



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

**Síntese por via biológica de nanopartículas de óxido de zinco mediada pela
bactéria *Bacillus megaterium* RF1C**

Brízia Aline Lima Cerqueira

São Carlos

2023

Brízia Aline Lima Cerqueira

**Síntese de Nanopartículas de Óxido de Zinco (NPs-ZnO) mediada pela bactéria
Bacillus megaterium RF1C**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do **Título de Mestre em Química.**

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na
Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Cerqueira, Brízia Aline Lima

Síntese por via biológica de nanopartículas de óxido de zinco mediada pela bactéria *Bacillus megaterium* RF1C / Brízia Aline Lima Cerqueira. — São Carlos, 2023.

229 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

1. Nanopartículas. 2. ZnO. I. Título.

Sonia Alves - CRB: 4280/8



Ao grande Amor da minha vida, Deus!

*À minha família biológica, por acolher as
minhas ausências diante das minhas escolhas.*

*À minha família espiritual, Shalom, por me
acolher em todo canto do mundo.*

AGRADECIMENTOS

Obrigada Deus pela constante presença, pelo sustento, pelas inspirações. Sem o Senhor nada seria possível. Obrigada pelos desafios que a Sua providência coloca em minha vida e que levam a me superar sempre! Obrigada pelos anjos que o Senhor colocou neste mestrado, aos quais faço meus agradecimentos:

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Porto, pela paciência, disponibilidade, por tornar a execução do projeto possível, pelo crescimento acadêmico e humano que me permitiu nesta pós-graduação.

Ao Professor Dr. Ubirajara pela valiosa colaboração, pela disponibilidade e disposição em me ajudar.

À Professora Dr^a Fernanda Caduri e ao Professor Dr. Éder Cavalheiro pela colaboração generosa na discussão de alguns resultados. Ao Prof. Dr. Laudemir Varanda, e ao seu pós-doc Daniel, pelas análises e discussões em seu laboratório. Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio da UFSCar pelas análises de RMN sólido.

À banca examinadora, Professora Dr^a Nelcy Della Santana Mohallem e Professor Dr. Elias Paiva Ferreira Neto pela justa avaliação e pela valiosa contribuição durante a defesa. De forma especial, ao Prof. Dr. Elias que viu o trabalho nascer e contribuiu com opiniões bastante assertivas.

Às meninas da CPG, Daniele, Gislei e Andreia, por todo o suporte e atenção. Pelas minhas caras irmãs Lora, Márcia e Daniele Osório, por me sustentarem nesta escolha.

À minha família, por me apoiar sempre! Amo vocês!

Aos meus colegas do grupo de pesquisa que me ajudaram muito! Lucas, Samuel, Pedro, Marcela, Davi. Obrigada pela companhia, pelo carinho, pelo ensino! De forma especial, obrigada Ju, por tanto tempo dispensado a mim! Obrigada pela amizade.

À técnica do laboratório, Marília! Por toda a ajuda.

Aos colegas de outros grupos de pesquisa. Natália, como sou grata pelo tanto que aprendi contigo. Obrigada pelo tempo dedicado a mim. À Jessyka e Diandra obrigada pela paciência, pelo ensino.

A todos os técnicos que realizaram as análises deste projeto e aos que de alguma forma contribuíram neste trabalho: Márcio, Marcelo, Luiz Ramos, Luiz Abondância, João, Virgínia, Alessandra, Fabiana, Silvana, André Tognon, José Augusto, Guto.

Agradeço ainda à CAQI por todas as análises feitas e à USP por toda a estrutura que me favoreceu um bom aprendizado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio e pela bolsa concedida e à FAPESP pelo financiamento das análises.

*Mas o mar é fundo demais
E as ondas vêm me atingir
E se eu tentar caminhar e duvidar?
E se eu cair?*

*Ouço uma voz distante a chamar
Por sobre o monte, por sobre o mar
Ouço uma voz, me ponho a andar
E ela diz: Vem!*

*Por sobre o monte, por sobre o mar
Me falta o chão, me falta o ar
Por sobre a dúvida, vem me chamar
Tua voz me faz acreditar
E ela me diz: Vem!*

*Mas o monte é alto demais
Muito além do que eu posso ir
Já me esgotei por aqui
É tão mais fácil desistir*

*Ouço uma voz bem perto a chamar
A sinto falar, vem de dentro de mim
Ouço uma voz, me ponho a andar
E ela diz: Vem!*

*Por sobre o monte, por sobre o mar
Me falta o chão, me falta o ar
Por sobre a dúvida, vem me chamar
Tua voz me faz acreditar
Basta a Tua voz*

*Basta a Tua voz, não temo mais o monte
Basta a Tua voz, não temo mais o mar
Basta a Tua voz, por sobre a dúvida
Basta a Tua voz, Tua voz me faz acreditar*

RESUMO

A nanotecnologia destaca-se devido às fascinantes propriedades dos nanomateriais, dentre eles as nanopartículas (NPs) e suas aplicações. A obtenção das NPs pode ser realizada por métodos físicos, químicos e biológicos. A busca por tecnologias ambientalmente sustentáveis e viáveis economicamente tem possibilitado a expansão de pesquisas na área de síntese biológica. Dentre os tipos de NPs inorgânicas, o ZnO é um dos materiais que tem recebido atenção devido as suas propriedades específicas e aplicações nas áreas eletrônicas, de saúde, em suplemento alimentar animal, na agricultura, dentre outras. Neste trabalho NPs-ZnO foram sintetizadas pelo método biológico através da via extracelular usando a bactéria *Bacillus megaterium* RF1C. Iniciou-se a obtenção das NPs-ZnO através de abordagens descritas na literatura, uma vez que foi o primeiro estudo de síntese de NPs realizado no grupo de pesquisa de Química Orgânica e Biocatálise. Após a obtenção das NPs-ZnO foram feitas variações nos parâmetros de síntese a fim de verificar as características morfológicas e de tamanho das NPs-ZnO. Os parâmetros variados foram pH, quantidade de *caldo de síntese* (caldo de cultivo da bactéria livre de células), concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, tempo de síntese e o tipo de matéria orgânica. O *caldo de síntese* utilizado para a obtenção do ZnO em tamanhos nanométricos foi caracterizado através de Análise Termogravimétrica (TG), Teor de Açúcares Totais, Lipídeos Totais e Proteínas Totais, Eletroforese, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de líquidos, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). A análise de TG apresentou um teor de 35,0% de matéria orgânica. Foram encontrados um teor de 0,11% de carboidratos livres, 0,85% de lipídeos totais e 32,3% de proteínas totais. A análise de eletroforese mostrou a presença de proteínas de 22,1 a 65,4 kDa. Na análise de RMN de líquidos foram encontrados picos sugerindo a presença de grupos amidas, ácidos carboxílicos, éteres, aromáticos. O espectro de FT-IR revelou banda característica de grupo amida. O cromatograma obtido na análise de CG-EM revelou a presença de moléculas contendo grupos amidas, aromáticos, ésteres, ácidos carboxílicos, dentre outros. Para a caracterização das NPs-ZnO foram usadas as técnicas de Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-vis), Análise de Difração de Raios-X (XRD), Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TG), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de sólidos, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e RAMAN. A análise preliminar de UV-vis verificou a

obtenção de NPs-ZnO e foram encontrados absorção nos comprimentos de onda de 342 nm a 361 nm. A análise de DRX, em acordo com a análise de RAMAN, confirmou a formação da fase wurtzita do ZnO, os tamanhos dos cristalitos obtidos variaram de 17 ± 2 nm a 31 ± 5 nm. A microscopia eletrônica, MEV, revelou morfologia predominantemente cúbica com tamanhos de grãos variando entre 46 ± 10 nm e 134 ± 25 nm. O teor de matéria orgânica obtido nas análises de TG variou entre 5 e 19%. As análises de FT-IR e de RMN sólido sugeriram a presença tanto de carboxilatos quanto de hidróxi-carbonato na superfície das NPs-ZnO. A atividade antibacteriana das NPs de ZnO contra duas cepas Gram(+) e Gram(-) foram testadas usando o método de microdiluição em caldo nutriente. A concentração mínima inibitória para a bactéria Gram(-) *E. coli* ATCC25922 foi de 300 a $600 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para a bactéria Gram(+) *S. aureus* ATCC25923 foi de 75 a $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A estabilidade coloidal das NPs-ZnO foi analisada pelo Potencial Zeta e apresentou valores entre -30 e -38 no pH 12; -52 e -66 no pH 10; -43 e -54 no pH 8; -39 e -45 no pH 6; -32 e -35 no pH 4 e -2 e -9 no pH 2.

Palavras-chave: Nanopartículas; ZnO; Microrganismos; Biossíntese.

ABSTRACT

Nanotechnology stands out due to the fascinating properties of nanomaterials, including nanoparticles (NPs) and their applications. NPs can be obtained by physical, chemical and biological methods. The search for environmentally sustainable and economically viable technologies has led to the expansion of research into biological synthesis. Among the types of inorganic NPs, ZnO is one of the materials that has received attention due to its specific properties and applications in the fields of electronics, health, animal feed supplements and agriculture, among others. In this work, NPs-ZnO were synthesized by the biological method through the extracellular route using the bacterium *Bacillus megaterium* RF1C. The NPs-ZnO were obtained using approaches described in the literature, as this was the first study into the synthesis of NPs carried out in the Organic Chemistry and Biocatalysis research group. After obtaining the NPs-ZnO, variations were made to the synthesis parameters in order to verify the morphological and size characteristics of the NPs-ZnO. The parameters varied were pH, amount of synthesis broth (cell-free bacterial culture broth), concentration of the $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ precursor salt, synthesis time and type of organic material. The synthesis broth used to obtain ZnO in nanometric sizes was characterized using Thermogravimetric Analysis (TG), Total Sugar, Total Lipid and Total Protein content, Electrophoresis, Liquid Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) and Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometer (GC-MS). The TG analysis showed an organic matter content of 35.0%. A content of 0.11% free carbohydrates, 0.85% total lipids and 32.3% total proteins were found. Electrophoresis analysis showed the presence of proteins ranging from 22.1 to 65.4 kDa. Liquid NMR analysis showed peaks suggesting the presence of amide groups, carboxylic acids, ethers and aromatics. The FT-IR spectrum revealed a band characteristic of an amide group. The chromatogram obtained from the GC-MS analysis revealed the presence of molecules containing amide groups, aromatics, esters, carboxylic acids, among others. Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-vis), X-ray Diffraction Analysis (XRD), Scanning Electron Microscopy Analysis (SEM), Thermogravimetric Analysis (TG), Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of solids, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and RAMAN were used to characterize the NPs-ZnO. Preliminary UV-vis analysis verified the formation of NPs-ZnO and found absorption at wavelengths from 342 nm to 361 nm. The XRD analysis, in agreement with the RAMAN analysis, confirmed the formation of the wurtzite phase of ZnO, and the crystallite sizes

obtained ranged from 17 ± 2 nm to 31 ± 5 nm. Electron microscopy (SEM) revealed a predominantly cubic morphology with grain sizes ranging from 46 ± 10 nm to 134 ± 25 nm. The organic matter content obtained in the TG analyses ranged from 5 to 19%. FT-IR and solid NMR analyses suggested the presence of both carboxylates and hydroxycarbonates on the surface of the NPs-ZnO. The antibacterial activity of ZnO NPs against two Gram(+) and Gram(-) strains was tested using the nutrient broth microdilution method. The minimum inhibitory concentration for the Gram(-) bacterium *E. coli* ATCC25922 was 300 to 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and for the Gram(+) bacterium *S. aureus* ATCC25923 was 75 to 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The colloidal stability of NPs-Zno was analyzed by Zeta Potential and showed values between -30 and -38 at pH 12; -52 and -66 at pH 10; -43 and -54 at pH 8; -39 and -45 at pH 6; -32 and -35 at pH 4 and -2 and -9 at pH 2.

Keywords: Nanoparticles; ZnO; Microorganisms; Biosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Métodos gerais de obtenção de nanopartículas.	30
Figura 2- Esquema geral da síntese biológica de NPs de ZnO usando extratos de plantas.	32
Figura 3- Esquema da síntese de nanopartículas de ZnO por meio das vias intra- e extracelular e das análises utilizadas para a caracterização das NPs obtidas.	34
Figura 4- Proposta de mecanismo da síntese biológica de NPs-ZnO usando o ácido elágico como um agente de complexação.	36
Figura 5- Proposta de mecanismo da síntese biológica de NPs-ZnO usando a diosgenina como um agente quelante, seguida de aquecimento e calcinação.	37
Figura 6- Proposta de mecanismo da síntese de NPs-ZnO pela via biológica intracelular usando <i>Lactobacillus paracasei</i>	38
Figura 7- Representação esquemática das estruturas cristalinas do ZnO: (a) wurtzita-hexagonal, (b) blenda-zinco e (c) sal gema.	39
Figura 8- Representação esquemática da estrutura cristalina wurtzita-hexagonal para o ZnO.	39
Figura 9- Representação esquemática da estrutura cristalina wurtzita-hexagonal para o ZnO: (a) ligações pendentes dos átomos de Zn e O. (b) interação das superfícies (0001) e (0001 $\bar{1}$) do ZnO <i>bulk</i> com água.	40
Figura 10- Ilustração do mecanismo geral, hipotético, de degradação fotocatalítica de azocorantes por NPs-ZnO.	42
Figura 11- Representação da teoria da nucleação clássica. ΔG é a variação da energia livre superficial, ΔG_v é a variação da energia livre volumétrica e ΔG_s é a variação da energia livre superficial.	46
Figura 12- Três diferentes tipos de hábito cristalino para o mesmo sistema cristalino – hexagonal.	47
Figura 13- Exemplo de modelagem de morfologia das NPs provocada pela adsorção de moléculas orgânicas na face (001) de nanocristais de ZnO.	48
Figura 14- Processo de amadurecimento de Ostwald.	49
Figura 15- Etapas para otimização na obtenção de nanopartículas por células microbianas.	51
Figura 16- Placas de culturas em meio sólido das bactérias isoladas da folha da laranja.	55
Figura 17- Quantificação da população de bactérias pelo método de diluição seriada.	62
Figura 18- Ilustração do procedimento descrito na Seção 4.2.5 para a obtenção do caldo de síntese.	64

Figura 19- Fluxograma do cultivo de bactérias para a obtenção do caldo de síntese (livre de células).....	64
Figura 20- Placa de plástico usada no teste antimicrobiano.....	65
Figura 21- Montagem das placas de vidro para o preparo dos géis de resolução e de empilhamento para a análise de eletroforese.....	71
Figura 22 - Montagem da análise de eletroforese, cuba contendo o gel onde foram aplicadas a amostra do caldo de síntese dialisado, e concentrado, e o marcador.....	72
Figura 23- Proteínas que contêm o marcador padrão <i>Protein Molecular Weights – Low Range</i> e seus respectivos tamanhos e fontes de obtenção.	72
Figura 24- Esquema da <i>Síntese 1</i>	81
Figura 25- Esquema da <i>Síntese 2</i>	82
Figura 26- Esquema da <i>Síntese 3</i>	83
Figura 27- O esquema de montagem usado nas <i>Sínteses 4-8</i>	84
Figura 28- Esquema da <i>Síntese 4</i>	85
Figura 29- Esquema da <i>Síntese 5</i>	86
Figura 30- Esquema da <i>Síntese 6</i>	88
Figura 31- Esquema da <i>Síntese 7</i>	90
Figura 32 – Compostos orgânicos usados nas sínteses. (a) 8.3. (b) 8.4. (c) 8.5. (d) 8.6.	91
Figura 33- Esquema da <i>Síntese 8</i>	92
Figura 34- Esquema dos Controles 1-3 de síntese das NPs-ZnO.....	94
Figura 35- <i>Caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C.	96
Figura 36- Curva termogravimétrica da análise térmica (TG) do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.	97
Figura 37 – Gel obtido na análise de eletroforese do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C dialisado e concentrado.....	100
Figura 38 – Gráfico da migração relativa versus log da massa molecular das proteínas (kDa).....	101
Figura 39- Ilustração das proteínas amilase, esteroide hidrolase e glicose desidrogenase.	102
Figura 40- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz D_2O) do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.	103
Figura 41- Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz D_2O) do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.	104
Figura 42- Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz D_2O) - DEPT-135° do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.....	105

Figura 43- Comparação entre os espectros de RMN de ^{13}C e DEPT-135° do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.....	106
Figura 44- Representação de ligação peptídica.....	107
Figura 45- Espectro de absorção na região do infravermelho do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.	108
Figura 46- Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.....	108
Figura 47- Difratoograma de referência do ZnO de estrutura cristalina hexagonal wurtzita.	113
Figura 48- Difratoograma de referência do $\epsilon\text{-Zn(OH)}_2$ (ICSD #50447).	113
Figura 49- Espectro de absorção na região UV-vis e difratograma do Controle 1 sintetizado com 4 mL de água deionizada esterilizada e o sal precursor de $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M) em pH 8,0, 24 h, 32°C e agitação orbital em 150 rpm. (a) Espectro de absorção na região UV-vis. (b) Difratoograma.	114
Figura 50- Controle 1 sintetizado com 4 mL de água deionizada esterilizada e o sal precursor de $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker. (a) MEV com aumento de 100.000X. (b) MEV com aumento de 40.000X. (c) Histograma referente ao tamanho dos grãos obtidos no Controle 1	115
Figura 51 - Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) das NPs-ZnO obtidas na síntese do Controle 1 realizada com 4 mL de água deionizada e o sal precursor de $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8, 32°C, 24 h a 150 rpm no shake.....	116
Figura 52- Espectro de absorção na região UV-vis e difratograma do Controle 2 sintetizado com 4 mL de caldo nutriente esterilizada e o sal precursor de $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C e agitação orbital em 150 rpm. (a) Espectro de absorção na região UV-vis. (b) Difratoograma.	117
Figura 53- Controle 2 sintetizado com 4 mL de caldo nutriente esterilizada e o sal precursor de $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker. (a) MEV com aumento de 100.000X. (b) MEV com aumento de 40.000X. (c) Histograma referente ao tamanho dos grãos obtidos no Controle 2	118
Figura 54- Espectro de absorção na região UV-vis e difratograma do Controle 3 sintetizado com 4 mL de <i>caldo de síntese</i> autoclavado e o sal precursor de $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C e agitação orbital em 150 rpm.	119
Figura 55- MEV do Controle 3 sintetizado com 4 mL de <i>caldo de síntese</i> autoclavado e o sal precursor de $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker. (a) MEV com aumento de 10.000X. (b) MEV com aumento de 40.000X.	120
Figura 56- <i>Síntese 1</i> realizada com o <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C e o sal precursor de $\text{Zn(NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. (a) <i>Síntese 1.1</i> - após a adição do sal – 1 mM. (b) <i>Síntese 1.2</i> - após a adição do sal –5 mM. (c) <i>Síntese 1.3</i> - após a adição do sal – 10 mM. (d) Após 24 h de reação - 1 mM. (e) Após 24 h de reação - 5 mM. (f) Após 24 h de reação - 10 mM.	121

- Figura 57-** *Síntese 1* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (a) *Síntese 1.1* - após a adição do sal –1 mM. (b) *Síntese 1.2* - após a adição do sal – 5 mM. (c) *Síntese 1.3* - após a adição do sal – 10 mM. (d) Após 24 h de reação - 1 mM. (e) Após 24 h de reação - 5 mM. (f) Após 24 h de reação - 10 mM. 121
- Figura 58-** *Síntese 1* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. pseudomycooides* 2RF2C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (a) *Síntese 1.1* - após a adição do sal –1 mM. (b) *Síntese 1.2* - após a adição do sal – 5 mM. (c) *Síntese 1.3* - após a adição do sal – 10 mM. (d) Após 24 h de reação - 1 mM. (e) Após 24 h de reação - 5 mM. (f) Após 24 h de reação - 10 mM. 122
- Figura 59-** Espectros de absorção na região UV-vis das amostras obtidas via *Síntese 1* feita com o *caldo de síntese* das bactérias *B. megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycooides* 2RF2C usando o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 123
- Figura 60-** Espectro de absorção na região UV-vis do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. 124
- Figura 61-** Difratoograma da *Síntese 1.3* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (10 mM, 24 h). 126
- Figura 62-** *Síntese 2* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (a) *Síntese 2.1* – 100 mL do *caldo de síntese*, após a adição de 50 mL da solução do sal a 10 mM. (b) *Síntese 2.2*- 50 mL do *caldo de síntese*, após a adição de 50 mL da solução do sal a 10 mM. (c) *Síntese 2.3* – 50 mL do *caldo de síntese* após a adição de 50 mL da solução do sal a 0,32 M. (d) *Síntese 2.3* - após 48 h de adição do sal no shaker a 32°C em agitação de 150 rpm. (e) *Síntese 2.3* após centrifugação. 128
- Figura 63-** Espectros de absorção na região UV-vis das amostras obtidas nas *Síntese 2* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M) após 48 h de reação. 129
- Figura 64-** Difratoograma da *Síntese 2* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (0,32 M) após 48 h de reação. 130
- Figura 65-** *Síntese 3.2* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M) após 24 h, pH 6,2 a 80 °C em agitação magnética a 350 rpm. 131
- Figura 66-** Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 3* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M) em agitação magnética e em diferentes temperaturas (60°C e 80°C, 350 rpm, 24 h)... 132
- Figura 67-** *Síntese 4* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, 24 h, 150 rpm, 32°C) em diferentes valores de pH. (a) pH 7,0. (b) pH 7,5. (c) pH 8,0. (d) pH 9,0. (d) pH 10,0. 134
- Figura 68-** Obtenção das NPs-ZnO, após centrifugação da reação de *Síntese 4* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de

Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M, 24 h, 150 rpm, 32°C) em diferentes valores de pH. (a) pH 7,0. (b) pH 7,5. (c) pH 8,0. (d) pH 9,0. (d) pH 10,0. 134

Figura 69- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 4* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M, 24 h, 32°C, agitação orbital em 150 rpm) e em diferentes valores de pH (7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10). 135

Figura 70- Difratoogramas de raios-X da *Síntese 4* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.H₂O (0,32 M, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) e em diferentes valores de pH (7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10). 136

Figura 71- MEV das NPs-ZnO – aumento de 100.000 X. (a) MEV das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 4.3* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.H₂O (0,32 M, pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker). (b) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO da *Síntese 4.3*. 139

Figura 72- MEV das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 4.4* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.H₂O (0,32 M, pH 9,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker). À esquerda tem-se a imagem com aumento de 100.000X e à direita com aumento de 40.000X. 140

Figura 73- MEV das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 4.5* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.H₂O (0,32 M, pH 10,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker). À esquerda tem-se a imagem com aumento de 100.000X e à direita com aumento de 40.000X. 140

Figura 74- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 5* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M, pH 8,0, 24 h, 32°C, agitação orbital em 150 rpm) e em diferentes quantidades de *caldo de síntese* (20 mL; 4 mL; 2 mL; 1 mL; 0,5 mL e 0,0 mL). 141

Figura 75- Difratoogramas da *Síntese 5* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M, pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) e em diferentes quantidades de *caldo de síntese* (20 mL; 4 mL; 2 mL; 1 mL e 0,5 mL). 142

Figura 76- Microscopia Eletrônica de Varredura (a) MEV das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.1* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 20 mL de *caldo de síntese*. (b) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.1*. .. 144

Figura 77- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.2* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 4 mL de *caldo de síntese* (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2* (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*. 145

Figura 78- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, obtidas da *Síntese 5.3* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker)

com 2 mL de *caldo de síntese*. (b) MEV, com aumento de 40.000X, obtidas da *Síntese 5.3*. 145

Figura 79- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.4* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 1 mL de *caldo de síntese*. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.4*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.4* 146

Figura 80- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.5* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 0,5 mL de *caldo de síntese*. (b) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.5* (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.5*. 146

Figura 81- Curvas de TG das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.1-5.5* realizadas com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) variando a quantidade de *caldo de síntese*. (a) 0,5 mL. (b) 1 mL. (c) 2 mL. (d) 4 mL. (e) 20 mL. 149

Figura 82- Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do resíduo após análise termogravimétrica das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*. 151

Figura 83- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 6* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C em pH 8,0 e em diferentes concentrações do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,032 M, 0,064 M, 0,16 M, 0,32 M, 0,48 M e 0,64 M) à temperatura de 32°C por 24 h em agitação orbital de 150 rpm. 153

Figura 84- Difractogramas de raios-X da *Síntese 6* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C em pH 8,0 e em diferentes concentrações do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,032 M, 0,064 M, 0,16 M, 0,32 M, 0,48 M e 0,64 M) à temperatura de 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. 154

Figura 85- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.2* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,064 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 6.2*. 156

Figura 86 - Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.3* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,16 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.3*. 156

Figura 87- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.4* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese*

à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.4*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.4*. 157

Figura 88 - Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.5* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,48 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.5*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.5*. 158

Figura 89- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 7* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0 e em diferentes tempos de síntese (1h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 72 h) à 32°C em agitação orbital de 150 rpm. 160

Figura 90- Difractogramas da *Síntese 7* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0 e em diferentes tempos de síntese (1h, 6 h, 12 h, 24 h e 72 h) à 32°C por 24 h em agitação orbital de 150 rpm. 162

Figura 91- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.1* após 1 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.1*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.1*..... 163

Figura 92- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.2* após 6 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.2*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.2*..... 164

Figura 93- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.3* após 12 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.3*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.3*..... 164

Figura 94- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.4* após 24 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.4*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.4*..... 165

Figura 95- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.5* após 72 h de síntese realizada com a

bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.5*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.5*..... 165

Figura 96- Difractogramas da *Síntese 7* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0 em tempos diferentes de síntese (30 minutos, 1h, 3 h e 6 h) à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker..... 167

Figura 97- Microscopia Eletrônica de Varredura da *Segunda Síntese 7* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker em diferentes tempos: 30 min.; 1 h; 3 h e 6 h..... 169

Figura 98- Histograma da *Segunda Síntese 7*, após 6 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. 169

Figura 99- Caracterização da *Terceira Síntese 7* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (a) Espectro da análise de UV-vis. (b) Difractograma. (c) Microscopia eletrônica de varredura, MEV, com aumento de 40.000X. (d) Microscopia eletrônica de varredura, MEV, com aumento de 100.000X 170

Figura 100- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 8* realizada com 4 mL de diferentes fontes de matérias orgânicas e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0 à 32°C, 24 h e agitação orbital de 150 rpm..... 173

Figura 101- Difractogramas da *Síntese 8* realizada com 4 mL de diferentes matérias orgânicas e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0 à 32°C, 24 h e agitação orbital em 150 rpm. 174

Figura 102- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 8* realizada com o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0, 32°C, 24 h, 150 rpm no shaker. (a) *Síntese 8.1* feita com 4 mL de *caldo de síntese* de 12 h de cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C. (b) *Síntese 8.2* feita com 4 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C. (c) *Síntese 8.3* feita com 4 mL de biossurfactante Ramnolípido. (d) *Síntese 8.4* feita com 4 mL de ácido cítrico 0,1 M. (e) *Síntese 8.5* feita com 4 mL de *L-cysteine* 0,1 M. (f) *Síntese 8.6* feita com 4 mL de 1,3-diaminopropano 0,1 M..... 176

Figura 103- Estrutura química do biossurfactante Ramnolípido comercial. 177

Figura 104- Histogramas referentes ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 8.1-8.3*. 178

Figura 105 - Curva de TG das *Sínteses 8.1-8.3* realizadas com o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 180

Figura 106 – Espectro Raman das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*..... 184

