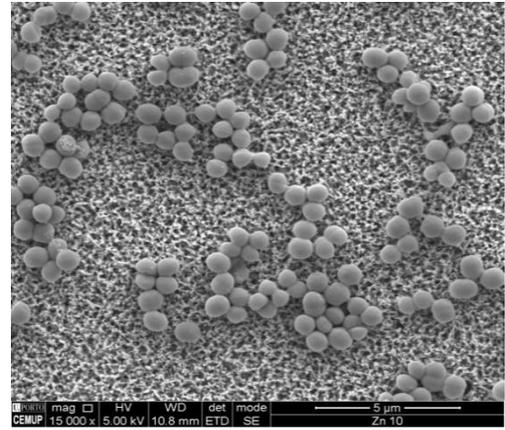
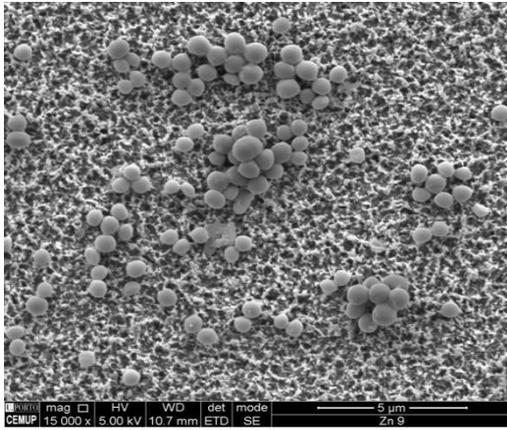
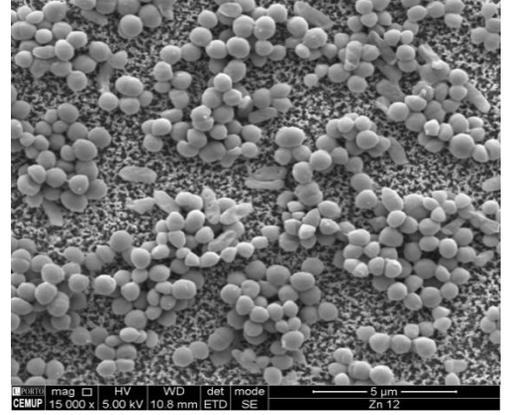
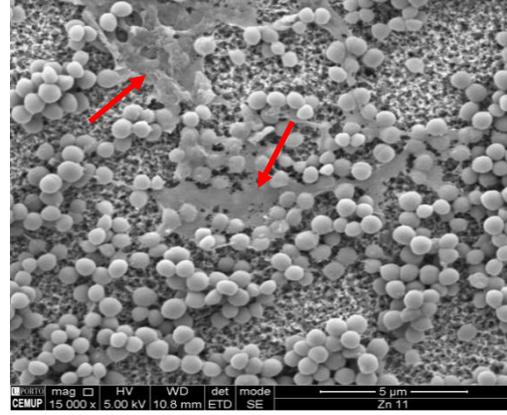
E. coli