Figura 107 - Representação dos modos de vibrações dos fônons no ZnO. As setas maiores representam o deslocamento dominante. A1, E1, B1(high) e E2(high) são associados aos deslocamentos do oxigênio e B1(low) e E2(high) são associados aos deslocamentos de zinco. A2 e E1 são modos polares, B1 e E2 são não – polares (MUÑOZ, 2018).....	185
Figura 108 - Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) das NPs-ZnO obtidas na <i>Síntese 5.2</i> realizada com 4 mL de <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C e o sal precursor de Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O (0,32 M), pH 8, 32°C, 24 h a 150 rpm no shake.	185
Figura 109 – Espectros de FT-IR das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3</i> e do ZnO obtido no Controle 1	188
Figura 110 - Representação dos diferentes tipos de coordenação do carboxilato com o zinco.	188
Figura 111 - Espectros de FT-IR do hidrogeno carbonato de zinco, Zn ₅ (OH) ₆ (CO ₃) ₂ , à esquerda e das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3</i> e do ZnO obtido no Controle 1 , à direita.	190
Figura 112 – Espectros de RMN ¹³ C das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3</i> e das partículas e ZnO do Controle 1	191
Figura 113 - Crescimento da cepa de <i>E. coli</i> ATCC25922 em placa contendo Agar Nutriente após 24 de inoculação na presença de NPs-ZnO.....	195
Figura 114 - Potencial zeta e mobilidade eletroforética das NPs-ZnO dispersas em meio aquoso na presença do eletrólito NaCl 10 ⁻³ M. (a) NPs-ZnO obtidas na <i>Síntese 5.2</i> . (b) NPs-ZnO obtidas na <i>Síntese 8.2</i> . (c) NPs-ZnO obtidas na <i>Síntese 8.3</i>	198
Figura 115 - Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido.	200

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação dos reagentes e dos meios de cultura usados nas sínteses e nas caracterizações das NPs-ZnO.	54
Tabela 2- Composição do <i>Nutrient Broth</i> usado no preparo do meio de cultura sólido (Agar Nutriente) e líquido (caldo nutriente) utilizados no cultivo da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.	54
Tabela 3- Relação das bactérias usadas na obtenção das NPs-ZnO com seus respectivos códigos de isolamento e identificação.	55
Tabela 4- Valores de absorvância das suspensões bacterianas que foram empregadas no cultivo das bactérias em meio líquido para a obtenção do <i>caldo de síntese</i>	62
Tabela 5- Relação das análises realizadas na caracterização das NPs-ZnO e do <i>caldo de síntese</i> e as suas respectivas localizações e colaborações.	68
Tabela 6- Valores de comprimentos de onda absorvidos pelas NPs-ZnO na região do UV-vis, descritos em trabalhos da literatura.	74
Tabela 7- Controle dos valores de pH medidos após 24 h de síntese das NPs-ZnO com o <i>caldo de síntese</i> da <i>B. megaterium</i> RF1C.	86
Tabela 8- Controle dos valores de pH na obtenção das NPs-ZnO com a variação do tempo de síntese com o <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.	89
Tabela 9- Resultado das medidas de tensão superficial dos <i>caldos de síntese</i> das bactérias <i>B. megaterium</i> RF1C, <i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C e <i>B. pseudomycooides</i> 2RF2C, do caldo nutriente e da solução do biossurfactante Ramnolipídeo comercial (440 mg.mL ⁻¹).	95
Tabela 10- Porcentagem de massas decompostas do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C nos respectivos intervalos de temperatura (°C) extraídos da curva TG.	97
Tabela 11- Resultado das análises de proteínas, açúcares e lipídeos totais presentes no <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.	99
Tabela 12 – Migração relativa e massa molecular das proteínas do marcador <i>Protein Molecular Weights – Low Range</i> e do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C obtidas do gel na análise de eletroforese.	101
Tabela 13- Compostos identificados por análise de CG-EM (IE, 70 eV) do <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C.	109
Tabela 14 - EDS, % atômica dos elementos nas partículas de ZnO obtidas no Controle 1	116
Tabela 15 – Análise Elementar das partículas de ZnO do Controle 1 , porcentagem dos elementos N, C e H.	117

Tabela 16- Aspecto visual das <i>Sínteses 1.1, 1.2 e 1.3</i> , após 24 h, feita com as bactérias, distintamente (<i>B. megaterium</i> RF1C, <i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C e <i>B. pseudomycooides</i> 2RF2C), usando três concentrações distintas do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	122
Tabela 17- Características de absorção de alguns cromóforos isolados/comuns.	125
Tabela 18- Aspecto visual das <i>Sínteses 2.1, 2.2 e 2.3</i> após a adição do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e após 48 h de síntese.	128
Tabela 19- Comparação do tamanho dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 4.3-4.5</i>	138
Tabela 20- Tamanho médio dos cristalitos e o desvio padrão das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 5.1-5.5</i>	143
Tabela 21- Comparação do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 5.1-5.5</i>	144
Tabela 22- Tamanho médio dos grãos, desvio padrão e coeficiente de variação das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 5.1-5.5</i>	147
Tabela 23- Comparação do tamanho médio dos grãos de ZnO obtidos nas <i>Sínteses 5.1-5.5</i>	148
Tabela 24- Comparação do tamanho médio do cristalito com o tamanho do grão de NPs-ZnO obtidos nas <i>Sínteses 5.1, 5.2, 5.4 e 5.5</i>	148
Tabela 25- Porcentagem de massa decomposta das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 5</i> nos respectivos intervalos de temperatura ($^{\circ}C$) e a porcentagem de massa de resíduo a $900^{\circ}C$	150
Tabela 26- EDS, %atômica dos elementos presentes no resíduo de TG das NPs-ZnO da <i>Síntese 5.2</i>	151
Tabela 27- Tamanho médio dos cristalitos e o desvio padrão das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 6.2-6.5</i>	155
Tabela 28- Comparação do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 6.2-6.5</i>	155
Tabela 29- Tamanho médio dos grãos, desvio padrão e coeficiente de variação das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 6.4-6.5</i>	158
Tabela 30- Comparação do tamanho médio do cristalito com o tamanho do grão das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 6.4 e 6.5</i>	159
Tabela 31- Tamanho médio e desvio padrão dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 7.1-7.5</i>	162
Tabela 32- Comparação do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 7.1-7.5</i>	163
Tabela 33- Tamanho médio dos grãos, desvio padrão e coeficiente de variação das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 7.1-7.5</i>	166
Tabela 34- Comparação do tamanho médio dos grãos de ZnO obtidos nas <i>Sínteses 7.1-7.5</i>	166

Tabela 35- Comparação do tamanho médio do cristalito com o tamanho do grão obtidos nas <i>Sínteses 7.1-7.5</i>	167
Tabela 36- Comparação do tamanho médio dos cristalitos, e dos grãos de ZnO obtidos nas <i>Sínteses 5.2; 6.4 e 7.4</i> que foram realizadas nas mesmas condições e o coeficiente de variação dos grãos.	171
Tabela 37- Tamanho médio e desvio padrão dos cristalitos de ZnO obtidos nas <i>Sínteses 8.1-8.3 e 8.6</i>	175
Tabela 38- Comparação do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 8.1-8.3 e 8.6</i>	175
Tabela 39 - Tamanho médio dos grãos, desvio padrão e coeficiente de variação das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 8.1-8.3</i>	178
Tabela 40- Comparação do tamanho médio dos cristalitos com o tamanho dos grãos de ZnO obtidos nas <i>Sínteses 8.1-8.3</i>	179
Tabela 41 - Porcentagem de massa decomposta das NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 8.1-8.3</i> nos respectivos intervalos de temperatura (°C) e a porcentagem de massa do resíduo a 900°C.	180
Tabela 42 – Resumo das <i>Sínteses 4 – 8</i> de NPs-ZnO com os seus respectivos Controles	181
Tabela 43- Comparação dos modos ativos Raman obtidos das NPs-ZnO da <i>Síntese 5.2</i> com os valores de referência obtidos no estudo de AURANGZEB (2010).	183
Tabela 44- EDS, %atômica dos elementos nas NPs-ZnO obtidas na <i>Síntese 5.2</i>	186
Tabela 45 - Análise Elementar das NPs-ZnO da <i>Síntese 5.2</i> , porcentagem dos elementos N, C e H.....	186
Tabela 46 - EDS, %m/m de C e N presente nas NPs-ZnO obtidas na <i>Síntese 5.2</i>	187
Tabela 47 – Rendimento da <i>Síntese 5.2</i> de NPs-ZnO.....	191
Tabela 48- Condições de síntese do Controle 1 e das <i>Sínteses 5.2, 5.5, 8.2 e 8.3</i> com os respectivos tamanhos de NPs-ZnO obtidos e o teor de matéria orgânica.	193
Tabela 49 – Valores de concentração mínima inibitória (MIC) das NPs-ZnO obtidas no Controle 1 e nas <i>Sínteses 5.2, 5.5, 8.2, 8.3</i> para as cepas de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>	193
Tabela 50- Potencial zeta (mV) nos respectivos valores de pH das <i>Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3</i>	198
Tabela 51- Valores de diâmetro hidrodinâmico (<i>Z-Average</i>) e índice de polidispersividade (PDI) para as NPs-ZnO obtidas nas <i>Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3</i>	201

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG-EM – Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas

DRX – Difração de Raios-X

DTG – *Derivate Thermogravimetry*

EDS – Espectroscopia de Energia Dispersiva

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

FDA - *Food and Drug Administration*

FT-IR - *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

NPs – Nanopartículas

PES - Polietersulfona

pH – Potencial hidrogeniônico

P_{IE} – Potencial isoelétrico

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RPM – Rotação por minuto

TG - Termogravimetria

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV-vis – Ultravioleta visível

XRD – *X-Ray Diffraction*

ZnO – Óxido de zinco

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	28
1.1 Nanomateriais e suas formas de obtenção	28
1.2 Síntese biológica de nanopartículas	30
1.2.1 Síntese biológica de nanopartículas por extratos de plantas.....	31
1.2.2 Síntese biológica de nanopartículas por microrganismos.....	32
1.2.3 Propostas de mecanismos via síntese biológica de NPs-ZnO descritas na literatura	34
1.3 Óxido de zinco - ZnO	38
1.3.1 Estrutura cristalina do ZnO e suas faces polares e apolares	39
1.3.2 Aplicações das NPs-ZnO.....	40
1.4 Teoria de cristalização em meio líquido.....	44
1.4.1. Supersaturação.....	45
1.4.2. Nucleação	46
1.4.3 Crescimento do cristal	47
1.4.4 Envelhecimento e amadurecimento do cristal	48
1.5 <i>Bacillus megaterium</i>	49
2. MOTIVAÇÃO	51
3. OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo	52
3.2 Objetivos específicos.....	52
4. PARTE EXPERIMENTAL I	53
4.1 Materiais e equipamentos	53
4.1.1 Reagentes e meios de cultura.....	53
4.1.2 Microrganismos	55
4.1.3 Equipamentos e materiais.....	55
4.2 Metodologia.....	56
4.2.1 Preparo das soluções usadas nas sínteses das NPs-ZnO.....	56
4.2.2 Preparo das soluções e dos géis usados na análise de eletroforese	57
4.2.3 Preparo dos meios de cultura e das soluções usadas na contagem de células bacterianas viáveis e no teste antimicrobiano.....	60
4.2.4 Contagem de células viáveis da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C	61
4.2.5 Cultivo dos microrganismos	62
4.2.6 Teste antimicrobiano	65

4.2.7 Rendimento.....	66
4.3 Caracterização do <i>caldo de síntese</i> e das NPs-ZnO	66
4.3.1 Análise por Termogravimetria (TG).....	69
4.3.2 Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)	69
4.3.3 Difração de raios-X (DRX)	70
4.3.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	71
4.3.5 Análise por eletroforese.....	71
4.3.6 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	73
4.3.7 Espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-vis)	73
4.3.8 Espectroscopia Raman.....	74
4.3.9 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	75
4.3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	75
4.3.11 Potencial Zeta	76
4.3.12 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para amostra líquida	76
4.3.13 Ressonância Magnética Nuclear de sólido (RMN)	77
4.3.14 Tensão superficial do <i>caldo de síntese</i>	77
4.3.15 Análise do teor de açúcares totais, lipídeos totais e proteínas totais	77
4.3.16 Analisador Elementar	78
4.3.17 Liofilização do <i>caldo de síntese</i>	78
4.3.18 Liofilização das NPs-ZnO	78
5. PARTE EXPERIMENTAL II	80
5.1 Síntese das NPs-ZnO sem o ajuste de pH	80
5.1.1 <i>Síntese 1</i> – variação da concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	80
5.1.2 <i>Síntese 2</i> - variação da quantidade do <i>caldo de síntese</i> e aumento da concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	81
5.1.3 <i>Síntese 3</i> – variação da temperatura	82
5.2 Síntese das NPs-ZnO com o ajuste de pH	84
5.2.1 <i>Síntese 4</i> – variação do pH	84
5.2.2 <i>Síntese 5</i> – variação da quantidade de <i>caldo de síntese</i>	85
5.2.3 <i>Síntese 6</i> – variação da concentração do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	87
5.2.4 <i>Síntese 7</i> – variação do tempo de síntese.....	88
5.2.5 <i>Síntese 8</i> – variação do tipo de matéria orgânica	90
5.2.6 Lavagem das NPs-ZnO.....	92
5.3 Controles das sínteses de NPs-ZnO.....	93
5.3.1 Controle 1 – síntese sem a presença de matéria orgânica.....	93

5.3.2 Controle 2 – síntese na presença do caldo nutriente.....	93
5.3.3 Controle 3 – síntese das NPs-ZnO com o <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C previamente autoclavado	94
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
6.1 <i>Caldo de síntese</i>	95
6.1.1 Tensão superficial.....	95
6.1.2 Análise Termogravimétrica – TG.....	97
6.1.3 Açúcares, lipídeos e proteínas totais	99
6.1.4 Eletroforese.....	100
6.1.5 RMN de líquido	102
6.1.6 FT-IR	107
6.1.7 Cromatografia gasosa (CG).....	108
6.2 Controles.....	114
6.2.1 Controle 1 – sem matéria orgânica	114
6.2.2 Controle 2 – síntese feita com o caldo nutriente	117
6.2.3 Controle 3 – síntese com o <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C previamente autoclavado	119
6.3 Sínteses das NPs-ZnO – sínteses sem o ajuste de pH	120
6.3.1 <i>Síntese 1</i> – Estudos da variação da concentração do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	120
6.3.2 <i>Síntese 2</i> – Estudo da variação da quantidade do <i>caldo de síntese</i> e aumentando da concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	127
6.3.3 <i>Síntese 3</i> – Estudo da variação da temperatura.....	130
6.4 Sínteses das NPs-ZnO – sínteses com o ajuste de pH.....	130
6.4.1 <i>Síntese 4</i> – Estudo da variação do pH.....	132
6.4.2 <i>Síntese 5</i> – Estudos da variação da quantidade de <i>caldo de síntese</i> da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C	140
6.4.3 <i>Síntese 6</i> – Estudos da variação da concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	152
6.4.4 <i>Síntese 7</i> – Estudo da variação do tempo da síntese.....	159
6.4.5 <i>Síntese 8</i> – Estudo da variação do tipo de matéria orgânica.....	172
6.4.6 Resumo das <i>Sínteses 4-8</i> de NPs-ZnO	181
6.4.7 Espectroscopia Raman.....	183
6.4.8 Composição Elementar das NPs-ZnO	185
6.4.9 FT-IR	187
6.4.10 RMN sólido	190

6.4.11 Rendimento da Síntese de NPs-ZnO	191
6.4.12 Teste Antimicrobiano	192
6.4.13 Estabilidade das NPs-ZnO.....	196
7. CONCLUSÕES.....	202
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	203
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	214
APÊNDICE A – Cálculos para determinar os tamanhos dos cristalitos	214
APÊNDICE B – Placas dos testes antimicrobianos com as NPs-ZnO.....	222
APÊNDICE C – EDS do Controle 1	223
APÊNDICE D – EDS do resíduo de TG da <i>Síntese 5.2</i>	224
APÊNDICE E – EDS da <i>Síntese 5.2</i>	225
ANEXO A - Fitoquímicos ativos de extratos de plantas	222
ANEXO B – Laudo de análise CBO	228

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanomateriais e suas formas de obtenção

Os materiais nanométricos, elementos básicos e fundamentais da nanotecnologia, vêm atraindo a atenção de pesquisadores devido suas aplicações em diversas áreas como a química, a física, a biologia, a medicina, a eletrônica, as engenharias etc. (WELDEGEBRIEAL, 2020). O prefixo 'nano' provém do grego “*nanos*” que significa 'anão' ou algo muito pequeno que corresponde a um milionésimo de um metro (10^{-9} m) (BAYDA et al., 2020).

Atualmente muitas pesquisas estão, direta ou indiretamente, relacionadas à nanotecnologia que se distingue da nanociência. Vale ressaltar a diferença entre estas duas áreas. A nanotecnologia pode ser entendida como o desenvolvimento, a síntese, a caracterização e a aplicação de materiais e dispositivos, através das modificações de tamanho e forma em nanoescala. Enquanto a nanociência é o estudo de estruturas e moléculas, da superfície dos materiais (morfologia, textura, tamanho, interações etc.) nas escalas nanométricas (KOLAHALAM et al., 2019).

A atenção a esses materiais nanométricos se volta, principalmente pelo fato de que muitas mudanças nas propriedades físicas e químicas podem ser observadas na escala de tamanho na ordem de 1 a 100 nm (ou 10^{-9} m) quando comparadas ao mesmo material na sua forma *bulk*, ou seja, em escala microscópica (ordem de 10^{-6} m) ou macroscópica ($> 10^{-3}$ m) (ATKINS et al., 2008).

Os principais fatores que atribuem a alteração nas propriedades dos materiais, em escala nanométrica, são:

a) o aumento da razão entre a superfície e o volume do material, pois a maioria dos átomos estarão na superfície aumentando a interação física e química do material com o meio ao qual ele está em contato;

b) os efeitos quânticos que se tornam mais evidentes. Por exemplo, o ponto quântico, nanocristais semicondutores extremamente pequenos, seu comportamento físico pode ser relacionado ao de um poço de potencial onde ocorre o confinamento de elétrons modificando as propriedades elétricas e óticas do material (MELO; PIMENTA, 2004).

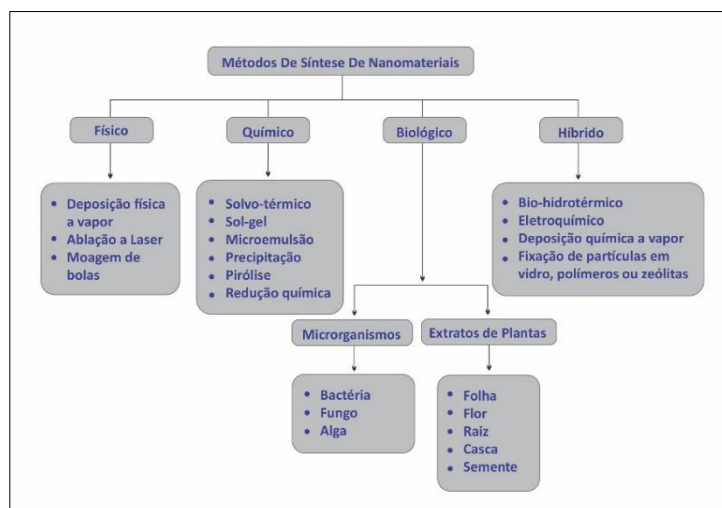
Para que um material seja classificado como um nanomaterial, pelo menos uma de suas dimensões deve possuir tamanho menor do que 100 nm (KOLAHALAM et al., 2019). Com base nas dimensões, os nanomateriais podem ser classificados como:

- **Nanomateriais zero-dimensionais (0-D):** possuem todas as três dimensões na faixa de escala nanométrica. Exemplo: nanopartículas (NPs) e pontos quânticos.
- **Nanomateriais unidimensionais (1-D):** possuem duas de suas dimensões na faixa de escala nanométrica. Exemplos: nanobastões, nanotubos, nanofibras, nanofios.
- **Nanomateriais bidimensionais (2-D):** possuem uma de suas dimensões na faixa de escala nanométrica. Exemplos: nanofilmes, nanocamadas, nanorevestimentos e nanofolhas (KOLAHALAM et al., 2019).

Os nanomateriais podem ainda ser de diferentes tipos com base na sua constituição, por exemplo, nanopartículas metálicas, nanomateriais semicondutores, nanomateriais poliméricos, nanomateriais à base de carbono, nanomateriais à base de lipídeos (KOLAHALAM et al., 2019). Em nosso trabalho, o tipo de material estudado foi uma nanopartícula semicondutora de óxido de zinco.

Os nanomateriais podem ser obtidos por duas formas distintas. A primeira, a partir da abordagem “*top down*”, onde os materiais de escala macroscópica são reduzidos à escala nanométrica, normalmente através de processos físicos como a moagem e a litografia. E a segunda abordagem, “*bottom up*”, onde a obtenção dos nanomateriais ocorre a partir de componentes básicos como os átomos, os íons e as moléculas (ATKINS et al., 2008; JACINTO et al., 2021).

Existem vários tipos de processos químicos e físicos para a obtenção das nanopartículas (Figura 1). Como exemplos, podem ser citados a co-precipitação, os processos sol-gel, as microemulsões, processos hidrotérmicos, micro-ondas, sono-químico, mecanossíntese etc. Alguns dos processos podem apresentar custos elevados, ser menos sustentáveis, utilizar substâncias ou solventes tóxicos durante as etapas de obtenção, além de poder gerar subprodutos e resíduos (BASKAR et al., 2013). Contudo, também são encontrados estudos de processos químicos com rotas mais simples e mais sustentáveis utilizando a água como solvente conforme os estudos de MUÑOZ (2018) e NICHOLAS (2011).

Figura 1- Métodos gerais de obtenção de nanopartículas.

Fonte: Modificado de WELDEGEBRIEAL (2020).

É relevante o desenvolvimento de processos de obtenção de nanopartículas que sejam economicamente viáveis através de processos sustentáveis.

A definição de sustentabilidade mais difundida é a da Comissão Brundtland (WCED, 1987), a qual considera que o desenvolvimento sustentável deve satisfazer às necessidades da geração presente sem comprometer as necessidades das gerações futuras [...] A maioria dos estudos afirma que sustentabilidade é composta de três dimensões que se relacionam: econômica, ambiental e social (CLARO et al., 2008).

Neste intuito, pesquisas com abordagem biológica têm se tornado crescente por serem relativamente simples, requererem menos energia no processo e por serem pouco agressivas ao meio ambiente (YUSOF et al., 2020). Na natureza tem-se uma amplitude de fontes de recursos, como plantas, algas e microrganismos (fungos e bactérias) que podem ser explorados na síntese biológica de nanopartículas.

1.2 Síntese biológica de nanopartículas

Na síntese biológica de NPs utiliza-se um solvente, que comumente é a água, um reagente precursor e um extrato de origem vegetal ou a biomassa de microrganismos. O reagente precursor das NPs, normalmente, provém de uma solução de um sal inorgânico, que contém os íons do metal de interesse, o qual levará a formação das nanopartículas. Os componentes bioquímicos (metabólitos primários e secundários) produzidos e secretados/excretados ¹ pelas células de microrganismos, ou extraídos das plantas e algas,

¹ Há diferença entre secretar e excretar. A ato de secretar ocorre através da eliminação de substâncias produzidas no interior da célula que terão utilidade, para o microrganismo. Por exemplo, uma bactéria pode secretar, para o meio externo, enzimas proteases a fim de quebrar ligações peptídicas entre aminoácidos de proteínas para se utilizar das moléculas menores em seu metabolismo. No ato de excretar, ocorre a eliminação de substâncias produzidas pela célula que não terão mais utilidade para ela, como a

além de atuarem como estabilizantes das nanopartículas podem auxiliar na redução de alguns íons metálicos presentes no reagente precursor. A possibilidade de atuarem como estabilizantes é desejável, pois as nanopartículas por possuírem alta energia na superfície, tendem a se unirem formando aglomerados (MOGHADDAM et al., 2017).

A aplicação das nanopartículas está relacionada ao seu tamanho e forma, sendo assim, os aglomerados tornam-se um problema para algumas possíveis aplicações (SHABAANI et al., 2020; WELDEGEBRIEAL, 2020). Por exemplo, na aplicação fotocatalítica os agregados de NPs-ZnO reduzem consideravelmente seu desempenho. Outro exemplo, é sua ação antimicrobiana, pois o ZnO torna-se mais eficiente quando se encontra em escala nanométrica (JAYASEELAN et al., 2012; TIQUIA-ARASHIRO et al., 2016).

Os métodos de síntese biológica são relativamente simples de serem realizados, porém são recentes e há muitos desafios a serem superados. Por exemplo, o rendimento das NPs obtidas em relação às quantidades utilizadas de biomassa e do sal precursor; a viabilidade econômica e os mecanismos de reação e de estabilização das NPs - que muitas vezes não são bem compreendidos ou conhecidos. Desta forma, há um amplo campo de estudo a ser explorado que abre possibilidades de pesquisas na área de síntese de NPs pela via biológica (ZIKALALA et al., 2018).

1.2.1 Síntese biológica de nanopartículas por extratos de plantas

Em relação à síntese biológica há um maior número de estudos descritos na literatura que utilizam extratos de plantas ou de suas partes como raízes, caules, folhas, flores, além de cascas de frutas para a obtenção de nanopartículas de ZnO (WELDEGEBRIEAL, 2020).

Polifenóis, flavonóides, alcalóides, terpenóides, glicosídeos, proteínas, açúcares redutores, ácidos graxos, vitaminas - por meio de seus grupos funcionais: hidroxila, carboxila e amino - são fitoquímicos (metabólitos secundários) que extraídos das plantas podem atuar como estabilizantes e em algumas sínteses como agentes redutores de íons metálicos a partir dos reagentes precursores (WELDEGEBRIEAL, 2020).

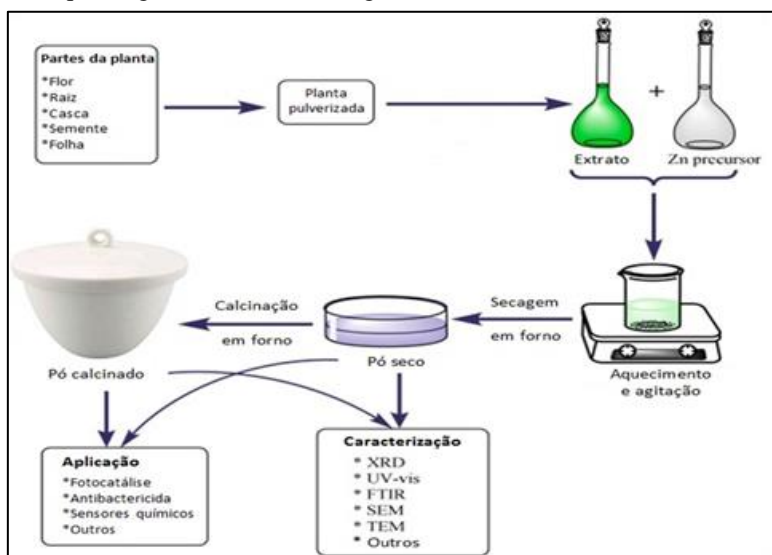
Há várias técnicas que podem ser utilizadas para a extração dos fitoquímicos oriundos das plantas e as mais comuns têm sido a extração por partição líquido-líquido usando solventes orgânicos com diferentes polaridades. Esta etapa de obtenção dos

remoção de resíduos metabólicos. Tanto a secreção quanto a excreção são importantes para manter a homeostase da célula (LLOYD, 2006).

extratos é importante, pois a morfologia e o tamanho das nanopartículas dependem, além de outras variáveis, da composição química dos mesmos (WELDEGEBRIEAL, 2020).

A Figura 2 ilustra, de forma geral, o processo de obtenção de nanopartículas de ZnO a partir do uso de extrato de plantas.

Figura 2- Esquema geral da síntese biológica de NPs de ZnO usando extratos de plantas.



Fonte: Modificado de WELDEGEBRIEAL (2020).

A síntese biológica de NPs através de extratos de plantas, apesar de apresentar benefícios, possui algumas desvantagens como o controle do tamanho e da forma das nanopartículas, além da dificuldade de purificação das mesmas (WELDEGEBRIEAL, 2020). E ainda, os extratos vegetais são complexos e podem apresentar diferentes composições químicas e concentrações variadas de acordo com o material coletado, a sazonalidade (clima, umidade, temperatura, pH do solo) e o processo de extração (solvente, tempo etc.). Assim, estes fatores podem dificultar a otimização do processo de obtenção das NPs via extratos vegetais.

1.2.2 Síntese biológica de nanopartículas por microrganismos

Os microrganismos, como os fungos e as bactérias, podem ser utilizados na síntese de NPs de metais e de alguns óxidos. Dentre os estudos na literatura, os óxidos de metais de transição são os mais explorados (WELDEGEBRIEAL, 2020). Depois do TiO_2 e do SiO_2 , o ZnO é um dos óxidos mais produzidos (YUSOF et al., 2019 apud PICCINNO et al., 2012).

Os óxidos de metais de transição são de particular interesse por apresentarem uma variedade de estruturas cristalinas e devido as suas propriedades eletrônicas e magnéticas,

que são atribuídas à distribuição dos elétrons presentes na camada mais externa (orbitais *d*) (RAO, 1989).

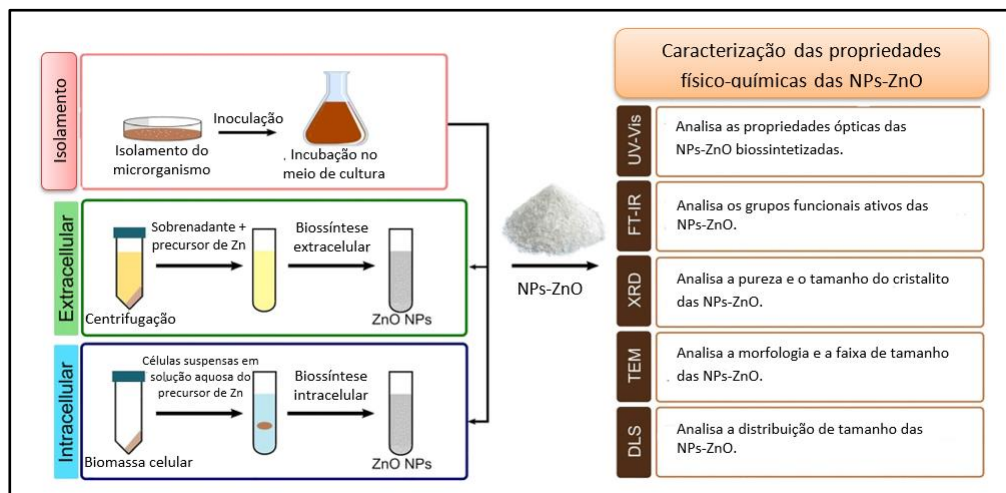
O uso de microrganismos permite a síntese de nanopartículas por duas vias, a intracelular e a extracelular. Na via intracelular, compostos bioquímicos como as proteínas, as enzimas e outros constituintes presentes nas células (cofatores, lipídeos, aminoácidos etc.) podem atuar como agentes redutores de alguns íons metálicos produzindo as nanopartículas no interior da célula. Na via extracelular, a obtenção das NPs ocorre fora da célula, através de metabólitos que são secretados/excretados pelos microrganismos para o meio externo, que também podem atuar na redução de alguns íons metálicos e formar as nanopartículas. Compostos bioquímicos presentes no interior e no exterior das células podem também oferecer estabilização às nanopartículas sintetizadas de forma a evitar seu crescimento, agregação e redissolução no meio (YUSOF et al., 2019).

A síntese extracelular de NPs tem se mostrado mais vantajosa e mais simples de ser executada em relação à síntese intracelular. Esta última requer mais etapas de extração e purificação, pois como a síntese de NPs ocorre no interior da célula, é preciso procedimentos adicionais para a lise celular como a ultra-sonicação, centrifugação para posterior extração e purificação (YUSOF et al., 2019).

A vantagem do uso de bactérias e fungos na síntese de NPs, por processos biológicos, é devido a estes microrganismos poderem ser cultivados e modificados geneticamente em ambiente laboratorial (YUSOF et al., 2019). No entanto, as bactérias podem facilmente, por mutação ou *stress*, alterarem suas vias metabólicas deixando de produzir a(s) substância(s) necessária(s) para a obtenção das NPs, o que seria uma desvantagem da sua utilização.

A Figura 3 ilustra as etapas das sínteses, intracelular e extracelular, a partir de microrganismos, assim como os métodos utilizados para a caracterização das NPs obtidas.

Figura 3- Esquema da síntese de nanopartículas de ZnO por meio das vias intra- e extracelular e das análises utilizadas para a caracterização das NPs obtidas.



Fonte: Modificado de YUSOF et al. (2019).

Em nosso estudo realizou-se a síntese biológica de NPs-ZnO pela via extracelular mediada pela bactéria *Bacillus megaterium* RF1C. Na literatura existem algumas propostas de mecanismos por processos biológicos pela via intra e extracelular que foram abordadas na seção seguinte.

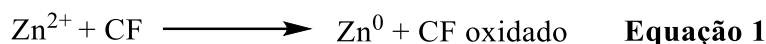
1.2.3 Propostas de mecanismos via síntese biológica de NPs-ZnO descritas na literatura

Os mecanismos para a obtenção de nanopartículas por métodos biológicos, mediados por plantas, bactérias e fungos é um campo a ser explorado. Estudos na literatura demonstraram que os grupos funcionais presentes nos compostos fitoquímicos, para as sínteses feitas com extratos de plantas; os resíduos de aminoácidos, assim como as enzimas secretadas pelos microrganismos, para as sínteses realizadas com bactérias, fungos e algas; podem estar envolvidos na formação e estabilização das nanopartículas (XIE et al., 2007; DURÁN et al., 2005, apud MOGHADDAM et al., 2017, p.3).

Existem alguns mecanismos propostos na literatura para elucidar a formação de NPs via processos biológicos. No entanto, o esclarecimento destes mecanismos se torna difícil devido a possibilidade de uma grande diversidade de biomoléculas estarem envolvidas na síntese (WELDEGEBRIEAL (2020). Nem todos os mecanismos propostos são claros, alguns possuem lacunas e outros podem ser passíveis de questionamentos.

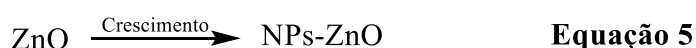
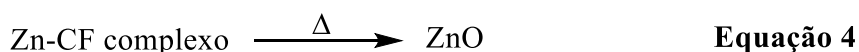
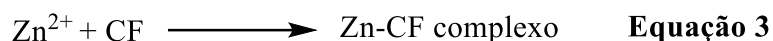
Para a síntese biológica utilizando extratos de diferentes espécies de plantas, WELDEGEBRIEAL (2020) relatou duas propostas de mecanismos gerais para a formação de NPs-ZnO. A primeira proposta de mecanismo envolveu a redução dos íons Zn^{2+} a Zn^0 , através dos constituintes fitoquímicos (CF) ativos presentes nos extratos de

plantas, como o ácido elágico do Tomilho e da Rambutan, a punicalina da Romã, a emodina da Babosa, dentre outros como ilustradas no **Anexo A**. Segundo o autor, o Zn⁰ quando exposto ao ar, em altas temperaturas via calcinação, é oxidado a Zn²⁺ fornecendo as NPs-ZnO, conforme as equações 1 e 2.



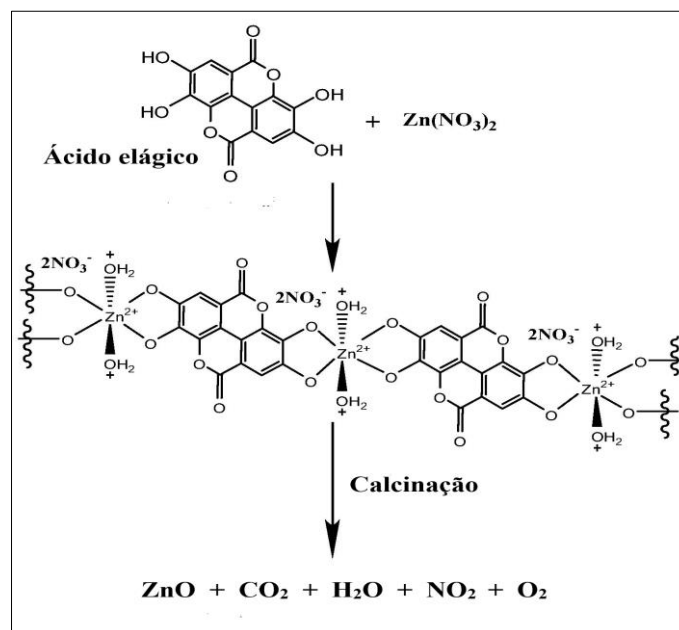
No entanto, esta primeira proposta de mecanismo é questionável, pois o estudo não apresentou o potencial de oxi-redução da reação. Os íons Zn²⁺ possuem potencial de redução de E₀ = -0,76 V, ou seja, ele não sofre redução de forma espontânea. A possível redução dos íons Zn²⁺ proposta também estaria em discordância com a energia livre de Gibbs que desloca a reação no sentido de diminuir a energia do sistema (POURBAIX, 1974).

No segundo mecanismo proposto, que tem sido mais aceito e mais comumente apresentado na literatura, os íons Zn²⁺ formam complexos com os grupos funcionais polares dos metabólitos presentes nos extratos (CF), tais como a hidroxila (-OH), a carboxila (-COOH), a carbonila (-C=O) e o grupo amino (-NH₂) (Equação 3). Em seguida, o complexo Zn-CF é decomposto termicamente, por calcinação, fornecendo o ZnO (Equação 4) que após crescimento formam as NPs-ZnO (Equação 5) (WELDEGEBRIEAL, 2020).



Esse segundo mecanismo está ilustrado na Figura 4. Foi usado o ácido elágico, um dos principais constituintes fitoquímicos presente no extrato da casca do fruto Rambutan (*Nephelium lappaceum*), para complexar os íons Zn²⁺ com os grupos 1,2-dióis (hidroxilas fenólicas) utilizando como reagente precursor o Zn(NO₃)₂. A decomposição térmica do complexo do ácido elágico forneceu as NPs-ZnO após a etapa de calcinação a 450°C (KARNAN e SELVAKUMAR, 2016).

Figura 4- Proposta de mecanismo da síntese biológica de NPs-ZnO usando o ácido elágico como um agente de complexação.

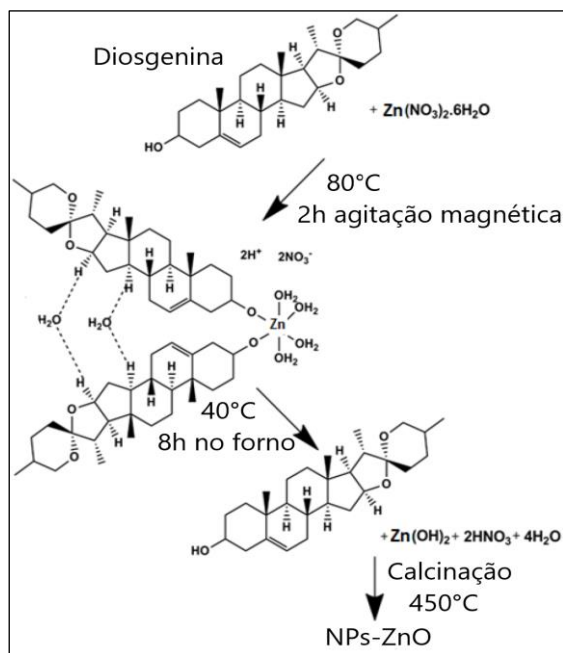


Fonte: Modificado de WELDEGEBRIEAL (2020).

Um outro mecanismo de síntese biológica via extrato de planta foi proposto na literatura por SURESH et al. (2018). Os autores usaram um extrato da planta insulina (*Costus pictus*), que contém como principal constituinte fitoquímico a biomolécula ativa diosgenina, e o sal precursor $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Sugeriram um mecanismo, em três etapas, no qual passa primeiro pela formação de hidróxido de zinco a partir do precursor.

A primeira etapa do mecanismo envolveu a complexação dos íons Zn^{2+} com duas biomoléculas de diosgenina após aquecimento a 80°C por 2h em agitação magnética. Na segunda etapa, o complexo foi aquecido em forno a 40°C por 8h levando a formação de $\text{Zn}(\text{OH})_2$. Na terceira etapa do mecanismo o hidróxido de zinco foi convertido nas NPs-ZnO através de calcinação (Figura 5) (SURESH et al., 2018). Este mecanismo também foi ilustrado por outros estudos na literatura frente à preparação de NPs-ZnO (AMBIKA e SUNDRARAJAN, 2015; ADEYEMI, 2019; WELDEGEBRIEAL, 2020).

Figura 5- Proposta de mecanismo da síntese biológica de NPs-ZnO usando a diosgenina como um agente quelante, seguida de aquecimento e calcinação.



Fonte: Modificado de WELDEGEBRIEAL (2020).

Para a síntese biológica via microrganismo, MOGHADDAM et al. (2017) sintetizaram as NPs-ZnO a partir da levedura *Pichia kudriavzevii*, usando o sal precursor acetato de zinco di-hidratado, pela via extracelular. XIE et al. (2007) e DURÁN et al. (2005) propuseram um possível mecanismo para esta rota de síntese.

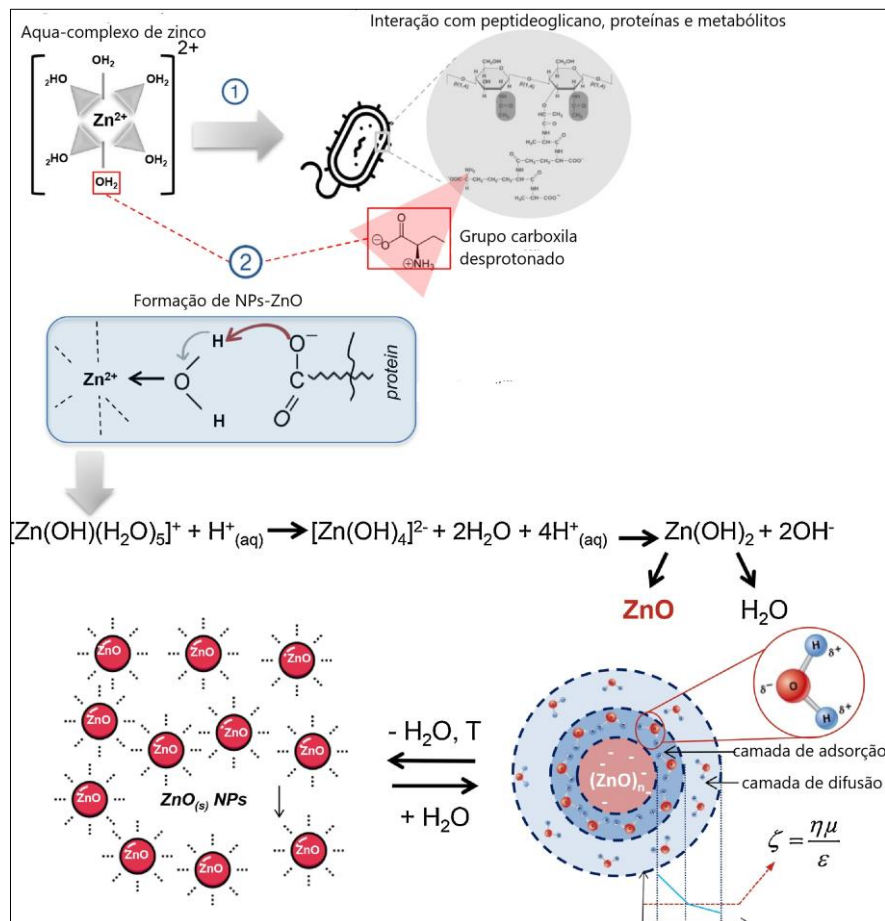
Os autores sugeriram primeiramente uma complexação dos íons Zn^{2+} com os grupos hidroxilas de alguns resíduos de aminoácidos (Tirosina, Serina e Treonina) seguida de hidrólise do complexo e a obtenção das NPs-ZnO após decomposição térmica. Desta forma, os aminoácidos poderiam estabilizar as NPs-ZnO evitando o seu crescimento e/ou aglomeração (XIE et al., 2007; DURÁN et al., 2005).

No entanto, SÁNCHEZ et al. (1996) em seus estudos mostraram a alta estabilidade dos íons Zn^{2+} com glicinato (ordem de 10^9). Portanto, é passível de questionamento a proposta de mecanismo apresentada por XIE et al. (2007) e DURÁN et al. (2005), pois seria mais provável a complexação dos íons Zn^{2+} com grupos carboxilas que estão presentes nos aminoácidos.

KRÓL et al. (2018) sintetizaram as NPs-ZnO pela via intracelular usando a bactéria *Lactobacillus paracasei* e propuseram um mecanismo de síntese. Em solução, os íons Zn^{2+} formariam complexos estáveis com as moléculas de água. Em seguida, o complexo aqua-zinco $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, como um ácido de Lewis, poderia interagir com as carboxilas desprotonadas das biomoléculas bacterianas (peptidoglicanos, proteínas, enzimas, metabólitos) formando o complexo aqua-hidroxi de zinco $[\text{Zn}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5]^+$ que

finalmente seria convertido às NPs-ZnO no próprio meio biológico. Esta proposta da síntese biológica das NPs-ZnO está ilustrada na Figura 6.

Figura 6- Proposta de mecanismo da síntese de NPs-ZnO pela via biológica intracelular usando *Lactobacillus paracasei*.



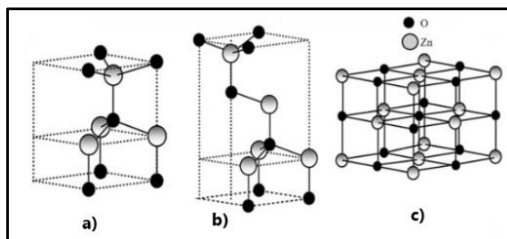
Fonte: Modificado de KRÓL et al. (2018).

1.3 Óxido de zinco - ZnO

O óxido de zinco é um material inorgânico que possui três estruturas cristalinas distintas, a wurtzita-hexagonal, a blenda-zinco e a sal-gema (Figura 7).

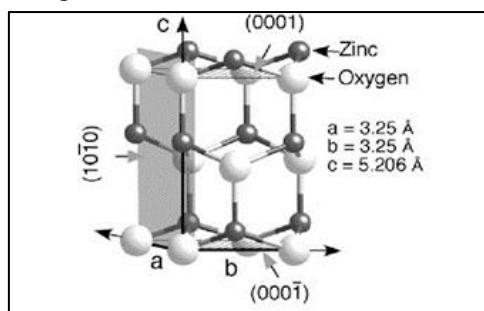
A wurtzita-hexagonal é a estrutura mais estável termodinamicamente. Possui coordenação tetraédrica com cada cátion Zn^{2+} rodeado por quatro ânions O^{2-} nos vértices do tetraedro, conferindo uma estrutura não centrossimétrica. Desta forma, os elétrons do zinco estão hibridizados com os elétrons do orbital p do oxigênio. Esta coordenação tetraédrica entre os átomos de zinco e oxigênio conferem uma simetria oposta entre os planos polares (0001 e $000\bar{1}$) ao longo do eixo hexagonal “c” (Figura 8). A polaridade dos planos (0001 e $000\bar{1}$) confere ao óxido de zinco diversas propriedades, como por exemplo, piezoeétrica que é favorável na aplicação em sensores (RAO, 1989; WELDEGEBRIEAL,2020).

Figura 7- Representação esquemática das estruturas cristalinas do ZnO: (a) wurtzita-hexagonal, (b) blenda-zinco e (c) sal gema.



Fonte: WELDEGEBRIEAL (2020).

Figura 8- Representação esquemática da estrutura cristalina wurtzita-hexagonal para o ZnO.



Fonte: DULUB (2005).

Nosso trabalho consistiu na síntese de nanopartículas de óxido de zinco através do caldo de cultivo, livre de células, da bactéria *B. megaterium* RF1C. Assim, é importante conhecer a estrutura do ZnO, bem como suas faces polares e apolares para uma melhor compreensão das possíveis interações que ocorrem entre os compostos orgânicos, produzidos e secretados/excretados pelas bactérias, com os diferentes tipos de superfícies do ZnO, bem como para suas futuras aplicações.

1.3.1 Estrutura cristalina do ZnO e suas faces polares e apolares

A estrutura cristalina wurtzita-hexagonal possui duas faces polares (0001 e 000 $\bar{1}$), e uma face apolar (10 $\bar{1}$ 0). Na face (0001) tem-se o plano terminado com os átomos de Zn e na face (000 $\bar{1}$) tem-se o plano terminado com os átomos de O. A face apolar (10 $\bar{1}$ 0) é constituída por 6 planos não polares (Figuras 8 e 9) (WÖLL, 2007).

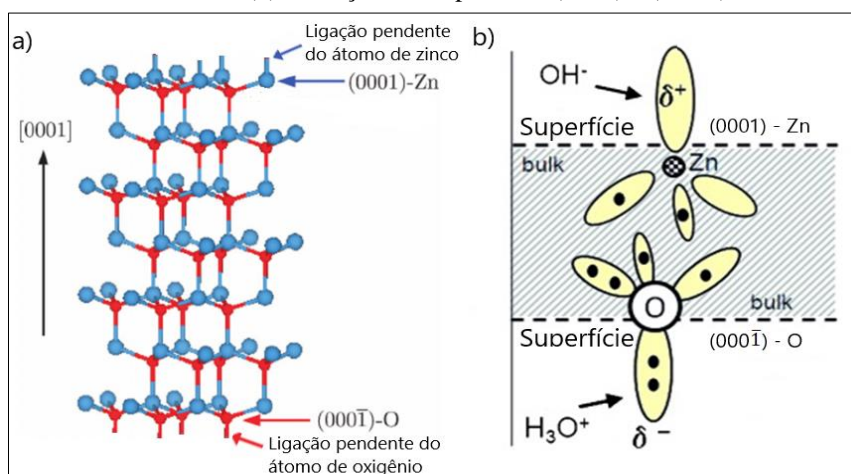
A face não polar (10 $\bar{1}$ 0) possui seis superfícies equivalentes que geralmente são mais estáveis do que as outras superfícies polares do ZnO. Considerando a estrutura do ZnO sem fazer interações com o meio, nesta superfície cada átomo de zinco e de oxigênio possuem uma ligação pendente. Assim, o plano (10 $\bar{1}$ 0) é eletricamente neutro, sem momento dipolar líquido conferindo maior estabilidade à superfície (WÖLL, 2007).

Para a superfície polar (0001) terminada com os átomos de Zn, cada átomo de zinco possui uma ligação pendente, pois está ligado apenas a três átomos de oxigênio que

estão abaixo do plano (Figuras 9a.). Isto confere à superfície polar uma instabilidade eletrostática. No entanto, estudos com o ZnO *bulk* tem mostrado que o átomo de zinco, quando hidratado, adsorve moléculas de água na superfície, ou seja, a ligação pendente de cada átomo de zinco do plano (0001) interage com um grupo hidroxila proveniente da hidratação (Figura 9b.) (WANDER et al., 2001; DUKE et al., 1975; SCHIEK et al., 2006).

Por fim, na superfície polar (000 $\bar{1}$) terminada com os átomos de O, cada átomo de oxigênio está coordenado a três átomos de zinco que estão abaixo do plano. Também nesta superfície, cada oxigênio possui uma ligação pendente que quando hidratada, em vácuo, se liga ao íon hidrônio H₃O⁺ (Figura 9) (NICHOLAS, 2011, apud KUNAT et al., 2002; WÖLL, 2007).

Figura 9- Representação esquemática da estrutura cristalina wurtzita-hexagonal para o ZnO: (a) ligações pendentes dos átomos de Zn e O. (b) interação das superfícies (0001) e (000 $\bar{1}$) do ZnO *bulk* com água.



Fonte: Modificado de TANG et al. (2014) e HÜPKES et al. (2012).

1.3.2 Aplicações do ZnO

O óxido de zinco, tanto em tamanho *bulk* quanto nanométrico, devido as suas propriedades físicas e químicas, têm um amplo espectro de aplicação, como em tintas, cosméticos, cerâmicas, borracha, indústria têxtil, optoeletrônica, agricultura dentre outras (COTTON et al., 2019).

Devido a alta atividade antimicrobiana do ZnO, seu estudo em tamanho nanométrico tem atraído atenção em áreas como a medicina, a odontologia, a farmácia, a alimentícia e a de suplemento alimentar animal. As NPs-ZnO são consideradas como um material seguro, não tóxico em baixas concentrações e, ao contrário de outros materiais nanoparticulados, possui aprovação junto ao FDA (*Food and Drug Administration*, Agência Federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos) como um aditivo alimentar (COTTON et al., 2019; AMENTA et al., 2015).

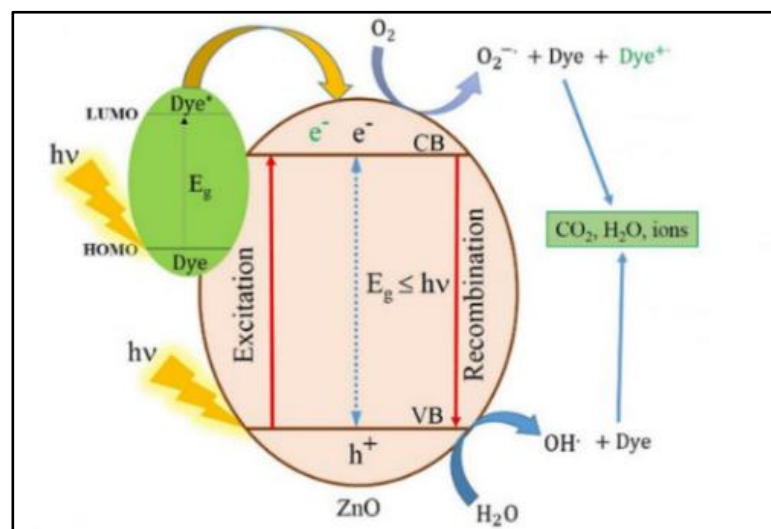
As propriedades físico-químicas dos materiais são distintas quando eles passam da escala de tamanho macroscópica para a nanométrica. Isto pode, por exemplo, ser observado na melhoria da atividade fotocatalítica pelas nanopartículas de ZnO devido ao aumento da área de superfície quando comparadas ao ZnO *bulk*. Tanto o aumento da área superficial quanto a morfologia e a cristalinidade são os fatores principais para um bom desempenho do material na aplicação em fotocatalise (NGUYEN, 2020).