UV



S. aureus

UV



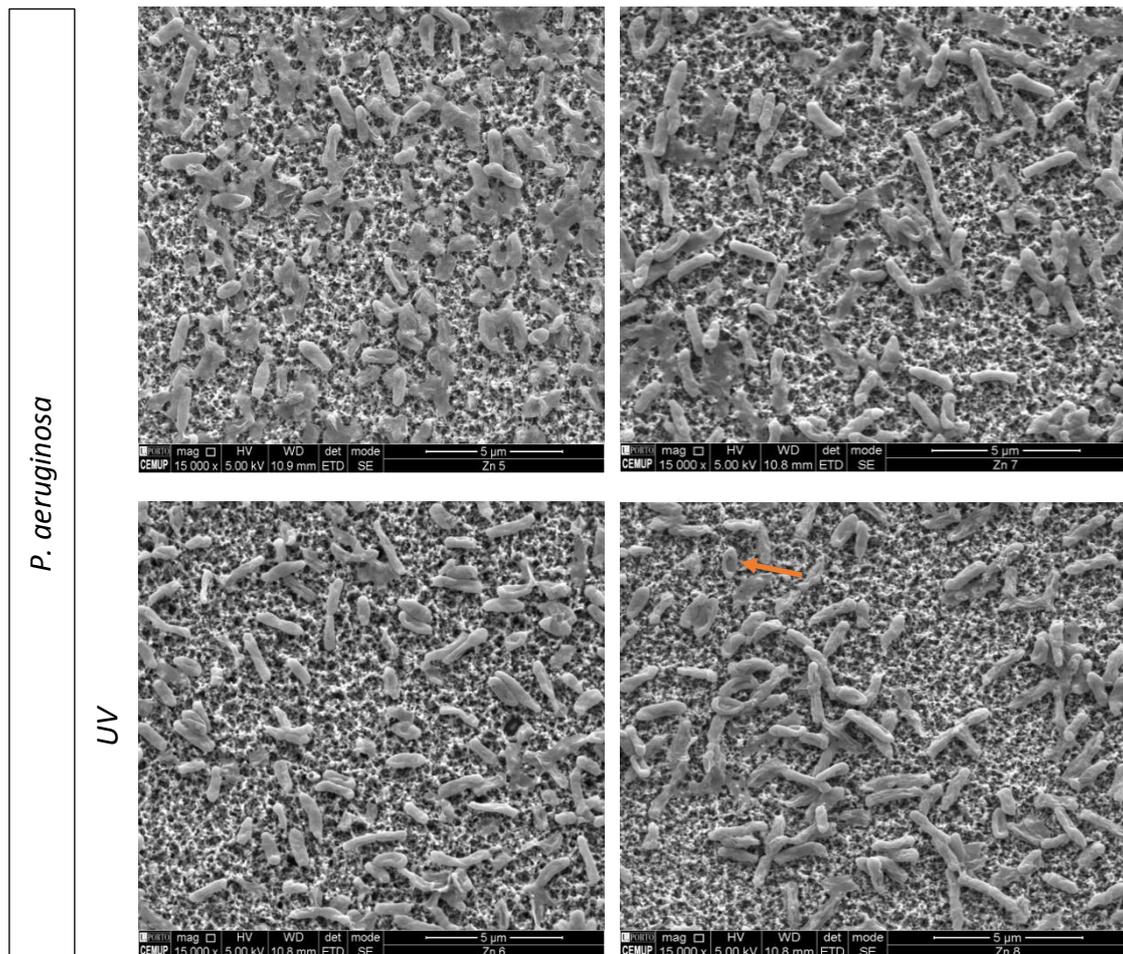


Figura 3.10. Micrografias SEM das superfícies dos filmes do tipo Zn2 incubados em meio de cultura LB (a), (c), (e), (g), (i), (k)) e em meio de cultura R2A (b), (d), (f), (h), (j), (l)) com e sem irradiação UV (c),(d),(g),(h),(k), (l)) e (a),(b), (e), (f),(i), (j)), respetivamente. Para as estirpes de *E. coli* (a),(b),(c),(d)), *S. aureus* (e),(f),(g),(h)) e *P. aeruginosa* (i),(j),(k),(l)).

A partir das micrografias SEM (Figura 3.10.) é possível inferir que o principal mecanismo de inibição bacteriana destes filmes finos de ZnO foi a perda de integridade das membranas microbianas e o vazamento de conteúdo intracelular.

Como a bactéria Gram-positiva (*S. aureus*) está presente em grupos de aglomerados, a sua área de superfície exposta ao ZnO aumenta, levando a uma maior taxa de mortalidade para estes agentes patogénicos. Por outro lado, para as bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), foi observado um maior número de cavidades e enrugamentos nas superfícies das membranas (representado pela seta laranja na figura 3.10.). Embora, este enrugamento se tenha observado principalmente para *E. coli* e *P. aeruginosa*, a perda de viabilidade destas em comparação com a *S. aureus* foi muito menor (facto assinalado pela seta vermelha na figura 3.10.). Com efeito, as

bactérias Gram-negativas aparecem geralmente como células únicas ou emparelhadas diminuindo assim a sua área de contacto e levando a uma menor perda de viabilidade. Contudo, todas as estirpes sofreram danos totais ou parciais das membranas [67].

O dano nas membranas celulares, possivelmente irreversível, ocorreu somente após o contacto direto com os filmes de ZnO, sugerindo que a inibição bacteriana, deste material, é influenciada pelo grau de contacto entre as células dos microrganismos com as superfícies dos filmes, sendo que um contacto próximo entre ambos pode comprometer a integridade das membranas dos agentes patogénicos [67].

A diferença na perda de viabilidade entre as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas pode ser explicada pela tendência destas últimas em formar aglomerados celulares, mas também pela diferença na estrutura da parede de celular. A parte exposta da bactéria que reage de imediato com a superfície de ZnO é a camada da membrana externa para as bactérias Gram-negativas e a camada de peptidoglicanos para as bactérias Gram-positivas. Esta dissimilaridade, desempenha um papel fundamental na determinação do tipo de interações que ocorrem entre as bactérias e o ZnO, pois as bactérias Gram-positivas interagem por ligações eletrostáticas ou de hidrogénio, além da perfuração física das membranas, enquanto que as Gram-negativas interagem apenas por contacto físico direto. A espessa camada de peptidoglicanos das bactérias Gram-positivas e a presença de ácidos teicóicos, lipídeos e aminoácidos, na superfície das mesmas pode ainda ter contribuído para a interação adicional com o ZnO. Por outro lado, a membrana externa das bactérias Gram-negativas forma uma camada protetora extra, essencial à sobrevivência deste tipo de bactérias, oferecendo proteção em ambientes hostis, inclusive na presença de antibióticos, sendo esta a razão pela qual estas bactérias são normalmente resistentes. É ainda de salientar que os resultados para a *P. aeruginosa* foram os mais insatisfatórios pois esta bactéria é capaz de sobreviver a uma ampla gama de ambientes, porque o seu genoma é relativamente grande em comparação com outras bactérias sequenciadas e esta codifica uma grande proporção de enzimas reguladoras importantes para o metabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos. Esta capacidade de codificação aprimorada no genoma da *P. aeruginosa* traduz-se numa grande versatilidade metabólica e alta adaptabilidade às mudanças ambientais [67][68].

Quanto aos resultados para as duas condições de luminosidade, teoricamente esperar-se-ia que os filmes irradiados com UV libertassem uma maior quantidade de radicais livres altamente reativos que danificariam de uma forma mais intensa a parede celular das bactérias, algo que apenas se verificou para o caso da *S. aureus*, onde é possível observar uma menor densidade de bactérias na condição em que os filmes foram irradiados, isto poderá dever-se essencialmente à diferença da estrutura das bactérias Gram-positivas que permitiu uma maior interação com os ROS [69].

Numa fase posterior, tentou proceder-se à ligação dos filmes finos do tipo Zn2 com o óleo de limão, ficando estes a incubar durante 24 horas num *shaker* a uma temperatura de 4 °C. No entanto, foi observada a formação de um material tipo goma por parte do óleo de limão (figura 3.11.) o que impossibilitou a análise da ação conjunta deste material biológico com os filmes finos, pois estes últimos ficaram colados às placas multiwells inviabilizando este teste. Este acontecimento deveu-se, provavelmente, à polimerização do óleo de limão na presença de carbodiimida que deveria efetuar a ligação covalente entre o composto natural e a superfície do filme fino.