Na degradação de azocorantes (anilina amarela, vermelho 40 etc.) presentes em águas residuais, as nanopartículas de ZnO foram utilizadas como fotocatalisadores. Por serem altamente fotoativas na região UV (100 a 400 nm – ISO-21348:2007) foram capazes de acelerar a degradação dos azocorantes. Estes corantes representam até 70% dos corantes orgânicos produzidos que são comumente usados nas indústrias têxteis, alimentícias, farmacêuticas etc. (WELDEGEBRIEAL, 2020).

As NPs-ZnO apresentam vantagens na degradação de azocorantes por serem de baixo custo, no entanto, sua eficiência é limitada na região do visível devido ao seu alto valor de *band gap*. Quando um fóton com energia igual ou maior à energia de *band gap* das NPs-ZnO incidi sobre elas, os elétrons da banda de valência (VB) ficam excitados e migram para a banda de condução (CB) reagindo com o oxigênio do ar e reduzindo-o a íons radicais superóxidos ($O_2^{\cdot -}$).

Ao migrarem da VB para a CB os elétrons deixam buracos (h^+) na VB. Nestes buracos, moléculas de água ou de corante, são adsorvidos e oxidados a íons radicais hidroxilas (OH^{\cdot}) e radicais catiônicos do corante ($Corante^{\cdot +}$), respectivamente. A formação de radicais hidroxilas reativos e íons radicais superóxidos, na solução, são os principais agentes que ocasionam uma cadeia de reações catalíticas que levam à degradação dos azocorantes (WELDEGEBRIEAL, 2020). A Figura 10 ilustra este processo de degradação.

Figura 10- Ilustração do mecanismo geral, hipotético, de degradação fotocatalítica de azocorantes por NPs-ZnO.



Fonte: Modificado de WELDEGEBRIEAL (2020).

O ZnO é naturalmente um semicondutor do tipo N com defeitos de estrutura, como a vacância (ausência de átomos de oxigênio nas posições regulares de rede) e sítios intersticiais (átomos de zinco que ocupam interstícios na rede cristalina). Estes defeitos de estrutura atuam como os agentes dopantes que são utilizados para aumentar ou diminuir a *band gap* do material. A propriedade do ZnO como um semicondutor pode ser potencializada quando ele passa para a escala nanométrica. A diminuição do tamanho do ZnO aumenta sua energia de *band gap* (WELDEGEBRIEAL, 2020) ampliando seu uso em biossensores, nanoeletrônica e células solares (JAYASEELAN et al., 2012).

A atividade antimicrobiana e anticâncer das NPs-ZnO foram avaliadas em um estudo de BALRAJ et al. (2017). Foram sintetizadas NPs-ZnO pela via extracelular utilizando o caldo de cultura da bactéria *Streptomyces* sp. a partir de uma solução de cloreto de zinco. Foram obtidas nanopartículas esféricas, de estrutura hexagonal wurtzita, com diâmetro médio de 20 a 50 nm. As NPs-ZnO apresentaram atividade anticâncer contra células cancerígenas do pulmão A549 na concentração inibitória (IC₅₀) de 15,6 µg.mL⁻¹ e atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Bacillus subtilis* (Gram-positiva)².

²A coloração de Gram recebeu este nome em homenagem a seu descobridor, o médico dinamarquês Hans Cristian Joaquim Gram. Em 1884, Gram observou que as bactérias adquiriram cores diferentes, quando tratadas com diferentes corantes. Isso permitiu classificá-las em dois grupos distintos: as que ficavam roxas, que foram chamadas de Gram-positivas, e as que ficavam vermelhas, chamadas de Gram-negativas. Em relação à composição da parede celular, as bactérias Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano e ácido teicóico, e as Gram-negativas, uma fina camada de peptidoglicano, sobre a qual se encontra uma camada composta por lipoproteínas, fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos (MARTINS, 1997).

O mecanismo da ação antimicrobiana das NPs-ZnO ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, há um consenso de que alguns fatores, além de contribuírem com a ação antimicrobiana, estão relacionados com os processos que a causam. Estes fatores são as EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), a atividade catalítica, a geração de íons Zn^{2+} , o tamanho e a morfologia das nanopartículas (COTTON et al., 2019).

APPLEROT et al. (2009) sintetizaram NPs-ZnO (7 nm) usando o método físico de irradiação ultrassônica. Os autores controlaram o tamanho das nanopartículas de ZnO através da utilização de diferentes solventes durante a ultra-sonicação. As NPs-ZnO foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) (COTTON et al., 2019).

APPLEROT et al. (2009) estudaram o mecanismo de ação e propuseram que a causa da atividade antimicrobiana foi favorecida pela entrada das NPs-ZnO na membrana celular. Eles observaram que quanto menor as partículas, maior foi a sua entrada nas células. Isso estaria induzindo um aumento das EROs no conteúdo celular e provocando reações oxidativas que levaram a morte das células. Neste estudo, verificou-se que as cepas de *E. coli* foram mais sensíveis às NPs-ZnO do que as cepas de *S. aureus*. Ainda, foram desconsideradas que a presença de íons Zn^{2+} também poderia ser responsável pela causa da atividade antimicrobiana (COTTON et al., 2019).

Contudo, alguns estudos têm mostrado que os íons Zn^{2+} , provenientes da dissolução parcial das NPs-ZnO, podem causar a morte de células bacterianas, pois interagem com a membrana celular levando a um aumento da permeabilidade dos íons para o interior das células (STANIĆ et al., 2010). Os íons Zn^{2+} podem se ligar com ácidos nucleicos e enzimas do sistema respiratório inibindo suas funções biológicas (PASQUET et al., 2014).

YAMAMOTO (2001) mostrou que a ação antibacteriana possui relação direta com o tamanho das partículas de ZnO. Foi estudada a influência do tamanho das partículas de ZnO na atividade antibacteriana contra as bactérias *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva). O tamanho das partículas de ZnO variaram de 100 nm a 800 nm. Neste estudo também foi verificado que quanto menor o tamanho das partículas de ZnO, maior foi a sua atividade antimicrobiana. As bactérias *E. coli* foram mais sensíveis, em relação a variação de tamanho das partículas de ZnO, do que as bactérias *S. aureus* (Gram-positiva) frente aos estudos realizados.

PADMAVATHY e VIJAYARAGHAVAN (2008) também estudaram a influência do tamanho das partículas de zinco na ação antibacteriana. As NPs-ZnO foram sintetizadas pelo método químico de precipitação. Foi avaliada a ação antibacteriana

contra *E. coli* (Gram-negativa) variando o tamanho das partículas de ZnO (12 nm, 45 nm e 2 μm). Neste estudo foi observado que quanto menor o tamanho das partículas, um maior número delas ficaram na superfície das bactérias gerando, conseqüentemente, uma maior quantidade de espécies reativas de oxigênio. Além disso, foi verificado que as NPs-ZnO foram mais abrasivas do que o ZnO *bulk*, o que causou maior danos à membrana celular das bactérias.

PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN (2008), BRAYNER et al. (2006) e RAGO et al. (2014) verificaram em seus estudos que as NPs-ZnO, em contato com a superfície das células, podem modificar a morfologia da mesma favorecendo maior permeabilidade das NPs-ZnO pela membrana celular. Os autores propuseram que a dissolução das nanopartículas promoveu maior liberação de íons Zn^{2+} e de espécies reativas de oxigênio na própria superfície da bactéria, causando danos celulares (COTTON et al., 2019).

1.4 Teoria de cristalização em meio líquido

O ZnO é um composto inorgânico cristalino, possui uma estrutura regular interna, com os átomos arranjados de forma ordenada e que se repetem periodicamente. Assim, para uma melhor compreensão dos parâmetros de síntese utilizados em nosso trabalho e como poderia ocorrer a formação dos cristais de ZnO, foram apresentados, nos parágrafos seguintes, alguns conceitos fundamentais sobre a precipitação de sólidos a partir de soluções.

Apesar do controle de tamanho e da morfologia das NPs-ZnO ser de grande importância, por estas características estarem intrinsecamente ligadas às suas aplicações, os fundamentos das variações morfológicas, em solução aquosa, carecem de estudos (KAWANO; IMAI, 2010).

A formação de cristais em meio líquido pode ocorrer de duas formas distintas. A primeira é a partir do líquido contendo a substância pura. Resfriando-se lentamente o líquido, abaixo de sua temperatura de fusão, obtém-se o sólido na sua forma cristalina. Um exemplo clássico é a formação de gelo a partir da solidificação da água. Com a diminuição da temperatura, a energia do movimento molecular é reduzida de modo que as moléculas ficam mais próximas umas das outras. Isto favorece as forças de atração entre elas (interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio) de modo que se colocam em posições mais estáveis (menor energia) levando a formação de uma estrutura regular, ou seja, a obtenção de um sólido cristalino (BUNN, 1972).

A segunda forma de obtenção de um sólido cristalino é a partir da precipitação de uma solução, onde o material dissolvido, por exemplo em água, precipita-se para formar os cristais. No entanto, isto ocorre quando a concentração da solução ultrapassa a concentração de saturação, levando a uma solução supersaturada; ou considerando a atividade química, quando o potencial químico (energia livre potencial molar) de uma substância em solução é maior do que o potencial de saturação, o precipitado é formado devido a diminuição da energia livre do sistema (NICHOLAS, 2011 apud BRECEVIC, 2000).

Nosso estudo envolveu a síntese de nanopartículas de óxido de zinco pela via extracelular, empregando o caldo de cultivo, livre de células, da bactéria *B. megaterium* RF1C. O caldo de cultivo, nomeado neste trabalho de *caldo de síntese*, foi misturado a uma solução do sal precursor de nitrato de zinco hexa-hidratado para formar o sólido cristalino. Assim, nas seções seguintes foi focada a obtenção de cristais a partir de soluções líquidas. A precipitação de solução envolve algumas etapas, como a supersaturação, a nucleação, o crescimento e o envelhecimento, que serão brevemente e qualitativamente abordadas.

1.4.1. Supersaturação

As substâncias possuem um determinado grau de solubilidade em um líquido, ou seja, se dissolvem até certo ponto a depender de vários fatores como a relação entre a quantidade de soluto e o seu volume, tipo de solvente, temperatura, pH etc. O grau de dissolução de substâncias pouco solúveis é expresso através de uma constante de equilíbrio que está relacionada com a solubilidade da substância no solvente. Esta constante é o K_{ps} - constante do produto de solubilidade (NICHOLAS, 2011).

Quando uma solução atinge o seu equilíbrio, tem-se uma solução saturada, pois uma determinada quantidade de solvente solubiliza o máximo de soluto. Assim, aumentando a quantidade de soluto no meio a solução torna-se supersaturada e acima de certo grau de saturação o precipitado é formado. A supersaturação é um fator determinante para o processo de cristalização a partir de solução e pode ser provocada através da alteração da temperatura, diminuição da quantidade de solvente (ex. evaporação), pela alteração na composição do solvente e pelo aumento na concentração do soluto (NICHOLAS, 2011 apud BRECEVIC, 2000).

Em sínteses químicas de NPs-ZnO realizadas em solução, como os métodos sol-gel, co-precipitação etc., a solubilidade dos íons Zn^{2+} depende do pH da solução. Desta forma, a supersaturação pode ser controlada pela variação do pH do meio. Soluções com

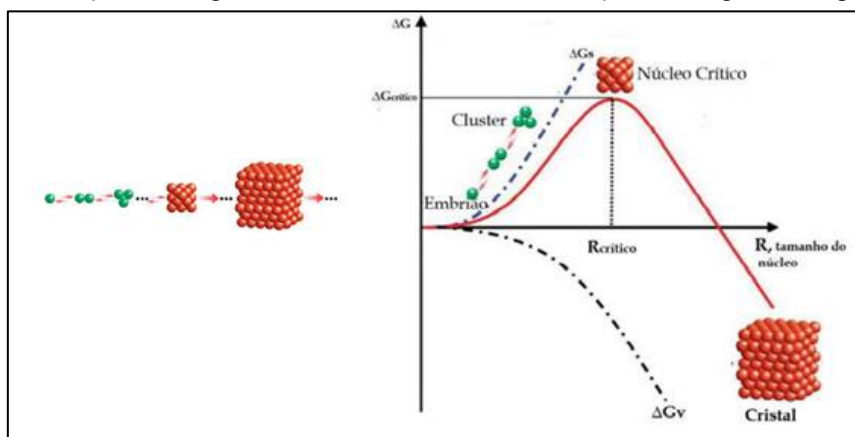
alto grau de supersaturação favorecem a alta taxa de nucleação com a formação de nanopartículas menores, enquanto soluções com menor grau de saturação favorecem uma baixa taxa de nucleação. A baixa taxa de nucleação pode favorecer a formação de nanobastões através do crescimento gradual do nanocristal no eixo *c*, como foi ilustrado na Figura 13 (Seção 1.4.3 p. 48). Neste caso, a variação no tempo de nucleação pode levar a obtenção de NPs-ZnO com uma distribuição de tamanho mais alargado. Assim, a adição de sementes (ex. pequenas quantidades de cristais suspensos) na síntese pode controlar melhor a distribuição de tamanho das nanopartículas (KAWANO; IMAI, 2010).

1.4.2. Nucleação

O processo de nucleação consiste no agrupamento de constituintes dissolvidos em uma solução que vão se juntando e formando pequenos cristais ou germes cristalinos. É a primeira etapa da cristalização e pode ocorrer através de mecanismos primários e secundários. No mecanismo primário a nucleação ocorre na ausência de soluto ou cristais suspensos, já o mecanismo secundário requer a presença de cristais na solução supersaturada (MUÑOZ, 2018).

A nucleação pode ainda ocorrer de forma espontânea e aleatória formando cristais puros (nucleação homogênea) ou pode ocorrer a partir da adsorção em pequenas partículas contaminantes, se presentes na solução (nucleação heterogênea) (NICHOLAS, 2011). No entanto, os germes formados são instáveis e podem ainda se dissolverem no meio. Para continuarem a crescer precisam atingir um tamanho crítico do núcleo (Figura 11). É mais propenso o crescimento dos cristais a partir de núcleos já formados na solução do que a formação de novos germes (BUNN, 1972).

Figura 11- Representação da teoria da nucleação clássica. ΔG é a variação da energia livre superficial, ΔG_v é a variação da energia livre volumétrica e ΔG_s é a variação da energia livre superficial.



Fonte: MUÑOZ (2018).

Alguns fatores influenciam na nucleação, por exemplo a agitação. Os sistemas em que a formação de cristais ocorre sem perturbação do meio, os cristais tendem a crescer de forma mais lenta. Assim, poucos núcleos são formados gerando cristais maiores e mais perfeitos (BUNN, 1972). Outro fator é o grau de supersaturação, quanto maior o seu grau, menor o núcleo inicial, mais fácil a sua formação e mais rápida a geração de novos núcleos, o que significa que em solução com alta supersaturação a nucleação é favorecida em detrimento ao crescimento das partículas ou cristais (NICHOLAS, 2011).

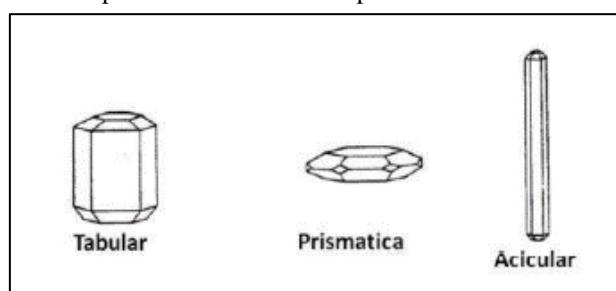
Contudo, para favorecer o crescimento das partículas com supersaturação reduzida alguns procedimentos podem ser aplicados, tais como o aumento da temperatura e a adição lenta do agente de precipitação, em agitação vigorosa, a fim de favorecer a homogeneidade do sistema (MUÑOZ, 2018).

1.4.3 Crescimento do cristal

Após a nucleação, a supersaturação da solução diminui e com isso novos núcleos deixam de ser formados e o cristal passa a crescer na solução. Isto ocorre através da integração de duas ou mais unidades de crescimento para formar um cristal maior; e da difusão da unidade de crescimento (moléculas ou íons do soluto) da solução para a superfície do cristal de forma a se incorporar no retículo cristalino (MUÑOZ, 2018; NICHOLAS, 2011).

É importante o conceito de hábito cristalino, que corresponde a aparência do cristal, como a morfologia e o tamanho. Como os ângulos entre as faces adjacentes são constantes e característicos de cada estrutura cristalina, variando-se o tamanho das faces é possível obter morfologias e tamanhos diferentes de cristais. Vários fatores relacionados com as condições em que o cristal cresce podem influenciar o hábito cristalino, dentre eles a supersaturação, a agitação, a presença de impurezas, a temperatura, a pressão, o solvente, a presença de matéria orgânica etc. A Figura 12 ilustra três tipos de hábito cristalino diferentes, mas pertencentes ao mesmo sistema cristalino (hexagonal) (MUÑOZ, 2018).

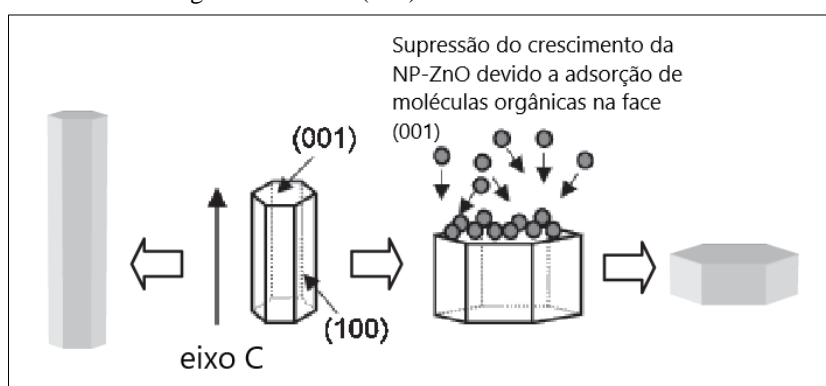
Figura 12- Três diferentes tipos de hábito cristalino para o mesmo sistema cristalino – hexagonal.



Fonte: MUÑOZ (2018).

A adsorção de moléculas orgânicas na face (001) limita o crescimento dos monocristais de ZnO na direção do eixo c formando nanopartículas com morfologia platiforme (Figura 13) (KAWANO; IMAI, 2010). Neste exemplo, pode-se notar que as moléculas orgânicas têm influência sobre a morfologia das nanopartículas, pois impedem (ou diminuem a velocidade) de crescimento do cristal na face em que ela é adsorvida. Portanto, o caldo de cultura proveniente do cultivo de bactérias, utilizado na síntese de NPs-ZnO neste estudo, possui muitas e variadas moléculas orgânicas que podem interferir no crescimento e na forma do cristal formado.

Figura 13- Exemplo de modelagem de morfologia das NPs provocada pela adsorção de moléculas orgânicas na face (001) de nanocristais de ZnO.



Fonte: Modificado de KAWANO; IMAI (2010).

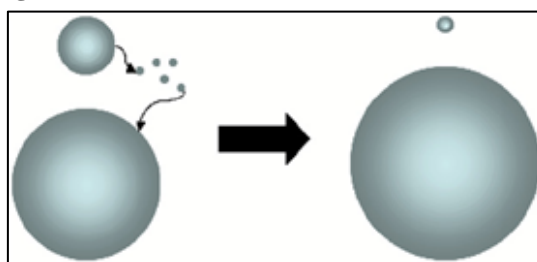
1.4.4 Amadurecimento e envelhecimento do cristal

Como descrito, a formação de cristais a partir de um líquido pode ocorrer através de uma solução supersaturada. Contudo, à medida em que ocorre a nucleação a solução diminui seu grau de supersaturação, tornando-se saturada. Conseqüentemente, haverá um menor crescimento dos cristais. Devido a diferença de saturação nos diversos locais da solução e do tempo de nucleação, os cristais formados possuem diferenças de tamanhos, sendo os menores os mais instáveis por possuírem maior energia devido a maior razão entre superfície/volume. No entanto, mesmo com a diminuição da supersaturação da solução, os cristais continuam crescendo através do processo de envelhecimento (NICHOLAS, 2011).

O amadurecimento de Ostwald é o processo de envelhecimento mais conhecido e consiste na redissolução preferencial dos cristais menores que são solvatados e reprecipitados sobre os cristais maiores (Figura 14). Desta forma, há um aumento tanto no tamanho dos cristais, quanto na sua distribuição de tamanho, levando a uma

diminuição da quantidade total de cristais no meio. Uma forma de prevenir este efeito é através da adição de estabilizantes na solução, pois evitam o crescimento e a redissolução dos cristais (ATKINS et al., 2008). Como foi descrito na Seção 1.2 vários estudos atribuem à matéria orgânica, produzida e secretada/excretada para o meio de cultura pelos microrganismos, esta função de estabilização das nanopartículas.

Figura 14- Processo de amadurecimento de Ostwald.



Fonte: FRANZOL (2015).

1.5 *Bacillus megaterium*

Em nosso estudo, o microrganismo utilizado nas sínteses das nanopartículas de óxido de zinco, após uma triagem, foi a bactéria *Bacillus megaterium* RF1C isolada das folhas de cultura da laranja na região de Araraquara/SP (ANJOS, 2018).

Bacillus megaterium é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia, que por ser um microrganismo tolerante a diferentes temperaturas, salinidade e pressão osmótica altas, se adapta aos diversos tipos de ambientes. Pode ser encontrada no solo, em águas pluviais e marinhas, na rizosfera de diversas plantas etc.

O interesse econômico por este microrganismo está na capacidade de algumas cepas, produzirem substâncias de valor comercial, tais como penicilina acilase, amilase, glicose desidrogenase, emicina, oxitanocina, esteroide hidrolase, vitamina B12, dentre outras. A bactéria pode ainda de ser usada como hospedeiro para a expressão de DNA recombinante (SOUZA, 2007) e na produção de proteínas recombinantes (BUNK, 2010). Algumas cepas também produzem ácido poli- γ -glutâmico (SHIMIZU et al., 2007), auxinas e poliaminas (VÍLCHEZ, 2018) e compostos fenólicos (CHAKRABORTY et al., 2006).

A temperatura ótima para o crescimento da bactéria *B. megaterium* varia entre 28 e 35°C - não crescendo acima de 45°C. O pH ótimo de crescimento está entre 7,0 e 8,5 - não crescendo em pH abaixo de 5,0 (SOUZA, 2007 apud BERGEY, 1974).

A bactéria *B. megaterium* tem ainda a capacidade de esporular quando exposta a ambiente não favorável ao seu crescimento, como baixo teor de nutriente, alta densidade

celular no meio, temperaturas mais elevadas e baixa disponibilidade de água. A espécie vegetativa é constituída por células cilíndricas grandes com extremidades arredondadas que podem ter tamanhos distintos a depender do meio em que é cultivada. Em Agar Nutriente as dimensões são em torno de 1,5 μm de diâmetro e entre 2,5 e 6,0 μm de comprimento (SOUZA, 2007).

As colônias de *B. megaterium* têm aspecto circulares com superfície levemente rugosa, margens onduladas, de coloração branca leitosa a levemente amarelada (SOUZA, 2007).

Este estudo propôs o desenvolvimento da síntese biológica de NPs-ZnO com a bactéria *B. megaterium* RF1C.

2. MOTIVAÇÃO

A importância e a necessidade de desenvolver novas metodologias de sínteses economicamente viáveis e sustentáveis ao meio ambiente, bem como a falta de estudos de otimização dos parâmetros de síntese para a obtenção de nanopartículas de óxido de zinco pela via biológica mediada por bactérias motivaram o desenvolvimento desta Dissertação de Mestrado (Figura 15).

Ademais, estudos na literatura, têm explorado poucos microrganismos capazes de sintetizar nanopartículas de ZnO, principalmente pela via extracelular.

Figura 15- Etapas para otimização na obtenção de nanopartículas por células microbianas.



Fonte: Modificado de YUSOF et al. (2019).

O Grupo de Química Orgânica e Biocatálise vem desenvolvendo metodologias de síntese de compostos enantiomericamente puros ou enriquecidos, utilizando enzimas, bem como a biotransformação de produtos naturais e sintéticos; a biodegradação e biorremediação de compostos organopoluentes, tais como os pesticidas.

Assim, a obtenção de nanopartículas de óxido de zinco, pela via biológica, além de contribuir para a melhoria dos processos sustentáveis, amplia os trabalhos de pesquisa do grupo, podendo ser usadas posteriormente para estudos mais direcionados à sua aplicação, como por exemplo, na fotodegradação e biodegradação de pesticidas e em catálise de síntese orgânica.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo

O objetivo deste estudo foi sintetizar nanopartículas de ZnO através do caldo de cultivo, livre de células, da bactéria *Bacillus megaterium* RF1C.

3.2 Objetivos específicos

- a) Obter as nanopartículas de óxido de zinco através da síntese biológica, mediada por bactéria, pela via extracelular.
- b) Sintetizar nanopartículas de ZnO variando os parâmetros de síntese, tais como o pH; a quantidade da matéria orgânica, proveniente do caldo de cultivo da bactéria, livre de células; a concentração do reagente precursor das nanopartículas – nitrato de zinco hexa-hidratado e o tempo de síntese.
- c) Caracterizar as nanopartículas obtidas nas sínteses através das técnicas de Espectroscopia Ultravioleta-Visível (UV-vis), Análise de Difração de Raios-X (XRD) e Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- d) Verificar o teor de matéria orgânica nas NPs-ZnO através de análise Termogravimétrica (TG).
- e) Caracterizar a matéria orgânica (caldo de cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C, livre de células) através das técnicas de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia a Gás (GC-FID). Analisar o teor de açúcares totais, de proteínas totais e de lipídeos totais. Identificar a faixa de tamanho das proteínas presentes no caldo através da técnica de Eletroforese.
- f) Verificar a morfologia das nanopartículas de ZnO utilizando o caldo de cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C, livre de células, com 12 h de cultivo; caldo de cultivo, livre de células, com 24 h de cultivo de mais uma espécie distinta de *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens* RFD1C) e pela adição de moléculas orgânicas como o ácido cítrico, a *L-cysteine hydrochloride monohydrate*, o biossurfactante – Ramnolípido comercial e o 1,3-diaminopropano.
- g) Realizar ensaios antimicrobianos com as NPs-ZnO sintetizadas pela via biológica.

4. PARTE EXPERIMENTAL I

Na Seção 4.1 (p. 54) estão descritos os materiais, os reagentes e os meios de cultura utilizados nas sínteses das nanopartículas de óxido de zinco pela via extracelular empregando o *caldo de síntese* da bactéria *Bacillus megaterium* RF1C e os reagentes usados na análise de eletroforese.

Caldo de síntese foi o termo dado ao caldo de cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* RF1C após ser centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos e filtrado em filtro de seringa de 0,45 µm. É o caldo sem as células bacterianas utilizado nas sínteses das NPs-ZnO.

Os reagentes e os meios de cultura foram utilizados sem tratamento adicional. A água deionizada utilizada no preparo das soluções, nas sínteses e no preparo dos meios de cultura foi obtida do sistema de purificação Tecnal – Osmose Reversa R-TE-4007-10. A água Milli-Q usada no preparo das soluções da análise de eletroforese foi obtida do sistema de purificação Elga – modelo Purelab Option-Q7 junto ao Laboratório do Grupo de Bioquímica Molecular e Estrutural e Grupo de Química Medicinal e Biológica coordenado pela Profa. Dra. Fernanda Canduri (IQSC/USP).

Na Seção 4.2 estão descritas as metodologias usadas no preparo das soluções e dos meios de cultura, na quantificação do crescimento da bactéria *B. megaterium* RF1C, no cultivo dos microrganismos, no teste antimicrobiano e nos cálculos do rendimento.