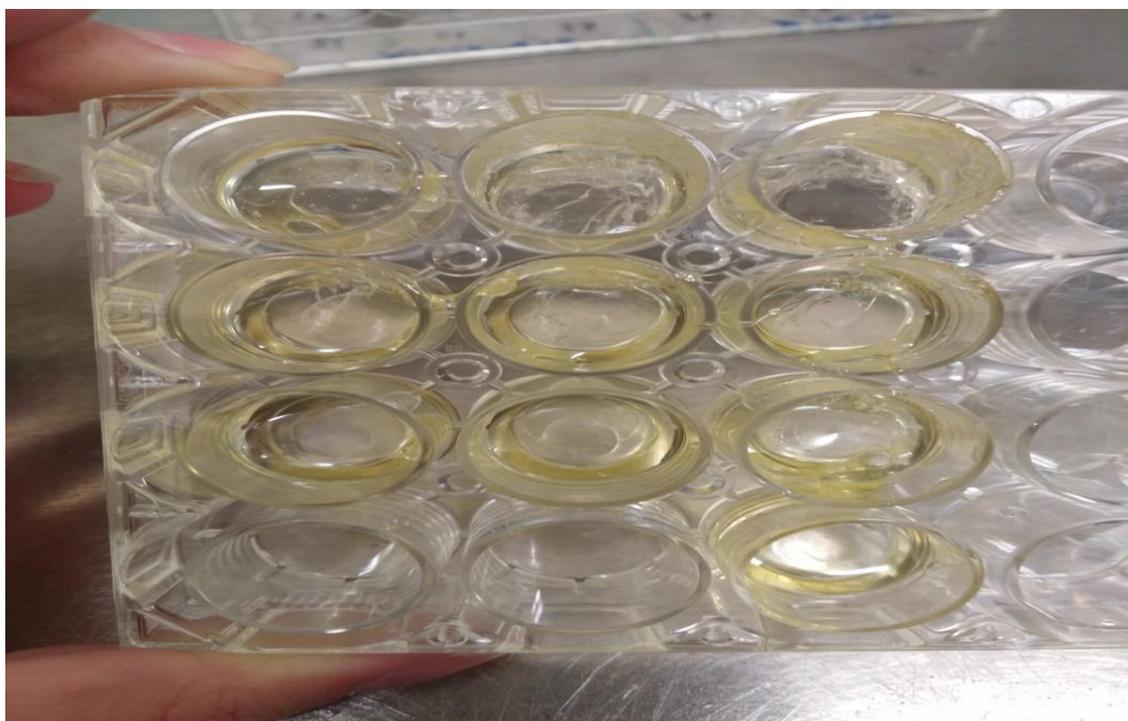


Figura 3.11. Formação de um material tipo goma pelo óleo de limão aquando da ligação do mesmo com os filmes finos do tipo Zn2.

Conclusão

Os resultados decorrentes do trabalho desenvolvido na presente dissertação permitiram retirar algumas seguintes conclusões, a saber:

- As deposições dos filmes finos de ZnO, pela técnica de pulverização catódica, foram bem-sucedidas, demonstrando uma boa adesão do alvo aos diferentes substratos.
- Os valores obtidos para o potencial Zeta, para todas as amostras, foram negativos, apontando desta forma para uma possível repleção entre estes e as bactérias que também apresentam um valor de carga superficial negativo.
- A caracterização morfológica da secção transversal evidenciou que os filmes pertencem à Zona T e que a uma maior densidade de potência correspondia a superfícies mais angulares e rugosas, aumentando assim a sua área de contacto com as bactérias.

Quanto à avaliação das propriedades antimicrobianas dos filmes finos de ZnO, em relação às estirpes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, com incubação feita com e sem pré-irradiação de UV, e com e sem a presença de óleo de limão foi possível concluir que:

- O óleo de limão, de per si, não gerou halos de inibição independentemente da estirpe bacteriana, resultados opostos aos da literatura.
- Os halos de inibição foram significativos para os filmes finos do tipo Zn₂, com e sem luz UV.

- Para a *P. aeruginosa* não foi observado nenhum halo em nenhuma das condições, resultado este que já era esperado devido à complexidade genómica deste agente patogénico.
- Os filmes que foram irradiados apresentaram maiores halos de inibição tanto para a estirpe de *S. aureus* como para *E. coli*, estando de acordo com os resultados reportados na literatura.
- Durante o procedimento de ligação covalente do óleo de limão com a superfície Zn₂, ocorreu a polimerização do composto natural levando à formação de um material tipo goma, o que impossibilitou a análise antibacteriana conjunta destes materiais.

Para trabalhos futuros e no seguimento desta dissertação, seria interessante analisar o resultado conjunto destes filmes finos de ZnO com diversos materiais biológicos antimicrobianos, de forma a avaliar a sua inibição bacteriana de forma isolada e, especialmente, em conjunto.

Em suma, os resultados, particularmente no último ensaio, foram satisfatórios, revelando que estas superfícies podem ser muito úteis para o revestimento de inúmeros materiais, especialmente em unidades de saúde, no intuito de reduzir a transmissão e disseminação de agentes patogénicos.

Referências

- [1] – Saeb, S., Amin, M., Gooybari, R.S. & Aghel, N. (2016). *Evaluation of Antibacterial Activities of Citrus limon, Citrus reticulata, and Citrus grandis Against Pathogenic Bacteria, International Journal of Enteric Pathogens*. doi: 10.15171/ijep.2016.13.
- [2] - Inweregbu, K., Dave, J., & Pittard, A. (2005). *Nosocomial infections. Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain, 5(1), 14–17*. doi:10.1093/bjaceaccp/mki006
- [3] - Duce, G., Fabry, J. & Nicole, L. (Ed.). (2002). *Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide, 2nd ed. Geneva, Switzerland, World Health Organization*.
- [4] - Laurenti, M. & Cauda, V. (2018). *Porous Zinc Oxide Thin Films: Synthesis Approaches and Applications. Coatings, 8(2), 67*. doi: 10.3390/coatings8020067.
- [5] - Apperrot, G., Lipovsky, A., Dror, R., Perkas, N., Nitzan, Y., Lubart, R., & Gedanken, A. (2009). *Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS-Mediated Cell Injury. Advanced Functional Materials, 19(6), 842–852*. doi:10.1002/adfm.200801081
- [6] - Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). *Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(5), 478–482*. doi:10.1016/j.apjtb.2017.01.019.
- [7] - Taylor P. W. (2003). *Multiple Drug Resistant Bacteria. Drug Discovery Today, 8(21), 978–979*. doi:10.1016/s1359-6446(03)02859-9.
- [8] - D'Accolti M., Soffritti I., Piffanelli M., Bisi M., Mazzacane S., Caselli E. (2018). *Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: potential as sanitizing agents. Infection and Drug Resistance, Volume 11, 1015–1026*. doi:10.2147/idr.s170071.
- [9] - Wu Y.-L., Yang X.-Y., Ding X.-X., Li R.-J., Pan M.-S., Zhao X., Hu X.-Q., Zhang J.-J., Yang L.-Q. (2018). *Exposure to infected/colonized roommates and prior room occupants increases the risks of healthcare-associated infections with the same organism. Journal of Hospital Infection*. doi:10.1016/j.jhin.2018.10.014.
- [10] - Mohajeri P., Soltani S., Getso M.I., Khatib M., Dastranj M., Farahani A. (2019). *Investigation of bio-air contamination in some hospitals of Kermanshah, Iran. Adv Hum Biol, 9:65-708*.

- [11] - Kong Q., Kang C., Liu H. (2018). Distribution and drug resistance analysis of multi-drug resistant bacteria in hospital. *Int J Clin Exp Med*, 11(3):2648-2653.
- [12] - Sirelkhatim, A., Mahmud, S., Seeni, A., Kaus, N. H. M., Ann, L. C., Bakhori, S. K. M., Hasan, H., Mohamad, D. (2015). *Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242. doi: 10.1007/s40820-015-0040-x.
- [13] - Liu, J., Wang, Y., Ma, J., Peng, Y., & Wang, A. (2018). *A review on bidirectional analogies between the photocatalysis and antibacterial properties of ZnO. Journal of Alloys and Compounds*.doi:10.1016/j.jallcom.2018.12.330.
- [14] - Facciola A., Pellicano G.F., Visalli G., Paolucci I.A., Venanzi Rullo E., Ceccarelli M., D'Aleo F., Di Pietro A., Squeri R., Nunnari G., La Fauci V. (2019). *The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature, Volume 23, 1266-1278*.doi: 10.26355/eurrev_201902_17020.
- [15] - Otter, J. A., Yezli, S., & French, G. L. (2011). *The Role Played by Contaminated Surfaces in the Transmission of Nosocomial Pathogens. Infection Control & Hospital Epidemiology*, 32(07), 687–699. doi:10.1086/660363.
- [16] - Lax, S., & Gilbert, J. A. (2015). *Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. Trends in Molecular Medicine*, 21(7), 427–432
- [17] - Hostiuc, S., Molnar, A.-J., Moldoveanu, A., Aluas, M., Moldoveanu, F., Bocicor, I., Dacalu, M., Bădilă, E., Hostiuc, M., Negoii, I. (2018). *Patient autonomy and disclosure of material information about hospital-acquired infections. Infection and Drug Resistance, Volume 11, 369–375*.doi:10.2147/idr.s149590
- [18] - Cloutier, M., Mantovani, D., & Rosei, F. (2015). *Antibacterial Coatings: Challenges, Perspectives, and Opportunities. Trends in Biotechnology*, 33(11), 637–652. doi:10.1016/j.tibtech.2015.09.002
- [19] - Bhat, S. S., Qurashi, A., & Khanday, F. A. (2017). *ZnO nanostructures based biosensors for cancer and infectious disease applications: Perspectives, prospects and promises. TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 86, 1–13. doi:10.1016/j.trac.2016.10.001.
- [20] - Elmi, F., Alinezhad, H., Moulana, Z., Salehian, F., Mohseni Tavakkoli, S., Asgharpour, F., Horrieh, F., Elmi, M. M. (2014). *The use of antibacterial activity of ZnO nanoparticles in the treatment of municipal wastewater. Water Science and Technology*, 70(5), 763–770. doi:10.2166/wst.2014.232