Na Seção 4.3 estão descritas as técnicas utilizadas na caracterização das NPs-ZnO e do caldo de cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C, livre de células, usado nas sínteses das NPs-ZnO.

4.1 Materiais e equipamentos

Todos os materiais, vidrarias e meios de cultura utilizados durante a manipulação e o cultivo dos microrganismos foram previamente esterilizados em autoclave vertical (Phoenix) a 120°C por 20 minutos.

4.1.1 Reagentes e meios de cultura

Na Tabela 1 consta a relação dos reagentes e dos meios de cultura usados nas sínteses e nas caracterizações das NPs-ZnO. A Tabela 2 mostra a composição do meio de cultura *Nutrient Broth* usado no preparo dos meios de cultura sólido e líquido para o cultivo dos microrganismos utilizados neste trabalho.

Tabela 1- Relação dos reagentes e dos meios de cultura usados nas sínteses e nas caracterizações das NPs-ZnO.

Reagentes	Pureza	Fornecedor	Lote
Agar Nutriente	-	Êxodo Científica	2111166242
Acetato de etila grau HPLC - C ₄ H ₈ O ₂	-	Synth	-
Acetato de etila PA - C ₄ H ₈ O ₂	-	Synth	-
Ácido acético PA - C ₂ H ₄ O ₂	99,7%	Qhemis	19857
Ácido cítrico – C ₆ H ₈ O ₇	99%	Synth	-
Acrilamida - C ₃ H ₅ NO	98,53%	Neon	42465
<i>bis</i> -Acrilamida - (H ₂ C=CHCONH) ₂ CH ₂	>98%	Proquímica	07/0644
Álcool etílico PA - C ₂ H ₆ O	99,85%	Neon	45077
Azul de bromofenol - C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	-	Proquímica	06/1114
Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) - C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S	98%	Sigma Aldrich	MKCR0748
Cloreto de sódio -NaCl	99%	Synth	211077
Corante azul de coomassie - C ₄₇ H ₄₈ N ₃ NaO ₇ S ₂	-	Proquímica	14/0704
<i>L-Cysteine hydrochloride monohydrate</i> - C ₃ H ₈ ClNO ₂ S.H ₂ O	98,5%	Sigma Aldrich	-
1,3-Diaminopropano - C ₃ H ₁₀ N ₂	99%	Sigma Aldrich	STBC4560V
Dodecil sulfato de sódio - NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	>98,5%	Sigma Aldrich	046K0085
Glicerina – CH ₂ (OH)CH ₂ (OH)CH ₂ (OH)	99,5%	Êxodo Científica	2101060058
Hidróxido de sódio - NaOH	97%	Synth	157163
2-Mercaptoetanol - C ₂ H ₆ OS	-	Sigma Aldrich	-
Nitrato de zinco hexa-hidratado - (ZnNO ₃) ₂ 6H ₂ O	98%	Neon	52728
<i>Nutrient Broth</i> – NB	-	HIMEDIA	0000456633 0000495960
Persulfato de amônio - (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	98%	Proquímica	15/0030
<i>Protein MW Low Range</i>	-	-	-
Ramnopolídeo comercial	90%	AGAE Technologies	-
Solução tampão Buffer pH 4,0 ± 0,02	-	Êxodo Científica	2111045984
Solução tampão Buffer pH 7,0 ± 0,02	-	Êxodo Científica	2111106111
Tetrametiletilenodiamina (Temed) - C ₆ H ₁₆ N ₂	99%	Sigma Aldrich	832479-227
Tris-HCl	-	Hexapur	685411

Fonte: Autoria própria.

Tabela 2- Composição do *Nutrient Broth* usado no preparo do meio de cultura sólido (Agar Nutriente) e líquido (caldo nutriente) utilizados no cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C.

Composição do <i>Nutrient Broth</i>	g . L ⁻¹
Peptona	5,00
NaCl	5,00
HM peptona B#	1,50
Extrato de levedura	1,50

Fonte: Autoria própria.

4.1.2 Microrganismos

As bactérias *Bacillus megaterium* RF1C, *Bacillus amyloliquefaciens* RFD1C e *Bacillus pseudomycooides* 2RF2C (Tabela 3 e Figura 16) usadas neste trabalho foram isoladas das folhas de cultura da laranja coletadas na região de Araraquara/SP pela Doutora Charlene Souza dos Anjos (ANJOS, 2014).

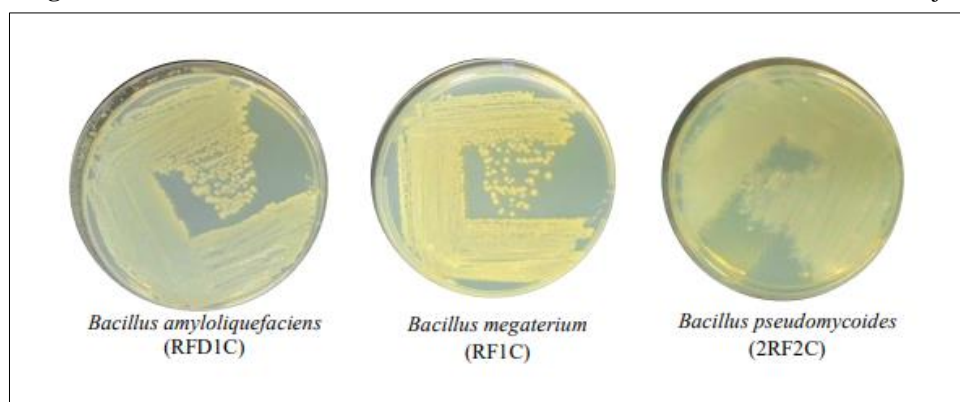
Estas linhagens encontram-se preservadas na coleção de cultura de pesquisa do Grupo de Química Orgânica e Biocatálise do Instituto de Química de São Carlos da USP. As bactérias encontram-se armazenadas em solução de glicerina a -20°C e -80°C (ANJOS, 2014).

Tabela 3- Relação das bactérias usadas na obtenção das NPs-ZnO com seus respectivos códigos de isolamento e identificação.

Bactérias	Código de isolamento	Código de identificação	Teste de Gram
<i>Bacillus megaterium</i>	MF537621.1	RF1C	Gram-positiva
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MF510169	RFD1C	Gram-positiva
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	KY621921.1	2RF2C	Gram-positiva

Fonte: A autoria própria.

Figura 16- Placas de culturas em meio sólido das bactérias isoladas da folha da laranja.



Fonte: Modificado de VIANA (2020).

4.1.3 Equipamentos e materiais

Estão descritos os equipamentos usados tanto na Parte Experimental I (Seção 4) quanto na Parte Experimental II (Seção 5): agitador de tubos Vortex (Gehaka), autoclave vertical (Phoenix), balança analítica (Shimadzu), banho-maria (Caframo - modelo-micro), banho ultrassom (Unique - modelo Ultra Cleaner 1450), cabine de fluxo laminar (Veco), centrífuga (Hitachi – modelo CR22GIII), evaporador rotativo (Tecnal), filtro de seringa PES de 0,22 µm (Sartorius stedim – referência 16532), filtro de seringa PES de 0,45 µm (GVS Filter Technology – referência FJ25BSCPS004AL01) incubadora shaker

de bancada refrigerada (Novatécnica), medidor de pH de bancada (Qualxtron - modelo 8010) e micropipeta automática de monocanal e de 8 canais.

4.2 Metodologia

Nos procedimentos que requereram a verificação e/ou o ajuste de pH, foi feita a calibração do equipamento, nos valores de pH 4,0 e 7,0, antes de efetuar as medidas.

4.2.1 Preparo das soluções usadas nas sínteses das NPs-ZnO

4.2.1.1 Preparo da solução 0,32M de nitrato de zinco hexa-hidratado ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)

Esta solução foi sempre preparada um dia antes de realizar as sínteses (Seção 5) das nanopartículas, não sendo estocada.

Para o preparo de 100 mL de solução pesou-se 9,52 g de ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) em um vidro de relógio os quais foram transferidos para um frasco béquer de 50 mL e solubilizados em 40 mL de água deionizada. Em seguida, para uma melhor solubilização do sal, o frasco béquer foi colocado em banho maria a 40°C por 20 minutos e depois em ultrassom por mais 10 minutos. Após, o conteúdo do frasco béquer teve sua temperatura ajustada para 25°C e com o auxílio de um funil de vidro, este volume foi transferido para um balão volumétrico de 100 mL e teve seu volume completado e aferido com água deionizada a 25 °C. Em seguida a solução foi filtrada em filtro de seringa de 0,2 μm e vertida em um frasco âmbar esterilizado (50 mL) e armazenada em geladeira (4°C) para posterior utilização. A filtração foi realizada dentro da cabine de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% e luz germicida UV (254nm) por 20 minutos.

As soluções de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ de concentração abaixo de 0,32 M foram diluídas a partir da solução de 0,32 M, através da fórmula de diluição descrita na equação 6. As concentrações acima de 0,32 M foram preparadas seguindo o procedimento descrito, variando apenas a quantidade do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ pesada.

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Equação 6

Onde:

- C_1 é a concentração da solução de partida;
- V_1 é o volume da solução de partida;
- C_2 é a concentração da solução diluída;
- V_2 é o volume final da solução diluída.

4.2.1.2. Preparo da solução 1 M de hidróxido de sódio

Para o preparo de 100 mL de solução 1M de NaOH foram pesados 4 g de hidróxido de sódio em um vidro de relógio, transferidos para um frasco béquer de plástico e foram solubilizados em 100 mL de água deionizada. Em seguida a solução foi vertida em um recipiente de plástico e armazenada à temperatura ambiente.

4.2.2 Preparo das soluções e dos géis usados na análise de eletroforese

As soluções e géis das seções seguintes, 4.2.2.1 a 4.2.2.10, foram realizados no Laboratório do Grupo de Bioquímica Molecular e Estrutural e Grupo de Química Medicinal e Biológica da Profa. Dra. Fernanda Canduri (IQSC/USP).

4.2.2.1 Preparo da solução de poliacrilamida

Em dois vidros de relógio foram pesados, de forma distinta, 75 g do reagente acrilamida e 2 g do reagente *bis*-acrilamida. Os reagentes foram transferidos para um frasco béquer de 250 mL e foram dissolvidos em aproximadamente 170 mL de água Milli-Q. O conteúdo teve sua temperatura ajustada para 25 °C e com auxílio de um funil de vidro foram transferidos para um balão volumétrico de 250 mL, o qual teve seu volume completado e aferido com água Milli-Q a 25 °C. A solução foi transferida para um frasco embrulhado com papel alumínio e armazenada na geladeira (4°C).

4.2.2.2 Preparo do tampão de Tris-HCl 2 M pH 8,8

Para o preparo de 250 mL de tampão, foram pesados 60,57 g de Tris-HCl em um vidro de relógio e transferidos para um béquer de 250 mL. O Tris-HCl foi dissolvido em aproximadamente 230 mL de água Milli-Q. Em seguida, após ajuste da temperatura para 25 °C, o pH foi ajustado para 8,8 com HCl concentrado. Por fim, o volume foi transferido, com o auxílio de um funil de vidro, para um balão volumétrico de 250 mL onde teve seu volume completado e aferido com água Milli-Q a 25 °C.

4.2.2.3 Preparo do tampão de Tris-HCl 2 M pH 6,8

Para o preparo de 100 mL de tampão, foram pesados 24,23 g de Tris-HCl em um vidro de relógio e transferidos para um frasco béquer de 100 mL. O Tris-HCl foi dissolvido em aproximadamente 90 mL de água Milli-Q. Em seguida, após ajuste da temperatura para 25 °C, o pH foi ajustado para 6,8 com HCl concentrado. Por fim, o

volume foi transferido, com o auxílio de um funil de vidro, para um balão volumétrico de 100 mL onde teve seu volume completado e aferido com água Milli-Q a 25 °C.

4.2.2.4 Preparo do tampão de Tris-HCl 50 mM pH 7,2

Para o preparo de 2 L de tampão, foram pesados 12,11 g de Tris-HCl em um vidro de relógio e transferidos para um frasco béquer de 2 L. O Tris-HCl foi dissolvido em aproximadamente 1,8 L de água Milli-Q. Em seguida, em agitação magnética, o pH foi ajustado para 7,2 com HCl concentrado. O volume foi transferido para uma proveta de 2 L onde teve seu volume completado e aferido com água Milli-Q.

4.2.2.5 Preparo do tampão corante para amostra de eletroforese

Para o preparo de 30 mL de tampão, 1,5 mL do tampão Tris-HCl pH 6,8; 6 mL de glicerol e 420,5 µL de 2-mercaptoetanol foram transferidos para um frasco béquer de 50 mL. Em seguida, foram pesados 0,06 g de azul bromofenol e 1,2 g de dodecil sulfato de sódio e transferidos para um frasco béquer. Após, foram adicionados ao frasco béquer um volume de 22,08 mL de água Milli-Q. Os reagentes foram misturados manualmente, com o auxílio de um bastão de vidro, até obtenção de uma solução homogênea. A solução foi armazenada em geladeira (4°C) por tempo indeterminado até o seu uso.

4.2.2.6 Preparo da solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%

Para o preparo de 50 mL de solução SDS 10%, foram pesados em um vidro de relógio 5 g do reagente dodecil sulfato de sódio. Em seguida, o reagente foi transferido para um frasco béquer de 50 mL onde foi dissolvido em aproximadamente 30 mL de água Milli-Q. Após ajuste da temperatura para 25 °C, o volume foi transferido, com o auxílio de um funil de vidro, para um balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão foi completado e aferido com água Milli-Q a 25 °C.

4.2.2.7 Preparo da solução de persulfato de amônio (PA) 10%

Para o preparo de 10 mL de solução, foi pesado 1 g do reagente persulfato de amônio e adicionado um volume de 10 mL de água Milli-Q. Para a dissolução do reagente, foi usado o agitador Vórtex.

4.2.2.8 Preparo da solução do corante azul de coomassie

Para o preparo de 200 mL de solução do corante azul de coomassie, em um vidro de relógio foram pesados 0,4 g do corante azul de coomassie que em seguida foi transferido para um frasco béquer de 250 mL. Ao béquer foram adicionados 20 mL de ácido acético PA, 100 mL de álcool etílico PA e 80 mL de água Milli-Q. A solução foi agitada manualmente, com auxílio de um bastão de vidro, e em seguida foi armazenada em frasco âmbar de 500 mL à temperatura ambiente por tempo indeterminado até o seu uso.

4.2.2.9 Preparo da solução descorante do gel de poliacrilamida

Para o preparo de 200 mL da solução descorante foram adicionados em um frasco béquer de 250 mL um volume de 20 mL de ácido acético PA, 100 mL de álcool etílico PA e 80 mL de água Milli-Q. A solução foi agitada manualmente, com auxílio de um bastão de vidro, e em seguida foi armazenada em um frasco âmbar de 500 mL à temperatura ambiente por tempo indeterminado até o seu uso.

4.2.2.10 Preparo do gel de resolução

Como se trata do preparo de um gel, que gelifica rápido, o preparo da solução foi feito de forma breve. Em um frasco erlenmeyer de 50 mL foram adicionados na seguinte ordem: 1 mL do tampão Tris-HCl (pH 8,8 2 M), 50 μ L da solução de SDS 10%, 50 μ L de água Milli-Q, 2,5 mL da solução de acrilamida (30%), 1,4 mL de água Milli-Q, 6 μ L de tetrametiletilenodiamina (Temed) e 30 μ L de persulfato de amônio (P.A.) (10%). A mistura foi agitada manualmente e foi utilizada logo em seguida no preparo do gel.

4.2.2.11 Preparo do gel de empilhamento

Como se trata do preparo de um gel, que gelifica rápido, o preparo da solução foi feito de forma breve. Em um frasco erlenmeyer de 50 mL foram adicionados de forma breve, na ordem que segue, 120 μ L do tampão Tris-HCl pH 6,8 2 M, 20 μ L da solução de SDS 10%, 20 μ L de água Milli-Q, 300 μ L da solução de acrilamida (30%), 1,5 mL de água Milli-Q, 3 μ L da solução de Temed e 15 μ L de PA (10%). A mistura foi agitada manualmente e utilizada logo em seguida no preparo do gel.

4.2.3 Preparo dos meios de cultura e das soluções usadas na contagem de células bacterianas viáveis e no teste antimicrobiano

4.2.3.1 Preparo do meio de cultivo sólido – Agar Nutriente (AN)

Para o preparo do meio de cultura, para um total de 10 placas de Petri, foram pesadas 2,6 g de *Nutrient Broth* e 4 g de Agar em um vidro de relógio. Ambos foram transferidos para um frasco béquer no qual foi adicionado 200 mL de água deionizada e mantidos em agitação manual até completa solubilização. Em seguida foi verificado o valor do pH ($7,0 \pm 0,2$) do meio de cultura utilizando um medidor de pH de bancada.

O conteúdo foi vertido em um frasco Schott de 500 mL e esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização o meio de cultura foi resfriado à temperatura ambiente e vertido em placa de Petri esterilizada descartável (plástico) e de diâmetro de 90 x 15 mm de altura. Em cada placa foram vertidos aproximadamente 20 mL de meio de cultura. Após a completa solidificação do meio de cultura, à temperatura ambiente, as placas foram fechadas e tiveram suas bordas vedadas com parafilme. Em seguida, foram identificadas e armazenadas na geladeira (4°C) para serem utilizadas no tempo máximo de 2 meses. Todo o procedimento de preparo dos meios de cultura sólido em placas de Petri foi realizado dentro da cabine de fluxo laminar (Veco) previamente limpa com álcool 70% e luz germicida UV (254nm) por 20 minutos.

4.2.3.2 Preparo do caldo nutriente (CN)

Para o preparo do caldo nutriente foram pesadas em vidro de relógio 2,6 g do meio de cultura *Nutrient Broth* e transferidas para um frasco béquer no qual foi adicionado 150 mL de água deionizada e mantidos em agitação manual até a completa dissolução. Em seguida foi verificado o valor do pH ($7,0 \pm 0,2$) do caldo utilizando um medidor de pH de bancada. O conteúdo foi vertido em um frasco erlenmeyer de 500 mL, o qual foi vedado com um tampão de algodão/gaze e esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos. O caldo nutriente foi preparado no dia anterior da sua utilização.

4.2.3.3 Preparo da solução salina 0,86% de NaCl

Para o preparo de 100 mL de solução salina 0,86% de NaCl foram pesados 0,86 g de cloreto de sódio em um vidro de relógio e transferidos para um frasco béquer onde foi adicionado 100 mL de água deionizada. Após a completa solubilização, a solução foi transferida para frasco Schott e esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos. A

solução foi armazenada em temperatura ambiente e utilizada dentro do prazo máximo de 15 dias.

4.2.3.4 Preparo da solução 20% de glicerina

Para o preparo de 30 mL de solução 20% de glicerina foram pesados 0,39 g de *Nutrient Broth* em um frasco béquer de 50 mL e dissolvidos em 24 mL de água deionizada em agitação manual. Em seguida, 6 mL de glicerina foram adicionados. A solução de glicerina foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos e após resfriamento, à temperatura ambiente, ficou armazenada em geladeira (4°C) até o seu uso.

4.2.3.5 Preparo da solução de brometo 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) 1 mg.mL⁻¹

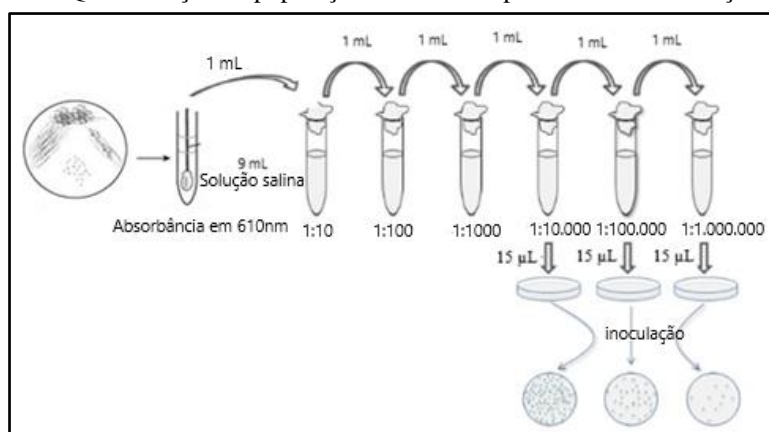
Para o preparo de 15 mL de solução, em um frasco béquer de 25 mL foram pesados 15 mg de MTT. Dentro da capela de fluxo laminar foram adicionados 15 mL de água deionizada esterilizada ao béquer. O MTT foi dissolvido por agitação manual. Após completa solubilização do MTT, a solução foi filtrada em filtro de seringa de 0,2 µm e armazenada em frasco âmbar revestido em papel alumínio e conservado em geladeira a 4°C onde permaneceu estocado no máximo por 10 dias.

4.2.4 Contagem de células viáveis da bactéria *B. megaterium* RF1C

Este protocolo foi realizado para quantificar a população das bactérias viáveis de *B. megaterium* RF1C após o inóculo em meio de cultura líquido. Este procedimento foi necessário para se ter a relação entre a quantidade de unidades formadoras de colônia por mL e o valor de absorbância obtido no UV-vis. Assim, foi possível obter a quantificação estimada das colônias no meio de cultivo, o qual foi utilizado na síntese das NPs-ZnO após a separação das células por centrifugação.

Para o procedimento da diluição seriada da população bacteriana, seguida da contagem de colônias em placa, pelo método de semeadura por espalhamento, e a relação entre a densidade ótica com o número de células, empregou-se como referência as literaturas de BROCK et al., p. 155-158, 2016 e Miles et al. (1938). O procedimento está ilustrado na Figura 17.

A quantificação do crescimento das bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* RFD1C e *Bacillus pseudomycooides* 2RF2C, cujo caldo de síntese foi usado na *Síntese 1* (Seção 5.1.1, p. 81), seguiu o mesmo procedimento realizado pela *B. megaterium* RF1C.

Figura 17- Quantificação da população de bactérias pelo método de diluição seriada.

Fonte: Modificado de Disponível em: tecnica-diluic3a7c3a3o-seriada.jpg (960×540) (wordpress.com). Acesso em 18 de mai. 2023.

A Tabela 4 contém os valores de absorbância empregados neste trabalho, os quais estimam uma concentração de bactéria na ordem de 10^6 UFC mL⁻¹. Os valores de absorbância foram empregados no cultivo das bactérias em meio líquido (Seção 4.2.5.2, p. 64) cujo *caldo de síntese*, livre de células, foi usado posteriormente nas sínteses de NPs-ZnO (Seção 5).

Tabela 4- Valores de absorbância das suspensões bacterianas que foram empregadas no cultivo das bactérias em meio líquido para a obtenção do *caldo de síntese*.

Bactéria	Código	Absorbância (610nm)
<i>Bacillus megaterium</i>	RF1C	0,202 ± 0,015
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	RFD1C	0,213 ± 0,015
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	2RF2C	0,167 ± 0,015

Fonte: Autoria própria.

4.2.5 Cultivo dos microrganismos

Todos os procedimentos descritos nas Seções 4.2.5.1 (p. 61) e 4.2.5.2 (p. 62) foram realizados dentro da cabine de fluxo laminar previamente limpa com álcool 70% e luz germicida UV (254nm) por 20 minutos. Esses procedimentos foram realizados antes de cada síntese para a obtenção das nanopartículas de óxido de zinco.

4.2.5.1 Cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C em meio de cultura sólido

Inicialmente foi feito um repique da bactéria *B. megaterium* RF1C, preservada na solução de glicerina (20%) e armazenada em freezer (-20°C), para uma placa de Petri contendo o meio de cultura Agar Nutriente. O repique da bactéria foi feito com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, previamente esterilizada em chama no bico de Bunsen. O

inóculo na placa de Petri foi incubado em estufa a $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por $24 \pm 1\text{h}$ para o crescimento das colônias bacterianas.

Os cultivos em meio de cultura sólido das bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* RFD1C e *Bacillus pseudomycooides* 2RF2C, cujos *caldos de síntese* foram usados apenas na *Síntese 1* da Seção 5.1.1 (p. 81) seguiram o mesmo procedimento utilizado com a *B. megaterium* RF1C.

4.2.5.2 Cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C no caldo nutriente

Após 24 h de crescimento da bactéria *B. megaterium* RF1C em placa de Petri (Seção 4.2.5.1, p. 63), com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, esterilizada na chama do bico de Bunsen, foi retirado um inóculo bacteriano da superfície da placa e transferido para um tubo de ensaio contendo 7 mL de caldo nutriente esterilizado. O tubo de ensaio foi agitado em um agitador do tipo Vortex a fim de homogeneizar a suspensão de bactéria.

Em seguida, 1 mL desta suspensão bacteriana foi adicionado em uma cubeta acrílica (1mL) e foi efetuada a leitura da absorbância, no espectrofotômetro UV-vis, no comprimento de onda de 610 nm. A concentração da suspensão bacteriana foi sendo ajustada (ora adicionando caldo nutriente, ora o inóculo) até obter uma densidade ótica de $0,200 \pm 0,015$. Em seguida, 3 mL desta suspensão bacteriana foram transferidos para um frasco erlenmeyer contendo 150 mL de caldo nutriente esterilizado. Posteriormente, o frasco erlenmeyer foi colocado em uma incubadora Shaker para promover o crescimento bacteriano por $24 \pm 1\text{h}$ a $32 \pm 3^{\circ}\text{C}$ em agitação a 150 rpm.

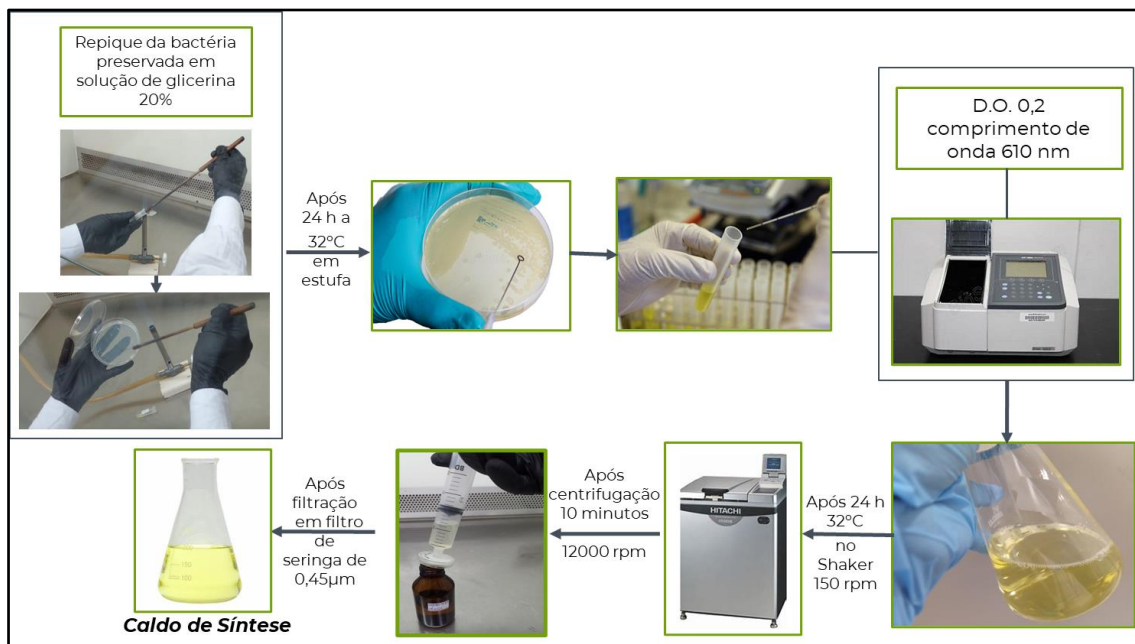
Após 24 h o caldo bacteriano obtido foi vertido em tubos de centrífuga de 250 mL e centrifugados a 12000 rpm a 20°C por 10 minutos. A massa bacteriana (*pellets*) foi descartada e o sobrenadante foi filtrado em filtro de seringa de $0,45\ \mu\text{m}$ para posteriormente ser utilizado nas sínteses das nanopartículas de ZnO. O sobrenadante, livre de células, foi nomeado de *caldo de síntese* nas sínteses da Seção 5.