- [21] - Zhao, H., Tian, F., Wang, R., Chen, R. (2014). *A Review on Bismuth-Related Nanomaterials for Photocatalysis, Reviews in Advanced Sciences and Engineering, Volume 3, Number 1, 3-27(25)*. <https://doi.org/10.1166/rase.2014.1050>.
- [22] - Hsiao, I.-L., & Huang, Y.-J. (2011). *Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. Science of The Total Environment, 409(7), 1219-1228*.doi:10.1016/j.scitotenv.2010.12.033
- [23] - Zhang, H., Lv, X., Li, Y., Wang, Y., & Li, J. (2009). P25-Graphene Composite as a High Performance Photocatalyst. *ACS Nano, 4(1), 380–386*. doi:10.1021/nn901221k.
- [24] - Huang, Z., Zheng, X., Yan, D., Yin, G., Liao, X., Kang, Y., Yao, Y., Huang, D., Hao, B. (2008). *Toxicological Effect of ZnO Nanoparticles Based on Bacteria. Langmuir, 24(8), 4140–4144*.doi:10.1021/la7035949
- [25] - Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Mädler, L., Gilbert, B., Shi, H., ... Nel, A. E. (2008). *Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. ACS Nano, 2(10), 2121–2134*. doi:10.1021/nn800511k
- [26] - Prasad, R. G. S. V., Basavaraju, D., Rao, K. N., Naveen, C. S., Endrino, J., & Phani, A. R. (2011). *Nanostructured TiO₂ and TiO₂-Ag Antimicrobial Thin Films. 2011 International Conference on Nanoscience, Technology and Societal Implications*.doi:10.1109/nstsi.2011.6111808
- [27] - Dwivedi, S., Wahab, R., Khan, F., Mishra, Y. K., Musarrat, J., & Al-Khedhairi, A. A. (2014). *Reactive Oxygen Species Mediated Bacterial Biofilm Inhibition via Zinc Oxide Nanoparticles and Their Statistical Determination. PLoS ONE, 9(11), e111289*.doi:10.1371/journal.pone.0111289
- [28] - Kitture, R., Koppikar, S. J., Kaul-Ghanekar, R., & Kale, S. N. (2011). *Catalyst efficiency, photostability and reusability study of ZnO nanoparticles in visible light for dye degradation. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 72(1), 60–66*.doi:10.1016/j.jpics.2010.10.090
- [29] - Lam, S.-M., Quek, J.-A., & Sin, J.-C. (2018). *Mechanistic investigation of visible light responsive Ag/ZnO micro/nanoflowers for enhanced photocatalytic performance and antibacterial activity. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 353, 171–184*.doi:10.1016/j.jphotochem.2017.11.021