Para conferir se o sobrenadante centrifugado e filtrado, nomeado de *caldo de síntese*, estava realmente livre de células, foi inoculado 1 mL do mesmo em placa de Petri contendo o meio de cultura sólido Agar Nutriente.

O cultivo das bactérias *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycooides* 2RF2C em meio de cultura líquido seguiu o mesmo procedimento da bactéria *B. megaterium* RF1C.

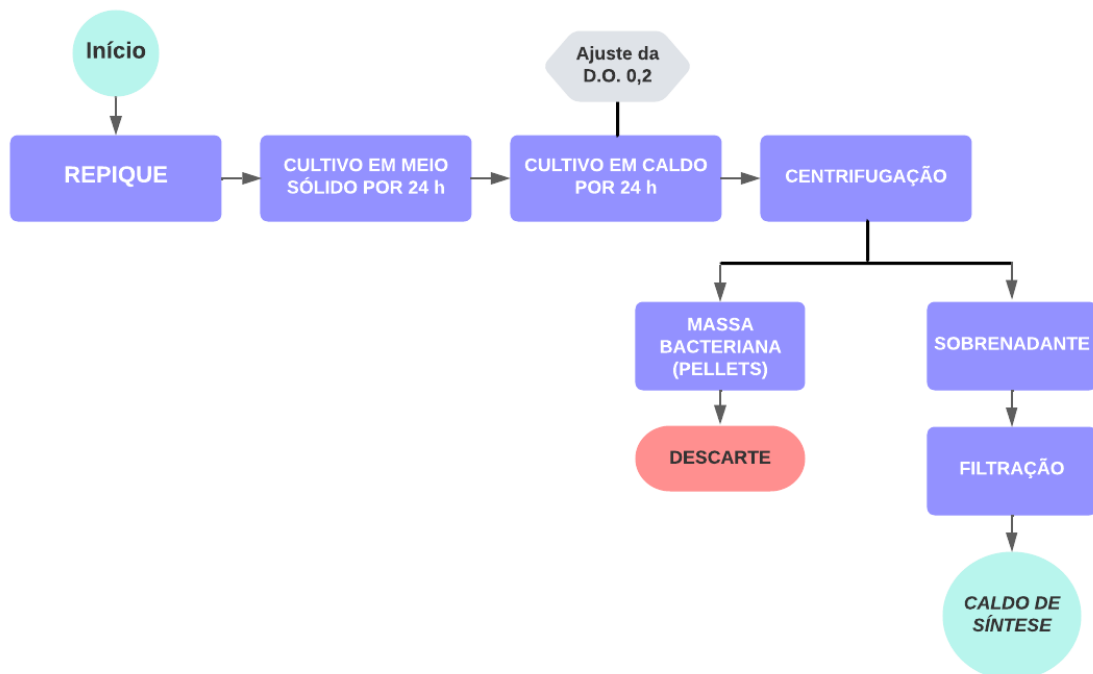
A Figura 18 ilustra os procedimentos descritos nesta Seção 4.2.5 e a Figura 19 contém o fluxograma do processo.

Figura 18- Ilustração do procedimento descrito na Seção 4.2.5 para a obtenção do *caldo de síntese*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 19- Fluxograma do cultivo de bactérias para a obtenção do *caldo de síntese* (livre de células).



Fonte: Autoria própria.

4.2.6 Teste antimicrobiano

O teste antimicrobiano realizado neste estudo teve como referência as literaturas Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), VEIGA (2016) e OSTROSKY et al. (2008).

A fim de verificar a atividade antimicrobiana das NPs-ZnO e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das NPs-ZnO capaz de inibir o crescimento microbiano, foi utilizado o método de microdiluição em caldo nutriente.

Para o teste foram usadas cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923. As cepas bacterianas foram fornecidas pelo Laboratório do Grupo de Biotecnologia Microbiana coordenado pela Profa. Dra. Márcia Nitschke (IQSC-USP).

Os testes foram realizados em placas de plástico estéreis contendo 96 poços com fundo redondo (em “U”) conforme ilustrado na Figura 20.

Figura 20- Placa de plástico usada no teste antimicrobiano.



Fonte: Disponível em placa poço 96 - Bing images/Acesso em: 26 de abr. 2023.

Nas colunas 1-11, em cada poço, foram adicionados 100 μL de caldo nutriente. Nos poços da primeira coluna da placa foram adicionados 100 μL da suspensão de NPs-ZnO na concentração de 4800 $\mu\text{g/mL}$, logo, a concentração final das NPs-ZnO na primeira fileira foi de 2400 $\mu\text{g/mL}$. Após homogeneização com a micropipeta automática de 8 canais, 100 μL do conteúdo da coluna 1 foram transferidos para a coluna 2, assim sucessivamente até a coluna 10. Em seguida, nas colunas 1-11 foram adicionados, em cada poço, 20 μL de inóculo da suspensão bacteriana na concentração de 10^7 UFC/mL.

A coluna 11 da placa foi utilizada como controle positivo de crescimento contendo apenas o meio de cultura e o inóculo bacteriano. A coluna 12 foi utilizada como controle negativo contendo nos 4 primeiros poços (A-D) apenas o caldo nutriente e nos outros 4 poços restantes (E-H) a suspensão de NPs-ZnO.

Após o preenchimento dos poços, a placa foi fechada e incubada em estufa a 37°C por 24 h.

Passadas as 24 h de incubação, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo esterilizada, foram inoculados em placas contendo o meio de cultura sólido, Agar Nutriente, o conteúdo dos poços das fileiras onde, visualmente, não houve crescimento microbiano. Em seguida, para uma melhor visualização do resultado do teste antimicrobiano, foram adicionados, em cada poço, 20 µL do corante MTT na concentração de 1 mg/mL. Após a adição do MTT a placa foi incubada por mais 30 minutos em estufa a 37°C. Em seguida foi feita a leitura visual da placa.

4.2.7 Rendimento

A fim de verificar o rendimento das NPs-ZnO foi feita a liofilização da *Síntese 5.2* (Seção 5.2.2, p. 86). Esta síntese foi escolhida por fornecer NPs-ZnO com melhor aspecto na micrografia de MEV, apresentando morfologia mais bem definida e com tamanho de grãos abaixo de 100 nm (68,0 nm ± 13,6 nm).

Para determinar o rendimento a *Síntese 5.2* foi feita em triplicata de acordo com o seguinte procedimento. Os frascos Falcon vazios tiveram suas massas determinadas. No final da síntese, após a lavagem final, os frascos Falcon foram centrifugados a 15000 rpm por 10 min., os sobrenadantes foram descartados. Os tubos Falcon foram congelados em nitrogênio líquido e colocados em frascos de liofilização. Após 6 h de liofilização, os frascos Falcon foram pesados novamente. A massa de NPs-ZnO pôde ser calculada pela diferença de massa entre o frasco Falcon vazio e o frasco Falcon contendo as NPs-ZnO liofilizadas. Considerando a obtenção apenas de ZnO, sem considerar a possível presença de Zn(OH)₂, o rendimento foi calculado segundo a Equação 7.

$$R\% = [(100 * m) / (m_0)] - MO \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

R% é a porcentagem do rendimento obtido;

m₀ é a massa de Zn²⁺ presente no sal do precursor Zn(NO₃)₂·6H₂O;

m é a massa de Zn²⁺ presente no ZnO;

MO é a porcentagem da matéria orgânica determinada na análise termogravimétrica.

4.3 Caracterização do caldo de síntese e das NPs-ZnO

Nesta Seção 4.3 foram relacionadas as análises realizadas na caracterização do *caldo de síntese* e das NPs-ZnO. Na Tabela 5 foram relacionados os locais onde cada análise foi feita.

Para a realização das análises de Termogravimetria (TG), de Ressonância Magnética Nuclear de líquido (RMN) e de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) do *caldo de síntese*, o caldo foi liofilizado conforme descrito na Seção 4.3.17 (p. 79).

Para a realização das análises de Termogravimetria (TG), Espectroscopia Raman e para efetuar os cálculos do rendimento as amostras das NPs-ZnO foram liofilizadas conforme descrito na Seção 4.3.18 (p. 79).

Tabela 5- Relação das análises realizadas na caracterização das NPs-ZnO e do *caldo de síntese* e as suas respectivas localizações e colaborações.

Análise	Material analisado	Local
Análise Termogravimétrica (TG)	NPs-ZnO liofilizada e <i>Caldo de síntese</i> liofilizado	Laboratório do Grupo de Materiais Macromoleculares e Fibras Lignocelulósicas. Responsável Profa. Dra. Elisabete Frollini (IQSC-USP)
Analizador Elementar (CHNS)	NPs-ZnO	Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos – IQSC
Cromatografia a Gás (CG-EM)	<i>Caldo de síntese</i>	Laboratório do Grupo de Química Orgânica e Biocatálise. Responsável Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto (IQSC-USP)
Difração de Raios-X (XRD)	NPs-ZnO	Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos – IQSC
Espalhamento Dinâmico de Luz - <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	NPs-ZnO	Laboratório do Grupo de Materiais Coloidais. Responsável Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda (IQSC-USP)
Eletroforese	<i>Caldo de síntese</i> dialisado	Laboratório do Grupo de Bioquímica Molecular e Estrutural e Grupo de Química Medicinal e Biológica. Responsável Profa. Dra. Fernanda Canduri (IQSC/USP)
Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	NPs-ZnO e <i>Caldo de síntese</i> liofilizado	Laboratório de Síntese Orgânica “Prof. Warner Bruce Kover”. Responsável Prof. Dr. Antônio Carlos B. Burtoloso (IQSC-USP)
Espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-vis)	NPs-ZnO	Laboratório do Grupo de Química Orgânica e Biocatálise. Responsável Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto (IQSC-USP)
Espectroscopia Raman	NPs-ZnO	Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos – IQSC
Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	NPs-ZnO	Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos – IQSC
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	NPs-ZnO	Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos – IQSC
Potencial Zeta	NPs-ZnO	Laboratório do Grupo de Materiais Coloidais. Responsável Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda (IQSC-USP)
Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de líquido	<i>Caldo de síntese</i> liofilizado	Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos – IQSC
Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de sólido	NPs-ZnO	Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) sob colaboração. Responsável Prof. Dr. Thiago Venâncio (UFSCar)
Tensão Superficial	<i>Caldo de síntese</i>	Laboratório do Grupo de Biotecnologia Microbiana. Responsável Prof. Dra. Márcia Nischke (IQSC-USP)
Teor de açúcares totais, lipídeos totais e proteínas totais	<i>Caldo de síntese</i>	Empresa CBO Análises Laboratoriais (Valinhos-SP)

Fonte: Autoria própria.

4.3.1 Análise por Termogravimetria (TG)

Para verificar a porcentagem da matéria orgânica presente nas nanopartículas de óxido de zinco esta análise foi realizada no equipamento Termobalança da marca Shimadzu, modelo TGA-50 em atmosfera de ar sintético, no intervalo de temperatura de 25°C a 900°C. A vazão usada foi de 50 mL min.⁻¹ e a taxa de aquecimento foi de 10°C min.⁻¹. O equipamento possui suporte de amostra de platina e a massa amostral analisada foi de 8 mg tanto para as análises realizadas com as NPs-ZnO quanto para a análise realizada com o *caldo de síntese*. Ambos foram liofilizados previamente.

4.3.2 Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A análise por CG-EM do *caldo de síntese* foram realizadas no aparelho Shimadzu/CG-2010plus equipado com um injetor Shimadzu/ AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com injeção eletrônico (IE, 70 eV). As separações foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida (SLB-5MS 5% difenil/95% dimetil siloxano) da Agilent J&W Advanced 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 mm de espessura de filme.

A amostra foi analisada com fluxo constante de gás hélio utilizando-se uma vazão de 0,75 mL min.⁻¹ e pressão de 46,5 kPa. A temperatura do injetor foi de 250 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 90 °C mantida durante 2 min., em seguida foi elevada a 280 °C na taxa de 6 °C min.⁻¹ e mantida nessa temperatura por 6,5 min. O tempo total de análise foi de 40,17 min., injetando-se 1 µL com razão de divisão de fluxo 5,0. A temperatura da fonte de íons foi de 200 °C e da interface foi de 270 °C. Os íons foram monitorados de 4 a 40 min. na faixa de m/z 40 a 500.

Para efetuar a análise por CG-EM foi feita a extração dos compostos orgânicos presentes no *caldo de síntese*, conforme descrito na seção a seguir (Seção 4.3.2.1).

4.3.2.1 Extração dos compostos orgânicos presentes no caldo de síntese da *B. megaterium* RF1C

Após o cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C, conforme descrito na Seção 4.2.5.2 (p. 64), em um frasco erlenmeyer de 125 mL, contendo uma barra magnética, foram adicionados 40 mL de acetato de etila e 50 mL do *caldo de síntese*. O sistema foi colocado em agitação magnética a aproximadamente 250 rpm por 30 minutos. Após, o conteúdo foi transferido para um funil de separação de 250 mL e a fase aquosa foi descartada. Em seguida, foram realizadas 3 extrações com 50 mL de acetato de etila para

cada uma das extrações. A fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado uma porção de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) a fim de remover toda a água da fase orgânica, que em seguida foi filtrada. O conteúdo filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo de 250 mL e o solvente foi removido sob pressão reduzida em rota evaporador (Fisaton). A fração obtida da fase orgânica, que ficou no balão de fundo redondo, após a remoção total do solvente, foi ressuspensa em 5 mL de acetato de etila grau HPLC e um volume de 1 mL foi transferido para um frasco *vial* de 2 mL e analisado por CG-EM.

4.3.3 Difração de raios-X (DRX)

Para confirmar se houve a formação da estrutura cristalina das NPs-ZnO, para identificar sua fase e obter o tamanho médio dos cristalitos obtidos nas sínteses através da equação de Debye-Scherrer, foi usado o Difratorômetro de Raios X D8 marca Bruker e modelo D8 Advance. As análises foram realizadas no intervalo de varredura de 5 a 100 graus, com passo de 0,02 grau, tempo de irradiação de 0,5 s por passo e potência de 1600 W (40 mA e 40 kV).

A equação de Debye-Scherrer relaciona a largura a meia altura dos picos de difração com o tamanho médio dos cristalitos através da Equação 8.

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

- T é o tamanho médio dos cristalitos;
- K é a constante de Scherrer (fator de forma adimensional, varia com a forma do cristal);
- λ é o comprimento de onda dos raios-X;
- β é a largura integral do pico, sendo $\beta(2\theta)$ a largura na metade da altura do pico de difração;
- θ é o ângulo de Bragg.

Os cálculos de tamanho do cristalito estão no **Apêndice A**.

4.3.3.1 Preparo da amostra para análise de DRX

As NPs-ZnO, obtidas em suspensão nas sínteses (Seção 5), foram secas à temperatura ambiente. Para a secagem, uma alíquota de 3 mL de suspensão de NPs-ZnO foi colocada em uma placa de Petri, limpa, seca e exposta à temperatura ambiente dentro de um armário fechado ao abrigo de poeira e demais contaminantes particulados. A

amostra seca foi macerada em um cadinho de porcelana e em seguida foi depositada em uma placa de vidro e colocada no equipamento para análise.

4.3.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para medir a distribuição do tamanho das nanopartículas de ZnO, foi usado o equipamento Zetasizer da marca Malvern – modelo Zetasizer Nano ZS. Os parâmetros das NPs-ZnO usados nas análises foram o índice de refração (IR) de 2,00, a absorção de 0,1 e a viscosidade de 1,003 cP.

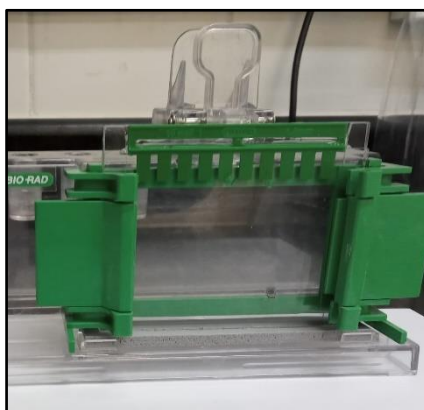
4.3.4.1 Preparo da amostra para análise de DLS

As NPs-ZnO foram suspensas, na concentração de 20 µg/mL, em uma solução de cloreto de sódio (NaCl) 10^{-3} M. Em seguida, foram colocadas no ultrassom por 30 minutos. Após, permanecerem em repouso por 24 h à temperatura ambiente e em seguida foram analisadas por DLS.

4.3.5 Análise por eletroforese

Para a realização da análise de eletroforese, primeiro foram feitos os géis onde a amostra do *caldo de síntese* dialisado e concentrado, bem como o marcador padrão, foram aplicados. Foi montado o suporte de preparo do gel (Figura 21) e em seguida o gel de resolução (Seção 4.2.2.10, p. 60) foi preparado e adicionado entre as placas de vidro. Após 20 minutos, tempo de solidificação do gel de resolução, o gel de empilhamento (Seção 4.2.2.11, p. 60) foi preparado e adicionado, logo em seguida, entre as placas de vidro. Esperou-se 20 minutos para a solidificação do gel.

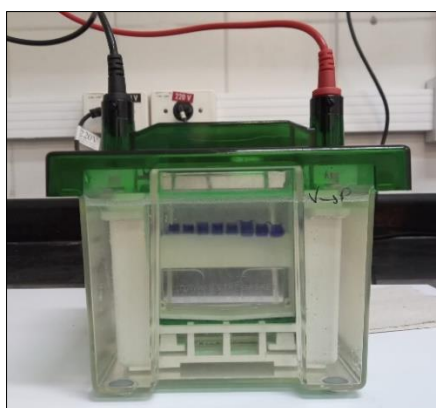
Figura 21- Montagem das placas de vidro para o preparo dos géis de resolução e de empilhamento para a análise de eletroforese.



Fonte: Autoria própria.

A montagem das placas de vidro, contendo os géis preparados, foi colocada dentro da cuba de eletroforese (Figura 22). Um volume de 5 μL do tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2 (Seção 4.2.2.4 p. 59) e um volume de 10 μL do tampão corante para amostra (Seção 4.2.2.5, p. 59) foram adicionados a 5 μL da amostra do *caldo de síntese* dialisado e concentrado (Seção 4.3.5.1, p. 74). Então, 10 μL desta mistura foram aplicados no gel. Para comparação da análise, também foi aplicado no gel o marcador padrão Protein Molecular Weights – Low Range. Após aplicação das amostras, a cuba foi fechada e foi aplicada uma tensão elétrica de 120 V.

Figura 22 - Montagem da análise de eletroforese, cuba contendo o gel onde foram aplicadas a amostra do *caldo de síntese* dialisado, e concentrado, e o marcador.



Fonte: Autoria própria.

O marcador *Protein Molecular Weights – Low Range* é uma mistura de seis proteínas nativas de 14,400kDa a 97,400kDa e foi usado como padrão de tamanho das proteínas (Figura 23).

Figura 23- Proteínas que contêm o marcador padrão *Protein Molecular Weights – Low Range* e seus respectivos tamanhos e fontes de obtenção.

KDa	Proteína	Fonte
97.2	Fosforilase B	Músculo de coelho
66.4	Albumina sérica	Bovina
44.3	Ovalbumina	Clara de ovo de galinha
29.0	Anidrase carbônica	Bovina
20.1	Inibidor da tripsina	Soja
14.3	Lisozima	Clara de ovo de galinha

Fonte: Modificado de Disponível em Protein Molecular Weight Marker (Low) (takara-bio.co.jp)/Acesso: 16 de mai. 2023.

4.3.5.1 Preparo da amostra do caldo de síntese para análise de eletroforese

Para a análise de eletroforese, a fim de remover os sais presentes no meio, assim como as moléculas abaixo de 30 kDa, o *caldo de síntese* foi dialisado. Para isso, 30 mL do *caldo de síntese* foi vertido em uma membrana de 30 kDa que foi lacrada dos dois lados. Em seguida, a membrana foi colocada em um frasco béquer contendo 2 L de solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,2. O sistema foi mantido em agitação magnética branda e acondicionado em uma caixa de isopor com gelo para manter o ambiente resfriado por 4 h. Passada as 4 h, a solução de Tris-HCl pH 7,2 foi trocada por uma nova solução, na qual a membrana permaneceu por 15 h. Em seguida foi feita uma outra troca da solução tampão Tris-HCl pH 7,2 na qual a membrana permaneceu por mais 8 h. Por fim, houve uma última troca da solução tampão onde a membrana permaneceu por mais 15 h aproximadamente.

Após a diálise o *caldo de síntese* foi concentrado via centrifugação. Para isso, o *caldo de síntese* dialisado foi retirado da membrana, com o auxílio de uma micropipeta automática, e transferido para um tubo de centrifugação contendo uma membrana de 10 kDa. Através da centrifugação o volume do caldo foi reduzido para 0,5 mL.

4.3.6 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A identificação dos grupos funcionais presentes nas nanopartículas de ZnO e no *caldo de síntese*, livre de células, usado na síntese foi feita pela técnica de infravermelho no equipamento Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) da marca Bruker e modelo Alpha (ATR) equipado com cristal de ZnSe.

4.3.6.1 Preparo das amostras para análise de FT-IR

Para a realização desta análise, as amostras do *caldo de síntese* e das NPs-ZnO foram liofilizadas. Após, foram maceradas em cadinho de porcelana e submetidas a análises.

4.3.7 Espectroscopia no Ultravioleta-visível (UV-vis)

Para a verificação preliminar da formação de nanopartículas de ZnO foram feitas as análises de UV-vis para verificar se houve a absorção de energia no comprimento de onda característico das NPs-ZnO. Os valores de comprimentos de ondas absorvidos pelas

NPs-ZnO na região do ultravioleta-visível tiveram como parâmetro os valores descritos na literatura (Tabela 6).

Para a realização das análises de UV-vis foi utilizado o espectrofotômetro da marca Shimadzu - modelo UV-1800 com lâmpada de Deutério (D2) 062-65055-05 para a região UV e lâmpada de Tungstênio-halogênio (WI) 062-65005-00 para a região do visível. A cubeta utilizada nas análises foi de Quartzo ES de 1 mL.

Tabela 6- Valores de comprimentos de onda absorvidos pelas NPs-ZnO na região do UV-vis descritos em trabalhos da literatura.

Referência	Valores de Comprimentos de onda (nm)
SELVARAJAN et al., 2013	385
SELVARAJAN et al., 2013	374
KUNDU et al., 2014	340
SARAVANAN et al., 2018	346
AL-ZAHRANI et al., 2018	392
KRÓ et al., 2018	390
SINGH et al., 2014	360
RAUF et al., 2017	373
RAJABAIRAVI et al., 2017	379
BALRAJ et al., 2017	364

Fonte: Autoria própria.

4.3.7.1. Preparo das amostras para as análises por UV-vis

Para a realização das análises por UV-vis as NPs-ZnO obtidas nas sínteses da Seção 5 foram diluídas em água deionizada, de 20 a 100 vezes, até que o valor de absorbância obtido na leitura fosse inferior a 1-2 u.a. As leituras tiveram a água deionizada como controle (branco).

4.3.8 Espectroscopia Raman

A análise de Espectroscopia Raman foi realizada a fim de detectar as vibrações que constituem a amostra de NPs-ZnO. Para esta análise foi usado o equipamento Espectrômetro de Raman da marca Horiba - modelo LabRam HR Evolution.

O equipamento foi configurado com quatro objetivas, de 5x, 10x, 15x e 100x de aumento e quatro conjuntos de lasers de 325, 473, 633 e 785 nm com filtros do tipo Edge, que permite análise a partir de 50 cm^{-1} para os lasers de 473, 633 e 785 nm e a partir de 150 cm^{-1} para o laser 325 nm.

4.3.8.1 Preparo da amostra para análise de Raman

A amostra foi preparada conforme descrito na Seção 4.3.3.1 (p. 71)

4.3.9 Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A espectroscopia de energia dispersiva de raios X é uma técnica analítica que permite a caracterização química, ou análise elementar, dos materiais. As posições dos picos no espectro identificam os elementos.

As análises de EDS foram realizadas em um equipamento da BRUKER, modelo XFlash 6/60 equipado com software Esprit 2.3. Utilizou-se padrão de Cu para calibração, feixe de elétrons de 15kV e distância focal de 10 mm, A área da amostra analisada foi de 320x320 μ m.

4.3.9.1 Preparo da amostra para análise de EDS

A secagem da amostra foi realizada conforme descrito na Seção 4.3.3.1 (p. 71). Posteriormente, foi macerada e o pó obtido foi colocado sobre uma fita de alumínio que em seguida foi fixada no suporte de análise.

4.3.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para determinar a morfologia e o tamanho das nanopartículas, por meio da observação mais profunda da superfície do material, foi usado o Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Japan Electron Optics Ltd. (JEOL), modelo JSM 7200F.

Para determinar o tamanho médio das NPs-ZnO foi feita a contagem de aproximadamente 200 nanopartículas, para a maioria das medidas, por meio da utilização do *Software ImageJ*. O tamanho de partícula foi medido pelo Diâmetro máximo de Feret (PAPINI, 2003; MERKUS, 2009). Para a contagem foi levada em consideração todas as partículas, considerando todas as morfologias.

4.3.10.1 Preparo das amostras para análises de MEV

As amostras de NPs-ZnO obtidas nas sínteses (Seção 5), suspensas em água, foram mantidas em ultrassom por 15 minutos e em seguida foram diluídas 200 vezes em água deionizada. Uma gota da suspensão foi colocada sobre uma pequena lâmina de silício. A gota foi seca à temperatura ambiente para posterior análise. Não foi necessário

fazer a metalização da amostra, pois as micrografias apresentaram um bom contraste fornecendo imagens nítidas.

4.3.11 Potencial Zeta

Para verificar a estabilidade coloidal das NPs-ZnO em meio aquoso foi usado o equipamento Zetasizer da marca Malvern – modelo Zetasizer Nano ZS. Os parâmetros das NPs-ZnO usados nas análises foram o índice de refração do ZnO (IR) de 2,00, a absorção de 0,1 e a viscosidade de 1,003 cP. As medidas foram feitas em função dos valores de pH 2, 4, 6, 8 e 12. A titulação foi feita pelo próprio equipamento com a adição de HCl 0,1 M e 0,01 M e NaOH 0,1 M.

4.3.11.1 Preparo das amostras para as análises de Potencial Zeta

As NPs-ZnO secas, conforme Seção 4.3.3.1 (p. 71), foram suspensas na concentração de 50 µg/mL em uma solução de cloreto de sódio 10^{-3} M. Em seguida, foram colocadas no ultrassom por 30 minutos. Após, as amostras foram colocadas em cubeta de poliestireno a 25 °C para a realização das análises.

4.3.12 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para amostra líquida

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica utilizada na caracterização de substâncias orgânicas, na determinação de estrutura tridimensional, entre outras. Logo, para a elucidação da composição da matéria orgânica presente no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C que foi utilizado na síntese das NPs-ZnO, foram realizadas as análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

O equipamento utilizado foi um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – 500 MHz da marca Agilent Technologies e modelo 400/54 Premium Shield. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do solvente deuterado.

4.3.12.1 Preparo da amostra para análise de RMN de líquido

Para a realização das análises por RMN ^1H e ^{13}C , um volume de 50 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C foi liofilizado por 24 h. Após liofilização, 60 mg do *caldo de síntese* foi solubilizado em 600 µL de água deuterada (D_2O) e vertido em um tubo de RMN (178 mm de comprimento e 5 mm de diâmetro) para posterior análise.

4.3.13 Ressonância Magnética Nuclear de sólido (RMN)

O equipamento utilizado foi um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear – 400 MHz da marca Bruker. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do solvente DMSO. Foram realizadas as análises de RMN de ^{13}C com rotação de 5kHz.

4.3.13.1 Preparo da amostra para análise de RMN de sólido

As NPs-ZnO obtidas em suspensão nas sínteses (Seção 5) foram secas à temperatura ambiente. Para a secagem uma alíquota de aproximadamente 10 mL de suspensão de NPs-ZnO foi colocada em placa de Petri, limpa, seca e exposta à temperatura ambiente dentro de um armário fechado ao abrigo de poeira e demais contaminantes particulados. A amostra seca foi macerada, em um cadinho de porcelana, e em seguida foi depositada em um suporte para análise e colocada no equipamento.

4.3.14 Tensão superficial do caldo de síntese

Foi medida a tensão superficial, pelo método do anel de Du Noüy, do *caldo de síntese* previamente centrifugado e filtrado, livre de células (Seção 4.2.5.2, p. 64), das bactérias *B. megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycooides* 2RF2C. O equipamento utilizado foi da marca Attension - modelo Attension Sigma.

Para a análise foram usados 20 mL dos *caldos de síntese* que previamente tiveram suas temperaturas ajustadas para 25°C.

4.3.15 Análise do teor de açúcares totais, lipídeos totais e proteínas totais

As análises de teor de açúcares totais, lipídeos totais e proteínas totais, do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C foram realizadas pela empresa CBO Análises Laboratoriais localizada em Valinhos/SP.

A análise de açúcares totais teve como referência a literatura Thompson, J.C. Methods for the Determination of Carbohydrates by Ion Chromatography, Proceedings of the 1990 Sugar Processing Research Conference, Sugar Processing Research Inc., San Francisco, California, USA, May 29-June 1, 1990, 381-396.

A análise de lipídeos totais teve como referência a literatura American Oil Chemists' Society. 2017. AOCS. Oficial Procedure. Rapid Determination of Oil/ Fat Utilizing High Temperature Solvent Extraction. Am 5-04. p. 1-4.; ANKOM Technology

Method 12-12-05.; Compêndio Brasileiro de Nutrição Animal. 2017. Guia de Métodos Analíticos. Método n. 12 p.75-77.

A análise de proteínas totais teve como referência o Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2017, método 45.

4.3.16 Analisador Elementar

A Análise Elementar de CHNS, também conhecida como Análise Orgânica Elementar, determina as quantidades de carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N) e enxofre (S) presentes em uma amostra.

Para a realização da análise elementar foi usado o equipamento da marca ThermoScientific - modelo FlashSmart.

4.3.16.1 Preparo da amostra para Análise Elementar

A secagem da amostra foi realizada conforme descrito na Seção 4.3.3.1 (p.71).

4.3.17 Liofilização do caldo de síntese

Para a liofilização do *caldo de síntese*, 50 mL da amostra foram vertidas em frasco de liofilização de 350 mL e congelado em nitrogênio líquido. O frasco permaneceu vedado com papel filme em um freezer até o dia seguinte e então foi acoplado ao liofilizador onde permaneceu por 24 h.

O equipamento utilizado foi da marca Edwards – modelo Freeze Dryer Modulyo. As amostras do *caldo de síntese* foram liofilizadas no Laboratório do Grupo de Bioquímica e Biomateriais, coordenado pela Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis e pelo Prof. Dr. Sérgio A. Yoshioka (IQSC-USP).

4.3.18 Liofilização das NPs-ZnO

A fim de liofilizar as NPs-ZnO, 20 mL da suspensão em água das NPs-ZnO foram vertidas em frasco Tubo Falcon de 50 mL e centrifugadas a 15000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o frasco tipo Tubo Falcon contendo as NPs-ZnO foi congelado em nitrogênio líquido. O frasco tipo Tubo Falcon foi tampado e colocado dentro de um recipiente de liofilização (frasco de vidro de 350 mL) que foi acoplado ao liofilizador onde permaneceu por 6 h. Após a retirada do frasco do liofilizador as NPs-ZnO liofilizadas foram armazenadas em um dessecador.

O equipamento utilizado foi um liofilizador da marca Thermo Electron Corporation – modelo MODULYOD-115 acoplado a bomba Thermo Electron Corporation – modelo RV8A65413906. As amostras de NPs-ZnO foram liofilizadas no Laboratório do Grupo de Fotoquímica coordenado pela Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro (IQSC-USP).

5. PARTE EXPERIMENTAL II

A solução do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi esterilizada através de filtração em filtro de seringa de 0,2 μm após o seu preparo, conforme descrito na Seção 4.2.1.1 (p. 57).

5.1 Síntese das NPs-ZnO sem o ajuste de pH

5.1.1 Síntese 1 – variação da concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Esta síntese foi baseada no trabalho de SARAVANAN et al. (2018) com as devidas modificações.

Em três frascos erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 100 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. Em seguida foram realizados os procedimentos a seguir:

Síntese 1.1: No primeiro frasco erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 0,034 g do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, previamente dissolvido em 15 mL de água deionizada, de forma que a concentração final do sal no meio (*caldo de síntese* acrescido do volume de água) fosse de 1 mM.

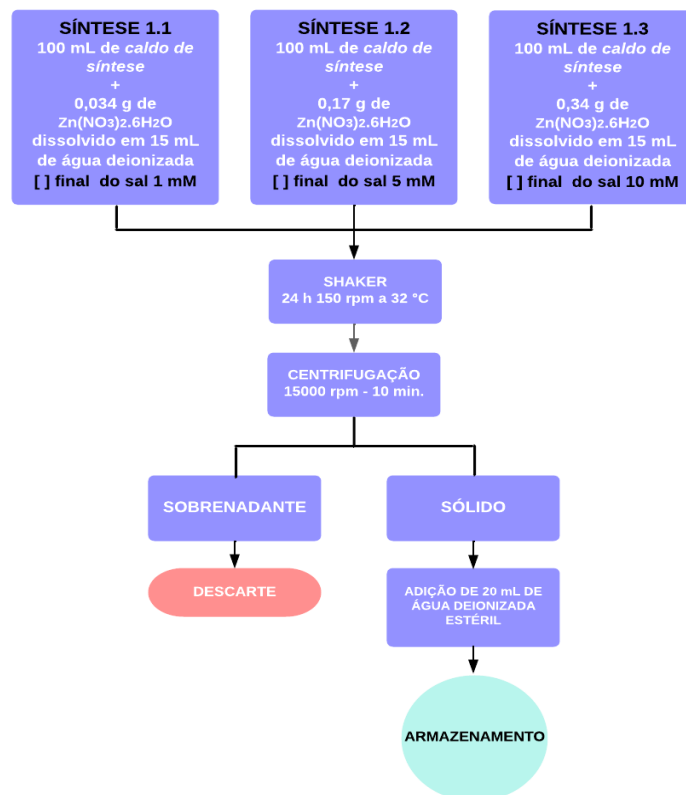
Síntese 1.2: No segundo frasco erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 0,17 g do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, previamente dissolvido em 15 mL de água deionizada, de forma que a concentração final do sal no meio (*caldo de síntese* acrescido do volume de água) fosse de 5 mM.

Síntese 1.3: No terceiro frasco erlenmeyer de 250 mL foi adicionado 0,34 g do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, previamente dissolvido em 15 mL de água deionizada, de forma que a concentração final do sal no meio (*caldo de síntese* acrescido do volume de água) fosse de 10 mM.

Os frascos erlenmeyer foram colocados no Shaker a 32°C, em agitação de 150 rpm por 24 h. Após as 24 h o conteúdo dos frascos erlenmeyer foi centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos em tubos Falcon de 50 mL. O sobrenadante foi descartado. Ao material sólido foram adicionados 20 mL de água deionizada esterilizada. Os tubos Falcon foram armazenados em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização.

Estas sínteses também foram realizadas com as bactérias *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycooides* 2RF2C e seguiram os mesmos procedimentos utilizados com a *B. megaterium* RF1C.

Figura 24- Esquema da *Síntese 1*.



Fonte: Autoria própria.

5.1.2 *Síntese 2* - variação da quantidade do caldo de síntese e aumento da concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

A proporção entre o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e a solução precursora do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ teve como base os trabalhos de JAYASEELAN et al. (2012), SELVARAJAN et al. (2013), ZAHRANI et al. (2018), SINGH et al. (2014) e RAJABAIRAVI et al. (2017). A concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ teve como referência o trabalho de PRASAD; JHA (2009).

O *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C foi adicionado em três frascos erlenmeyer de 250 mL. Em cada frasco erlenmeyer foi adicionada a solução esterilizada do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, em agitação magnética a 350 rpm por 10 minutos, conforme as quantidades e as concentrações descritas nas reações a seguir:

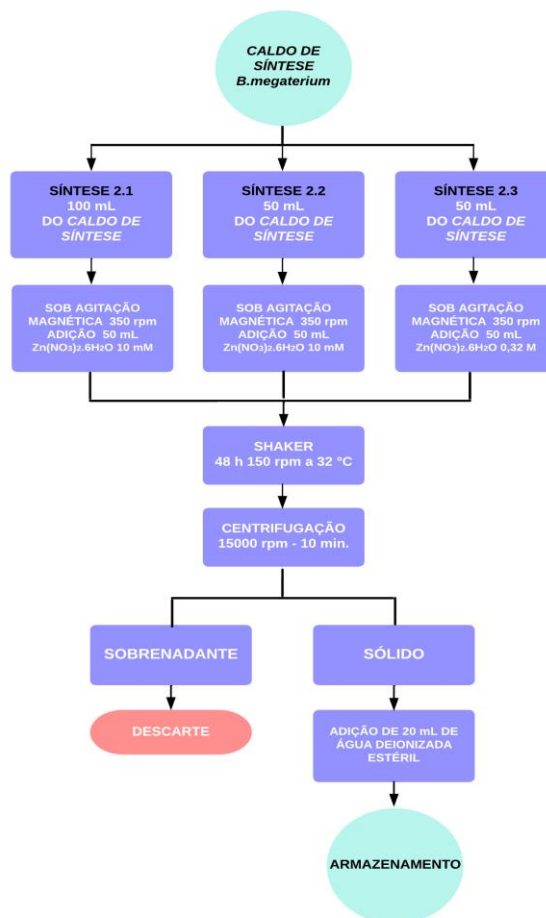
Síntese 2.1: Em um frasco erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 100 mL do *caldo de síntese* + 50 mL de solução do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 10 mM.

Síntese 2.2: Em um frasco erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 50 mL do *caldo de síntese* + 50 mL de solução do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 10 mM.

Síntese 2.3: Em um frasco erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 50 mL do *caldo de síntese* + 50 mL de solução do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,32 M.

Após a agitação magnética os frascos erlenmeyer foram colocados no shaker a 32°C, em agitação de 150 rpm por 48h. Em seguida, o conteúdo dos frascos erlenmeyer foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao material sólido foram adicionados 20 mL de água deionizada esterilizada. Os tubos Falcon foram armazenados em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

Figura 25- Esquema da *Síntese 2*.



Fonte: Autoria própria.

5.1.3 Síntese 3 – variação da temperatura

O estudo sobre a variação da temperatura de síntese das NPs-ZnO teve como base os trabalhos de SINGH et al. (2014), TRIPATHI et al. (2014), SELVARAJAN et al. (2013) e PRASAD; JHA (2009).

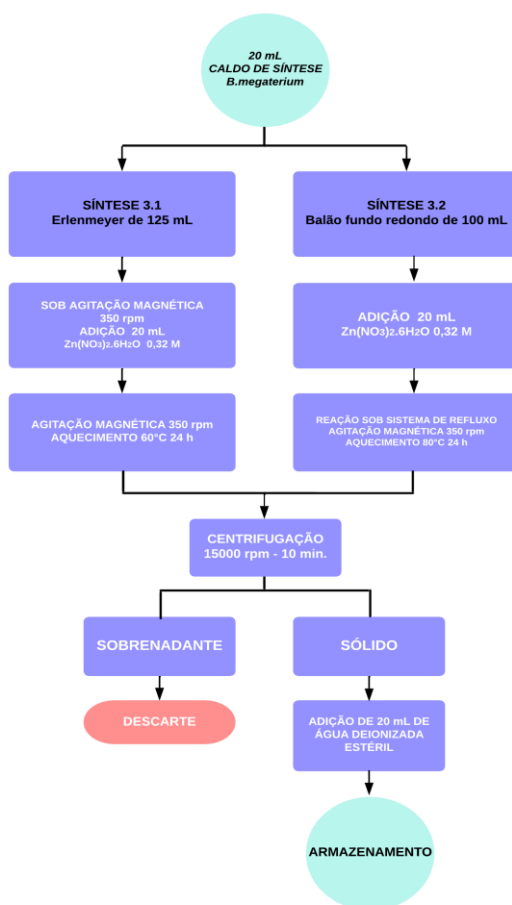
O caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C foi adicionado em um frasco erlenmeyer de 125 mL e em um balão de fundo redondo de 100 mL, aos quais foi adicionada a solução esterilizada do sal de Zn(NO₃)₂·6H₂O, conforme a seguir:

Síntese 3.1: Em um frasco erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 20 mL do *caldo de síntese* + 20 mL de solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M. O sal foi adicionado em agitação magnética (350 rpm) e aquecimento a 60°C no qual foram mantidos por 24 h em sistema fechado.

Síntese 3.2: Em um balão de fundo redondo de 100 mL foram adicionados 20 mL do *caldo de síntese* + 20 mL de solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M. O sal foi adicionado em agitação magnética (350 rpm) e aquecimento a 80°C no qual foram mantidos por 24 h. A *Síntese 3.2* foi realizada em sistema de refluxo.

Após a adição do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ o pH foi medido, através do pHmetro de bancada, e o valor encontrado foi de 6,5. Após as 24 h, o pH foi novamente medido, também pelo pHmetro de bancada e o valor encontrado nas *Sínteses 3.1* e *3.2* foi de 6,5. Todo o conteúdo das *Sínteses 3.1* e *3.2* foi transferido para tubos Falcon de 50 mL e centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao material sólido foram adicionados 20 mL de água deionizada esterilizada. Os tubos Falcon foram armazenados em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

Figura 26- Esquema da *Síntese 3*.



Fonte: Autoria própria.

5.2 Síntese das NPs-ZnO com o ajuste de pH

Nas sínteses das Seções 5.2.1 (p. 85) a 5.2.4 (p. 89) foi utilizado o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

O esquema de montagem ilustrado na Figura 27 foi usado nas *Sínteses 4-8*.

Figura 27- O esquema de montagem usado nas *Sínteses 4-8*.



Fonte: Autoria própria.

5.2.1 Síntese 4 – variação do pH

O *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C foi adicionado em cinco frascos béquer de 100 mL. A solução esterilizada do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M foi adicionada nos frascos béquer conforme descrito a seguir:

Síntese 4.1: Em um frasco béquer de 100 mL foram adicionados 20 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. Em seguida foi adicionado, em agitação magnética a 350 rpm, um volume de 20 mL de solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. O pH foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1M. Após a estabilização do pH o conteúdo foi vertido em um frasco erlenmeyer de 125 mL esterilizado e fechado com tampão de algodão/gaze.

Síntese 4.2: O mesmo procedimento descrito na *Síntese 4.1* foi realizado, com a diferença que o pH do *caldo de síntese*, após a adição do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, foi ajustado para 7,5.

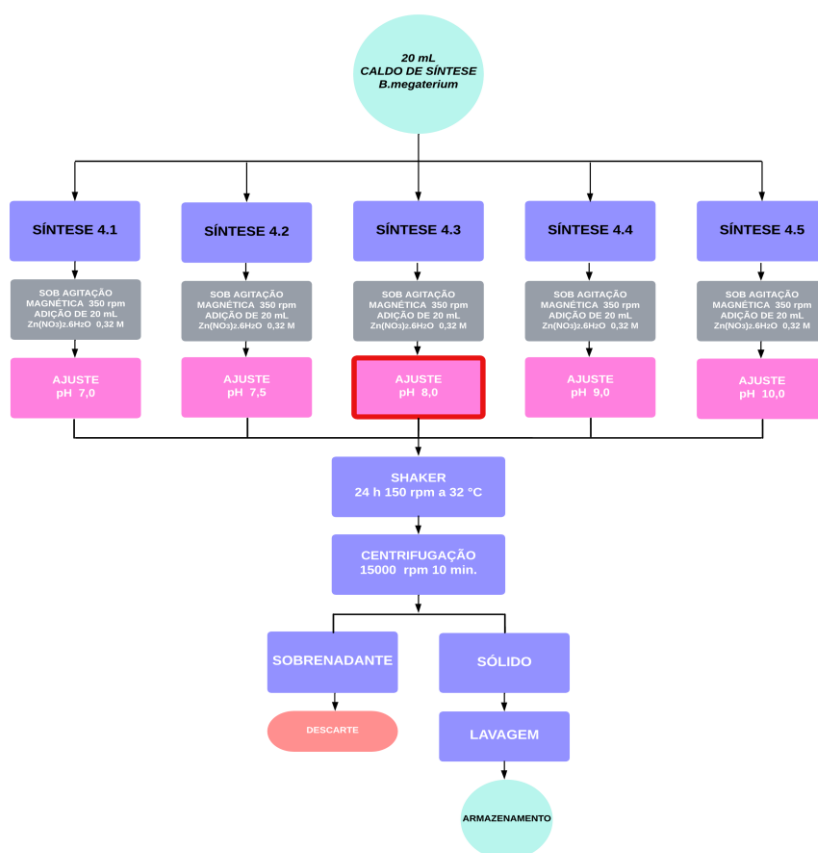
Síntese 4.3: O mesmo procedimento descrito na *Síntese 4.1* foi realizado, com a diferença que o pH do *caldo de síntese*, após a adição do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, foi ajustado para 8,0.

Síntese 4.4: O mesmo procedimento descrito na *Síntese 4.1* foi realizado, com a diferença que o pH do *caldo de síntese*, após a adição do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, foi ajustado para 9,0.

Síntese 4.5: O mesmo procedimento descrito na *Síntese 4.1* foi realizado, com a diferença que o pH do *caldo de síntese*, após a adição do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, foi ajustado para 10,0.

Os frascos erlenmeyer das *Sínteses 4.1 a 4.5* foram colocados no shaker e mantidos a 32°C a 150 rpm por 24 h. Após o período de 24 h, os conteúdos dos frascos erlenmeyer foram transferidos para frascos, distintos, de centrífuga (tubos Falcon) de 50 mL e centrifugados a 15000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o material sólido de cada síntese foi lavado (Seção 5.2.6, p. 90) e armazenado em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

Figura 28- Esquema da *Síntese 4*.



Fonte: Autoria própria.

5.2.2 *Síntese 5* – variação da quantidade de *caldo de síntese*

Em cinco frascos béquer de 100 mL foram adicionados 20 mL de solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M. Posteriormente, em agitação magnética (350 rpm), foram adicionados separadamente aos frascos béquer:

Síntese 5.1: 20 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

Síntese 5.2: 4 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

Síntese 5.3: 2 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

Síntese 5.4: 1 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

Síntese 5.5: 0,5 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

Em seguida, o valor de pH de cada *Síntese* (5.1 a 5.5) foi ajustado para 8,0. Após a estabilização do pH, o conteúdo foi transferido para frascos erlenmeyer de 125 mL, esterilizado e fechado com tampão de algodão/gaze, que foram colocados no shaker onde permaneceram por 24 h a 32°C em agitação de 150 rpm.

Passadas as 24 h de síntese das NPs-ZnO, o pH foi verificado novamente em todos os frascos erlenmeyer (Tabela 7). Cada conteúdo dos frascos erlenmeyer (*Sínteses 5.1-5.6*) foi transferido para frascos distintos de centrífuga (tubos Falcon) de 50 mL e centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material sólido foi lavado (Seção 5.2.6, p. 90) e armazenado em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

Tabela 7- Controle dos valores de pH medidos após 24 h de síntese das NPs-ZnO com o *caldo de síntese* da *B. megaterium* RF1C.

Sínteses	Valores de pH obtidos das Sínteses 5.1 a 5.5
<i>Síntese 5.1</i>	7,38
<i>Síntese 5.2</i>	6,90
<i>Síntese 5.3</i>	6,79
<i>Síntese 5.4</i>	6,80
<i>Síntese 5.5</i>	6,87

Fonte: Autoria própria.

Figura 29- Esquema da *Síntese 5*.



Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Síntese 6 – variação da concentração do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Foram realizadas um total de seis sínteses com concentrações distintas do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ conforme descrito a seguir:

Síntese 6.1: Em um frasco béquer de 50 mL foram adicionados 20 mL da solução do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,032 M. Em seguida foram adicionados, em agitação magnética (350 rpm), 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. O pH foi ajustado para 8,0. Após estabilização do pH, o conteúdo foi transferido para um frasco erlenmeyer de 125 mL esterilizado e fechado com tampão de algodão/gaze.

O mesmo procedimento descrito para a *Síntese 6.1* foi realizado para as *Sínteses 6.2-6.6*, com a diferença na concentração do sal:

Síntese 6.2: 0,064 M do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Síntese 6.3: 0,16 M do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

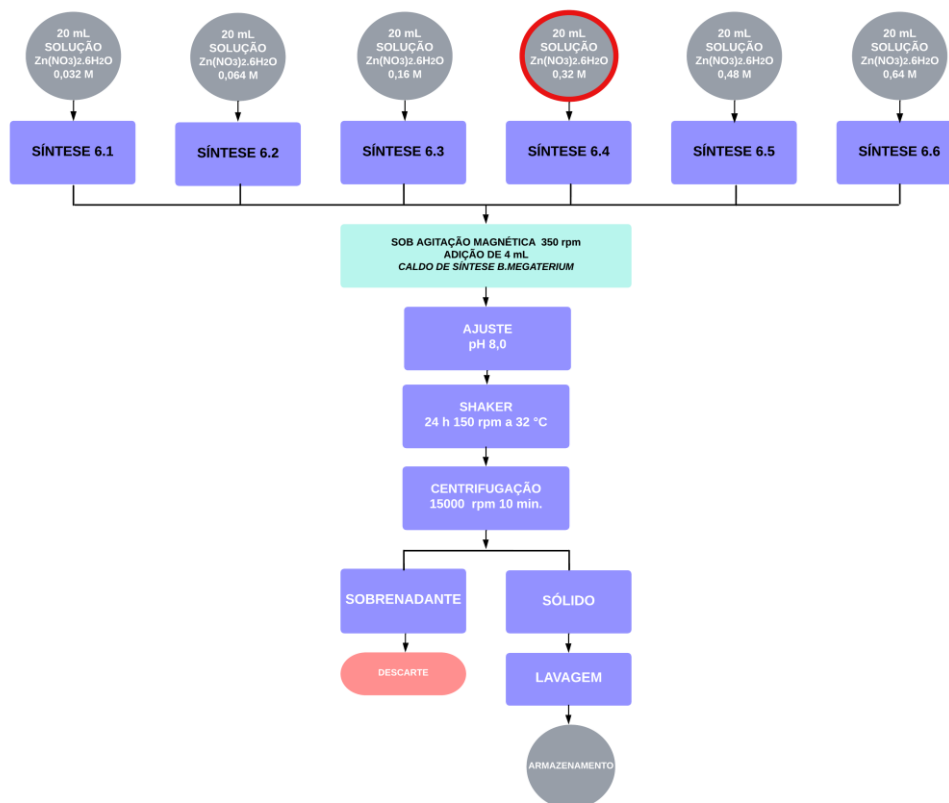
Síntese 6.4: 0,32 M do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Síntese 6.5: 0,48 M do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Síntese 6.6: 0,64 M do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Os frascos erlenmeyer foram colocados no shaker onde permaneceram por 24 h a 32°C em agitação de 150 rpm. Após o período de 24 h, os conteúdos dos frascos erlenmeyer foram transferidos para frascos distintos de centrífuga (tubos Falcon) de 50 mL e então centrifugados a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada síntese foi descartado e o material sólido foi lavado (Seção 5.2.6) e armazenado em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

Figura 30- Esquema da *Síntese 6*.



Fonte: Autoria própria.

5.2.4 *Síntese 7* – variação do tempo de síntese

Foram realizadas um total de cinco sínteses iguais, ou seja, com a mesma concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o mesmo pH, variando apenas o tempo de reação de cada síntese, conforme descrito a seguir:

Síntese 7.1: Em um frasco béquer de 100 mL foi adicionado 20 mL de solução do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,32 M. Em seguida, em agitação magnética (350 rpm) foram acrescentados 4 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. O pH foi ajustado para 8,0. Após a estabilização do pH o volume foi transferido para um frasco erlenmeyer de 125 mL, esterilizado e fechado com tampão de algodão/gaze, o qual foi colocado em shaker a 32°C em agitação de 150 rpm onde permaneceu por 1 h.

O mesmo procedimento descrito para a *Síntese 7.1* foi realizado para as *Sínteses 7.2-7.5*, variando apenas o tempo de síntese conforme a seguir:

Síntese 7.2: 6 h de síntese.

Síntese 7.3: 12 h de síntese.

Síntese 7.4: 24 h de síntese.

Síntese 7.5: 72 h de síntese.

Passado o tempo, foi verificado o valor do pH de cada síntese (Tabela 8). O conteúdo dos frascos erlenmeyer foram transferidos para frascos distintos de centrífuga (tubos Falcon) de 50 mL e então centrifugados a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada síntese foi descartado e o material sólido foi lavado (Seção 5.2.6, p. 90) e armazenado em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

Tabela 8- Controle dos valores de pH na obtenção das NPs-ZnO com a variação do tempo de síntese.