- [30] - Román, L. E., Huachani, J., Uribe, C., Solís, J., Gómez, M., Costa, S., & Costa, S. (2019). *Blocking erythemally weighted UV radiation using cotton fabrics functionalized with ZnO nanoparticles in situ*. *Applied Surface Science*, 469, 204–212. doi:10.1016/j.apsusc.2018.11.047
- [31] - Joe, A., Park, S.-H., Shim, K.-D., Kim, D.-J., Jhee, K.-H., Lee, H.-W., Heo, C.-H., Kim H.-M., Jang, E.-S. (2017). Antibacterial mechanism of ZnO nanoparticles under dark conditions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 45, 430–439. doi:10.1016/j.jiec.2016.10.013
- [32] - Zhang, H., Chen, B., Jiang, H., Wang, C., Wang, H., & Wang, X. (2011). *A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment*. *Biomaterials*, 32(7), 1906–1914. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.027
- [33] - Yang, M.-Y., Chang, K.-C., Chen, L.-Y., Wang, P.-C., Chou, C.-C., Wu, Z.-B., & Hu, A. (2018). *Blue light irradiation triggers the antimicrobial potential of ZnO nanoparticles on drug-resistant Acinetobacter baumannii*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 235–242. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.02.003
- [34] - Lakshmi, P.V., Vijayaraghavan, R. (2015). *Insight into the Mechanism of Antibacterial Activity of ZnO: Surface Defects Mediated Reactive Oxygen Species Even in the Dark*. *Langmuir*, 31(33), 9155–9162. doi:10.1021/acs.langmuir.5b02266
- [35] - Park, K.-H., Han, G. D., Neoh, K. C., Kim, T.-S., Shim, J. H., & Park, H.-D. (2017). *Antibacterial activity of the thin ZnO film formed by atomic layer deposition under UV-A light*. *Chemical Engineering Journal*, 328, 988–996. doi:10.1016/j.cej.2017.07.112
- [36] - Martelli, G., & Giacomini, D. (2018). *Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. doi:10.1016/j.ejmech.2018.09.009.
- [37] - Podgoreanu, P., Negrea, S.M., Buia, R., Delcaru C., Trusca, S.M., Lazar V., Chifiriuc, M.C. (2019). *Alternative strategies for fighting multidrug resistant bacterial infections*. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, doi:10.33263/BRIAC91.834841.
- [38] - Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H.-G. (2013). *Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(5), 625–644. doi:10.1080/10408398.2011.599504.

- [39] - Lang, G., & Buchbauer, G. (2011). *A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Flavour and Fragrance Journal, 27(1), 13–39.* doi:10.1002/ffj.2082.
- [40] - O'Mahony, R. (2010). *The Antibacterial Properties of Dietary Fruit. Bioactive Foods in Promoting Health, 141–160.* doi:10.1016/b978-0-12-374628-3.00010-4.
- [41] – Barros, S. F. (2017). *Superfícies híbridas nanocompósitas: resposta à colonização biológica.* Dissertação para obtenção de grau de Mestre, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- [42] - Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). *Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. Nanoscale, 10(27), 12871–12934.*doi:10.1039/c8nr02278j
- [43] - Lin P-C, et al. (2013). *Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials, Biotechnol Adv, [http:// dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.0068](http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.0068).*
- [44] – “UV/Vis/IR Spectroscopy Analysis of NPs”, September 2012, NanoComposix (Nanocomposix.com).
- [45] - Rajeshkumar, S., Bharath, L. V., & Geetha, R. (2019). *Broad spectrum antibacterial silver nanoparticle green synthesis: Characterization, and mechanism of action. Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles, 429–444.* doi:10.1016/b978-0-08-102579-6.00018-6.
- [46] - Kohli, R. (2012). *Methods for Monitoring and Measuring Cleanliness of Surfaces. Developments in Surface Contamination and Cleaning, 107–178.* doi:10.1016/b978-1-4377-7883-0.00003-1.
- [47] - Inkson, B. J. (2016). *Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods, 17–43.* doi:10.1016/b978-0-08-100040-3.00002-x.
- [48] - Sapsford, K. E., Tyner, K. M., Dair, B. J., Deschamps, J. R., & Medintz, I. L. (2011). *Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques. Analytical Chemistry, 83(12), 4453–4488.* doi: 10.1021/ac200853a.
- [49] - Baer, D. R., Engelhard, M. H., Johnson, G. E., Laskin, J., Lai, J., Mueller, K., ... Moon, D. (2013). *Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles: Important needs*

and challenging opportunities. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 31(5), 050820. doi:10.1116/1.4818423.

[50] - Boisseau, P., Houdy, P., & Lahmani, M. (Eds.). (2010). *Nanoscience. Nanobiotechnology and Nanobiology*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

[51] - Barattin, R., & Voyer, N. (2008). *Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events. Chemical Communications*, (13), 1513. doi: 10.1039/b614328h.

[52] - Cai, K., Frant, M., Bossert, J., Hildebrand, G., Liefeth, K., & Jandt, K. D. (2006). *Surface functionalized titanium thin films: Zeta-potential, protein adsorption and cell proliferation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 50(1), 1–8. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.03.016.

[53] - Honary, S., & Zahir, F. (2013). *Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2). doi:10.4314/tjpr.v12i2.19.

[54] - Cheng, X. L., Zhao, H., Huo, L. H., Gao, S., & Zhao, J. G. (2004). *ZnO nanoparticulate thin film: preparation, characterization and gas-sensing property. Sensors and Actuators B: Chemical*, 102(2), 248–252. doi:10.1016/j.snb.2004.04.080.

[55] - Mohamad Sukri, S. N. A., Shameli, K., Mei-Theng Wong, M., Teow, S.-Y., Chew, J., & Ismail, N. A. (2019). *Cytotoxicity and antibacterial activities of plant-mediated synthesized zinc oxide (ZnO) nanoparticles using Punica granatum (pomegranate) fruit peels extract. Journal of Molecular Structure*. doi:10.1016/j.molstruc.2019.04.026.

[56] - Shin, J. W., Lee, J. Y., Kim, T. W., No, Y. S., Cho, W. J., & Choi, W. K. (2006). *Growth mechanisms of thin-film columnar structures in zinc oxide on p-type silicon substrates. Applied Physics Letters*, 88(9), 091911. doi:10.1063/1.2174829

[57] - Carvalho, P., Sampaio, P., Azevedo, S., Vaz, C., Espinós, J. P., Teixeira, V., & Carneiro, J. O. (2014). *Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings. Applied Surface Science*, 307, 548–557. doi:10.1016/j.apsusc.2014.04.072.

[58] - Mirica, E., Kowach, G., & Du, H. (2004). *Modified Structure Zone Model to Describe the Morphological Evolution of ZnO Thin Films Deposited by Reactive Sputtering. Crystal Growth & Design*, 4(1), 157–159. doi:10.1021/cg025596b

- [59] - Granqvist, C. G., & Avendaño, E. (2007). *Electrochromic device technology based on nanoporous nanocrystalline thin films on PET foil. Device and Process Technologies for Microelectronics, MEMS, Photonics, and Nanotechnology IV*. doi:10.1117/12.759040
- [60] – Mühlbacher M. (2015). *High-resolution characterization of TiN diffusion barrier layers*. Dissertação de Licenciatura, Linköping University, Department of Physics, Chemistry and Biology, Thin Film Physics. Linköping University, Faculty of Science & Engineering. doi: 10.3384/lic.diva-120394
- [61] - Asylum Research. *AFM Characterization of Thin Films: High-Resolution Topography and Functional Properties*. <http://www.spectraresearch.com/wp-content/uploads/2016/08/Thin-Films-Characterization-AFM.pdf>
- [62] - Ostrosky, A.E., Mizumoto, M.K., Lima, M.E.L, Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O. & Freitas, B.R. (2008). *Divulgação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 18(2):301–307*.
- [63] - Al-Jawad, S. M. H., Sabeeh, S. H., Taha, A. A., & Jassim, H. A. (2018). *Synthesis and characterization of Fe–ZnO thin films for antimicrobial activity. Surface review and letters, 1850197*. doi:10.1142/s0218625x18501974.
- [64] - Kayani, Z. N., Sahar, S., Riaz, S., & Naseem, S. (2018). *Tuning of Optical and Antibacterial Characteristics of ZnO thin films: Role of Ce Content. Ceramics International*. doi:10.1016/j.ceramint.2018.11.066.
- [65] - Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Complementary and Alternative Medicine, 6(1)*. doi:10.1186/1472-6882-6-39.
- [66] - Manoharan, C., Pavithra, G., Dhanapandian, S., & Dhamodharan, P. (2015). *Effect of In doping on the properties and antibacterial activity of ZnO films prepared by spray pyrolysis. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 149, 793–799*. doi:10.1016/j.saa.2015.05.019.
- [67] - Pulingam, T., Thong, K. L., Ali, M. E., Appaturi, J. N., Dinshaw, I. J., Ong, Z. Y., & Leo, B. F. (2019). *Graphene oxide exhibits differential mechanistic action towards Gram-positive and Gram-negative bacteria. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 181, 6–15*. doi:10.1016/j.colsurfb.2019.05.023

[68] - Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2018). *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies*. *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013

[69] - Li, L.-H., Deng, J.-C., Deng, H.-R., Liu, Z.-L., & Li, X.-L. (2010). Preparation, characterization and antimicrobial activities of chitosan/Ag/ZnO blend films. *Chemical Engineering Journal*, 160(1), 378–382. doi:10.1016/j.cej.2010.03.051