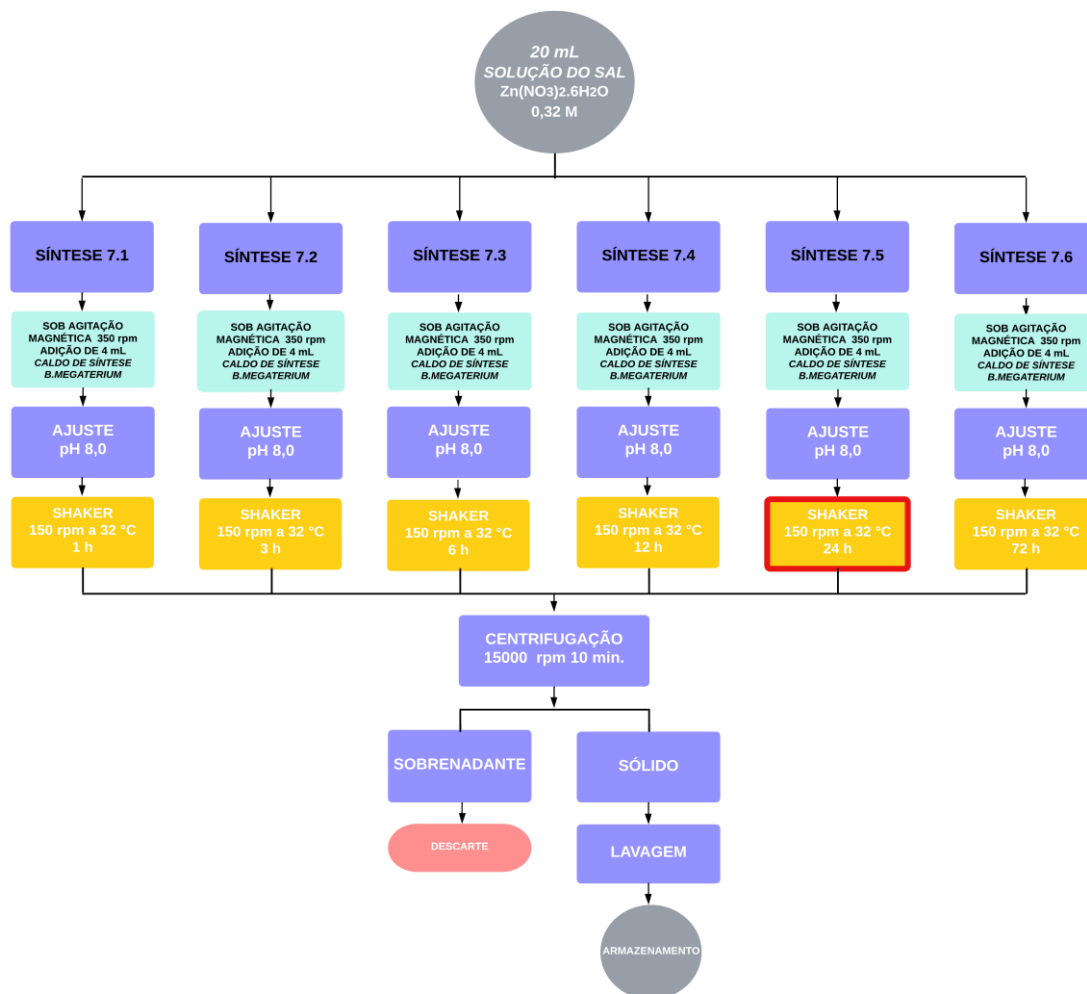
Síntese	Tempo de síntese (h)	Valor de pH
<i>Síntese 7.1</i>	1	7,60
<i>Síntese 7.2</i>	6	7,16
<i>Síntese 7.3</i>	12	7,12
<i>Síntese 7.4</i>	24	7,02
<i>Síntese 7.5</i>	72	7,30

Fonte: Autoria própria.

Foi realizado novamente um segundo grupo de síntese, com as mesmas condições que as usadas na *Síntese 7*, com o tempo de síntese de 30 minutos, 1 h, 3 h e 6 h. Estas sínteses foram feitas em outro dia, usando outro *caldo de síntese*, feito com o mesmo microrganismo, *B. megaterium* RF1C, e da mesma cultura estocada em solução de glicerina. A fim de facilitar a compreensão, este segundo grupo de síntese foi denominado de *Segunda Síntese 7*.

Foi ainda feita uma terceira síntese, com o tempo de 24 h, em dia distinto às sínteses anteriores, também com as mesmas condições que as usadas na *Síntese 7*. Foi usado outro *caldo de síntese*, feito com o mesmo microrganismo, *B. megaterium* RF1C, e da mesma cultura estocada em solução de glicerina que o usado na *Síntese 7*. Esta terceira síntese foi denominada de *Terceira Síntese 7*.

Figura 31- Esquema da Síntese 7.



Fonte: Autoria própria.

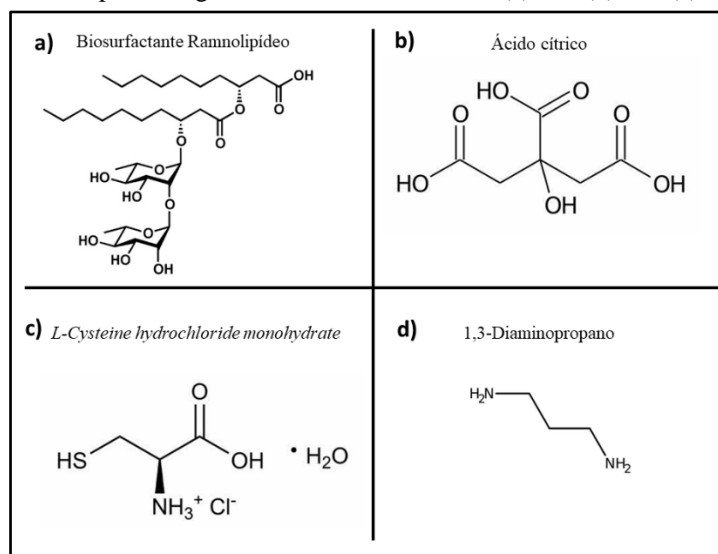
5.2.5 Síntese 8 – variação do tipo de matéria orgânica

Foram realizadas um total de seis sínteses, com a mesma concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, com o mesmo ajuste de pH (8,0) variando o tipo de matéria orgânica nas sínteses. A matéria orgânica atua como um aditivo de estabilização do crescimento das partículas.

A escolha da matéria orgânica (aditivos) das *Sínteses 8.4* (ácido cítrico) e *8.6* (1,3-diaminopropano), assim como suas respectivas concentrações, tiveram como referência o trabalho de NICHOLAS (2011). O ácido cítrico possui grupos carboxílicos que possuem alta afinidade com os íons Zn^{2+} e o 1,3-diaminopropano, segundo NICHOLAS (2011), ancora na face (10 $\bar{1}$ 0) do ZnO favorecendo uma morfologia tubular. E, a escolha da matéria orgânica das *Sínteses 8.2* e *8.3* (biosurfactante Ramnolípídeo) tiveram como referência as literaturas de NARAYANAN et al. (2010) e ESWARI et al. (2018). Há estudos de obtenção de nanopartículas através da utilização de biosurfactantes.

A Figura 32 mostra a estrutura química dos compostos orgânicos usados. As estruturas 32.a-c possuem carboxilas que têm afinidade com o zinco.

Figura 32 – Compostos orgânicos usados nas sínteses. (a) 8.3. (b) 8.4. (c) 8.5. (d) 8.6.



Fonte: Autoria própria.

Síntese 8.1: Em um frasco béquer de 100 mL foi adicionado 20 mL de solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M. Em seguida, em agitação magnética (350 rpm) foram acrescentados 4 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C com 12 h de cultivo³. O valor do pH foi ajustado para 8,0. Após a estabilização do pH, o volume foi transferido para um frasco erlenmeyer de 125 mL, esterilizado e fechado com tampão de algodão/gaze, o qual foi colocado em shaker a 32°C em agitação de 150 rpm onde permaneceu por 24 h.

O mesmo procedimento descrito para a *Síntese 8.1* foi realizado para as *Sínteses 8.2-8.6*, variando o tipo de matéria orgânica da síntese conforme descrito a seguir:

Síntese 8.2: 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C com 24 h de cultivo.

Síntese 8.3: 4 mL de biossurfactante (Rannolipídeo comercial) 440 mg/mL.

Síntese 8.4: 4 mL de solução de ácido cítrico 0,1 M.

Síntese 8.5: 4 mL de solução de *L-cysteine hydrochloride monohydrate* 0,1M.

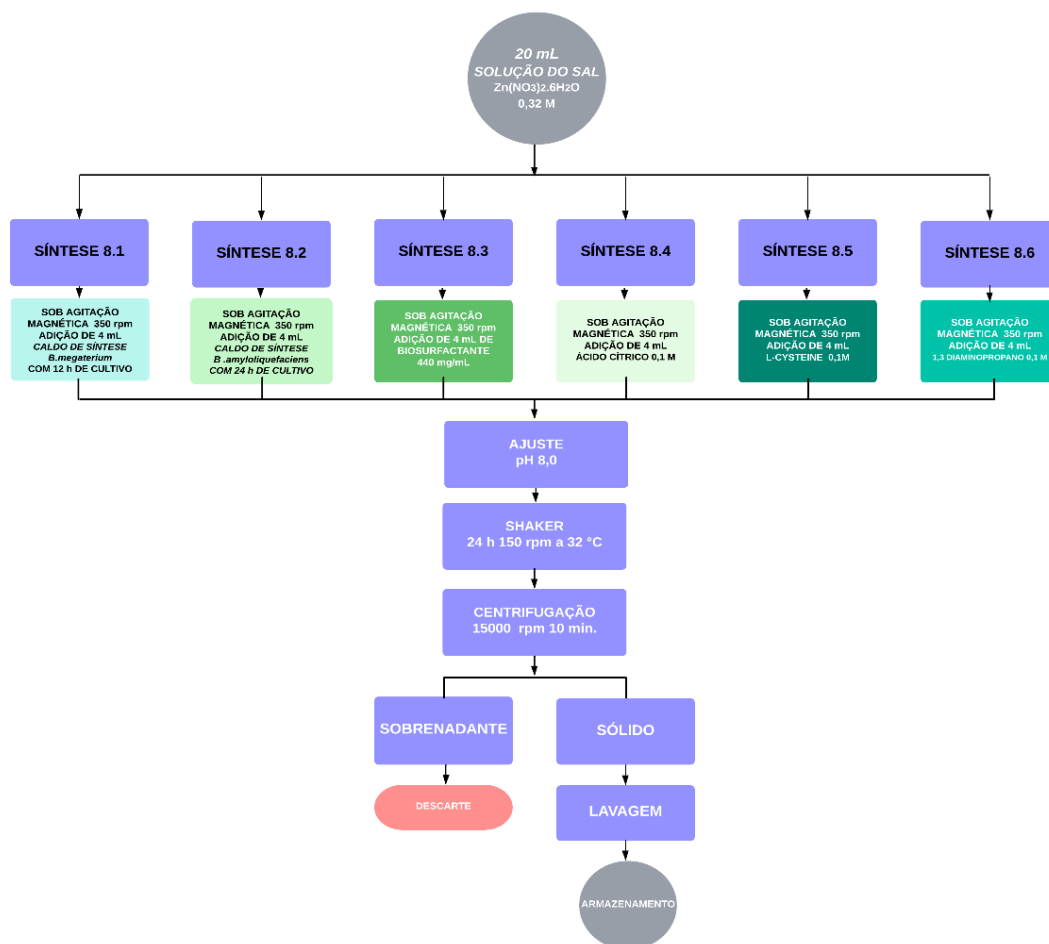
Síntese 8.6: 4 mL de solução de 1,3-diaminopropano 0,1 M.

Após o período de 24 h no shaker, os conteúdos dos frascos erlenmeyer foram transferidos para frascos distintos de centrífuga (tubos Falcon) de 50 mL e então

³ O *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C com 12 h de cultivo foi preparado como descrito na Seção 4.2.5.2 (p. 64) com a diferença que o cultivo no caldo foi feito por 12 horas. Devido ao metabolismo, uma bactéria mais jovem (12 h) pode produzir metabólitos diferentes e/ou em diferentes concentrações quando comparada com uma bactéria mais velha (24 h) (MOHD YUSOF et al., 2019).

centrifugados a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada síntese foi descartado e o material sólido foi lavado (Seção 5.2.6, p. 90) e armazenado em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

Figura 33- Esquema da Síntese 8.



Fonte: Autoria própria.

5.2.6 Lavagem das NPs-ZnO

Em todas as sínteses, das Seções 4 e 5 as NPs-ZnO foram lavadas por cinco vezes com água deionizada esterilizada, conforme procedimento descrito a seguir.

Após a centrifugação foram adicionados 20 mL de água deionizada esterilizada no frasco Falcon que foi agitado por 1 minuto no agitador do tipo Vortex e colocado em ultrassom (40KHz) por 5 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 15000 rpm. O sobrenadante foi descartado sendo adicionado novamente 20 mL de água para realizar a segunda lavagem. Este procedimento foi realizado nas cinco lavagens realizadas consecutivamente.

5.3 Controles das sínteses de NPs-ZnO

A fim de verificar a importância do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C nas sínteses das NPs-ZnO, foram feitos três controles conforme descrito a seguir:

5.3.1 Controle 1 – síntese sem a presença de matéria orgânica

Em um frasco béquer de 50 mL foi adicionado um volume de 20 mL de solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M. Em seguida, em agitação magnética (350 rpm), o valor do pH foi ajustado para 8,0. Após a estabilização do pH, o volume foi transferido para um frasco erlenmeyer de 125 mL, esterilizado e fechado com tampão de algodão/gaze, o qual foi colocado em shaker a 32°C em agitação de 150 rpm onde permaneceu por 24 h.

Após o período de 24 h no shaker, o conteúdo do frasco erlenmeyer foi transferido para um frasco de centrifuga (tubo Falcon) de 50 mL e então centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material sólido foi lavado (Seção 5.2.6, p. 93) e armazenado em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

5.3.2 Controle 2 – síntese na presença do caldo nutriente

Devido a possível presença de resquícios do caldo nutriente no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C (usado nas sínteses das NPs-ZnO) este controle foi feito a fim de verificar a possibilidade de obtenção de NPs-ZnO através dele.

Em um frasco béquer de 100 mL foi adicionado 20 mL de solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M. Em seguida, em agitação magnética (350 rpm), foram acrescentados 4 mL de caldo nutriente esterilizado (Seção 4.2.3.2, p. 59). O valor do pH foi ajustado para 8,0. Após a estabilização do pH, o volume foi transferido para um frasco erlenmeyer de 125 mL, esterilizado e fechado com tampão de algodão/gaze, o qual foi colocado em shaker a 32°C em agitação de 150 rpm onde permaneceu por 24 h.

Após o período de 24 h no shaker, o conteúdo do frasco erlenmeyer foi transferido para um frasco de centrifuga (tubo Falcon) de 50 mL e então centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material sólido foi lavado (Seção 5.2.6, p. 90) e armazenado em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

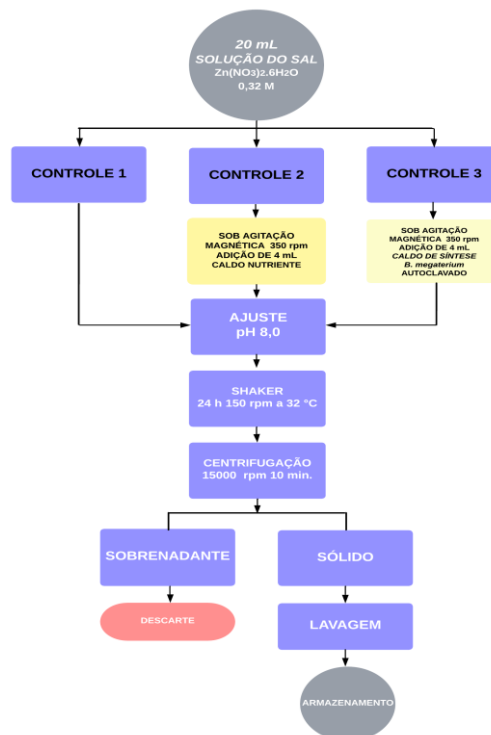
5.3.3 Controle 3 – síntese das NPs-ZnO com o caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C previamente autoclavado

Para a síntese deste controle, o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, obtido na Seção 4.2.5.2 (p. 64), foi autoclavado a 120°C por 20 minutos. Após o seu resfriamento à temperatura ambiente, o *caldo* foi utilizado na síntese, conforme descrito a seguir.

Em um frasco béquer de 100 mL foi adicionado 20 mL de solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M. Em seguida, em agitação magnética (350 rpm), foram acrescentados 4 mL de *caldo de síntese* (autoclavado) da bactéria *B. megaterium* RF1C. O valor do pH foi ajustado para 8,0. Após a estabilização do pH, o volume foi transferido para um frasco erlenmeyer de 125 mL, esterilizado e fechado com tampão de algodão/gaze, o qual foi colocado em shaker a 32°C em agitação de 150 rpm onde permaneceu por 24 h.

Após o período de 24 h no shaker, o conteúdo do frasco erlenmeyer foi transferido para um frasco de centrifuga (tubo Falcon) de 50 mL e então centrifugado a 15000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material sólido foi lavado (Seção 5.2.6, p. 90) e armazenado em geladeira (4°C) para posteriores análises e caracterização das NPs-ZnO.

Figura 34- Esquema dos Controles 1-3 de síntese das NPs-ZnO.



Fonte: Autoria própria.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE EXPERIMENTAL I

6.1 *Caldo de síntese*

Para o controle do *caldo de síntese*, livre de células, obtido na Seção 4.2.5.2, onde 1 mL do caldo foi inoculado em placa de Petri contendo meio Agar Nutriente, apresentou resultado negativo, para o crescimento de células, após o inóculo permanecer em estufa por 48 h a $32^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. O resultado foi negativo para o crescimento de células das três bactérias, inicialmente selecionadas para os estudos, *Bacillus megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycoides* 2RF2C. Com esse resultado, verificou-se a eficiência da centrifugação e da filtração, para a remoção das células bacterianas do caldo.

6.1.1 Tensão superficial

Há estudos na literatura em que a molécula do biossurfactante pode estar envolvida na síntese de nanopartículas (NARAYANAN et al., 2010; ESWARI et al., 2018; REDDY et al., 2009). Assim, a fim de verificar a possível presença de biossurfactante no *caldo de síntese* das bactérias, foi feita esta análise de tensão superficial. Para comparar os valores, também foi medida a tensão superficial do caldo nutriente, onde foi feito o cultivo das bactérias, e da solução do biossurfactante Ramnolipídeo comercial (440 mg.mL^{-1}). O Ramnolipídeo é um surfactante produzido, principalmente, pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (NARAYANAN et al., 2010; BERTUSO, 2022).

A Tabela 9 contém os resultados das medidas de tensão superficial realizadas no *caldo de síntese* das bactérias *B. megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycoides* 2RF2C.

Tabela 9- Resultado das medidas de tensão superficial dos *caldos de síntese* das bactérias *B. megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycoides* 2RF2C, do caldo nutriente e da solução do biossurfactante Ramnolipídeo comercial (440 mg.mL^{-1}).

Amostra	Tensão superficial (mN.m^{-1})
<i>Caldo de síntese</i> - <i>B. megaterium</i> RF1C	$56,973 \pm 0,161$
<i>Caldo de síntese</i> - <i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C	$30,448 \pm 0,061$
<i>Caldo de síntese</i> - <i>B. pseudomycoides</i> 2RF2C	$48,133 \pm 1,315$
Caldo nutriente	$53,102 \pm 0,413$
Solução biossurfactante Ramnolipídeo (440 mg.mL^{-1})	$31,546 \pm 0,249$

Fonte: Autoria própria.

A presença de um surfactante no meio aquoso diminui de forma considerável a tensão superficial do meio. Como pode ser visto na Tabela 9, o valor da tensão superficial da solução de Ramnolipídeo (440 mL^{-1}) diminuiu consideravelmente a tensão superficial da água, passando de $72,750 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (SHAW, 1975) para $31,546 \pm 0,249 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Assim, analisando os valores de tensão superficial da Tabela 9, é provável a presença de algum tipo de biosurfactante no *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C, pois o valor obtido na medida foi de $30,448 \pm 0,061 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, estando na mesma grandeza do valor obtido na solução do Ramnolipídeo ($31,546 \pm 0,249 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$). E, quando ainda comparado ao valor da tensão superficial do caldo nutriente, o valor diminuiu de $53,102 \pm 0,413 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ para $30,448 \pm 0,061 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

Outro indício da presença de biosurfactante no *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C foi a formação de espumas durante o crescimento do microrganismo, como pode ser visto na Figura 35.

Figura 35- *Caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C.



Fonte: Autoria própria.

Analisando o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C não foi observado redução da tensão superficial em relação ao caldo nutriente. Pelo contrário, observou-se um pequeno aumento, passando de $53,102 \pm 0,413 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, valor da tensão superficial do caldo nutriente, para $56,973 \pm 0,161 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, valor da tensão superficial do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. Portanto, não houve indício da presença de biosurfactante neste caldo.

Por fim, também não é provável a presença de biosurfactante no *caldo de síntese* da bactéria *B. pseudomycooides* 2RF2C, pois não houve uma redução considerável no valor da tensão superficial, como é característico de um biosurfactante. O valor da tensão superficial do *caldo de síntese* da bactéria *B. pseudomycooides* 2RF2C foi de $48,133 \pm 1,315 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ contra o valor de $56,973 \pm 0,161 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ do caldo nutriente. A diminuição da tensão superficial pode ser atribuída à presença de outras moléculas orgânicas, por exemplo, lipídeos e proteínas.

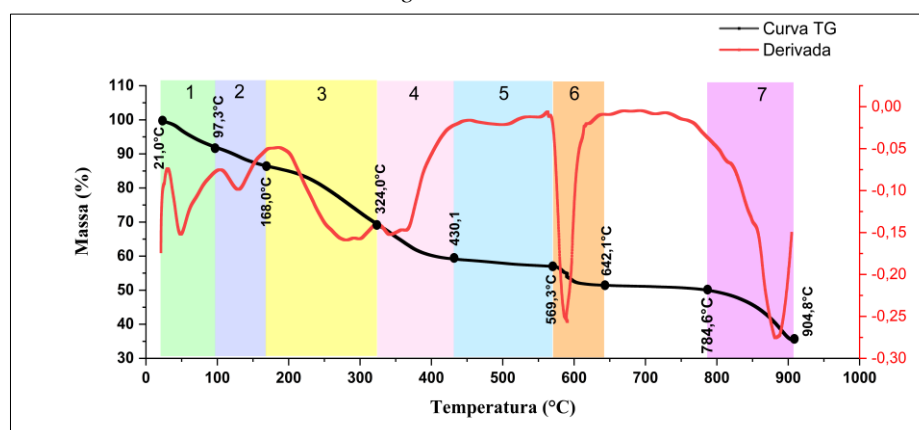
As análises seguintes (Seções 6.1.2 a 6.1.6) foram realizadas apenas com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, que foi o caldo escolhido para a realização da maioria das sínteses de NPs-ZnO.

Devido a este trabalho, que abrange a síntese de nanopartículas de óxido de zinco pela via biológica, ser o primeiro a ser realizado no Grupo de Pesquisa do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise do IQSC-USP, a bactéria *B. megaterium* RF1C foi a escolhida por ter sido encontrado um trabalho na literatura de SARAVANAN et al. (2018), em que foram obtidas NPs-ZnO através desta bactéria e por ter uma linhagem na coleção de microrganismos do grupo de pesquisa.

6.1.2 Análise Termogravimétrica – TG

A fim de verificar o comportamento da curva termogravimétrica (Figura 36), ou seja, a variação da massa do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C em função da temperatura, foi realizada a análise térmica – TG. A Tabela 10 contém a porcentagem da massa decomposta nos intervalos de temperatura para cada uma das regiões da curva de TG.

Figura 36- Curva termogravimétrica da análise térmica (TG) do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 10- Porcentagem de massas decompostas do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C nos respectivos intervalos de temperatura (°C) extraídos da curva TG.

Região da Curva TG	Intervalo de temperatura (°C)	Massa (%)
1	21,0 – 97,3	7,97
2	97,3 – 168	5,56
3	168 – 324	16,8
4	324 – 430	10,5
5	430 – 569	2,18
6	569 – 642	5,52
7	785 – 905	16,0
Resíduo		35,5

Fonte: Autoria própria.

A massa inicial do *caldo de síntese* liofilizado utilizado nesta análise foi de 8,07 g. Até a temperatura de 97,3°C ocorreu a perda de 7,97% de massa da amostra, o que sugeriu a saída de moléculas de água e de pequenas moléculas orgânicas, mais voláteis. Em seguida, na faixa de temperatura entre 97,3°C a 430,1°C a soma das massas (32,9%) provavelmente foi devido a decomposição de compostos orgânicos provenientes das biomoléculas secretadas e excretadas pela bactéria *B. megaterium* RF1C para o *caldo de síntese* e ainda àquelas que permaneceram do caldo nutriente. O resultado obtido nesta análise está em acordo com as análises que foram realizadas na Seção 6.1.3 (p. 100) onde a soma total de da matéria orgânica presente no *caldo de síntese* foi de aproximadamente 33,4%.

No intervalo de 569,3°C – 642,1°C a perda de 5,52% de massa pode ser devido à presença de compostos orgânicos carbonizados que foram se acumulando no recipiente onde a amostra foi depositada dentro do forno.

Entre 784,6°C – 904,8°C a alta porcentagem de perda de massa (16,0%) possivelmente foi devido a decomposição de sais inorgânicos (DU et al., 2017). Os sais constituem boa parte dos meios de cultura usados no cultivo dos microrganismos, como o caldo nutriente usado neste trabalho, que continha uma certa quantidade de cloreto de sódio (5 g.L⁻¹). Também nesta faixa de temperatura de 784,6°C a 904,8°C pode ocorrer a decomposição de fosfatos a pirofosfatos (NUNES, 2009). É interessante notar que o final da curva (900°C), não terminou em um patamar, ela ainda estava em declínio. No entanto, na derivada obteve-se a curvatura em ascensão sugerindo que a curva estava finalizando para a base. O resíduo de 35,5% obtido no final da análise provavelmente poderia ser constituído de carbonatos, óxidos, pirofosfatos, dentre outros (SKOOG et al., 2002).

É interessante notar que os patamares da curva termogravimétrica (Figura 36) não estavam bem definidos na curva de TG, isso pode ser devido a sobreposição dos eventos. Por exemplo, à medida em que está ocorrendo a saída de água, antes que ela saia por completo se inicia a saída de moléculas orgânicas.

Em linhas gerais, o comportamento térmico da amostra do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C se resumiu em três principais eventos. O primeiro foi devido a desidratação da amostra, o segundo foi devido a degradação da matéria orgânica e o terceiro correspondeu a decomposição de sais inorgânicos.

Vale ressaltar que a análise térmica do *caldo de síntese* foi programada para iniciar à temperatura ambiente e terminar a 1000°C. No entanto, o termopar do forno atingiu a temperatura programada de 1000°C, mas esta temperatura não atingiu a amostra que

estava dentro do recipiente no forno, pois a curva TG foi até aproximadamente 900°C, este fenômeno pode comumente ocorrer em ensaios termogravimétricos.

6.1.3 Açúcares, lipídeos e proteínas totais

As análises de açúcares, lipídeos e proteínas totais foram realizadas pela empresa CBO Análises Laboratoriais para confirmar a presença destas substâncias no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C (Tabela 11). O laudo das análises está no **Anexo B**.

Tabela 11- Resultado das análises de proteínas, açúcares e lipídeos totais presentes no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

Ensaio	Valor encontrado no caldo líquido (%)	Valor encontrado no caldo liofilizado (%)
Proteína bruta	32,30	36,01
Extrato etéreo ⁴ (lipídeos)	0,85	0,95
Maltose	<0,01	-
Soma dos carboidratos livres	0,11	0,12
Xilose	<0,01	-
Glicose	<0,01	<0,01
Frutose	<0,01	-
Sacarose	0,11	0,12
Lactose	<0,01	-
Galactose	<0,01	-
Rafinose	<0,01	-

Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados da Tabela 11, verificou-se que o *caldo de síntese* continha uma maior quantidade de proteínas (32,30%). A fim de averiguar as proteínas presentes foi realizada a análise de eletroforese, discutida na seção seguinte (Seção 6.1.4, p.101). De acordo com a literatura (SOUZA, 2007) a bactéria *B. megaterium* produz amilases, glicose desidrogenase, esteroide hidrolase, penicilina acilase.

Foi ainda observada a presença de lipídeos com o teor de 0,85%. A soma dos carboidratos livres foi de 0,11% sendo a sacarose o açúcar em maior concentração, 0,11%. Os demais açúcares analisados, como a maltose, xilose, glicose, frutose, lactose, galactose e rafinose estavam em quantidades abaixo de 0,01%.

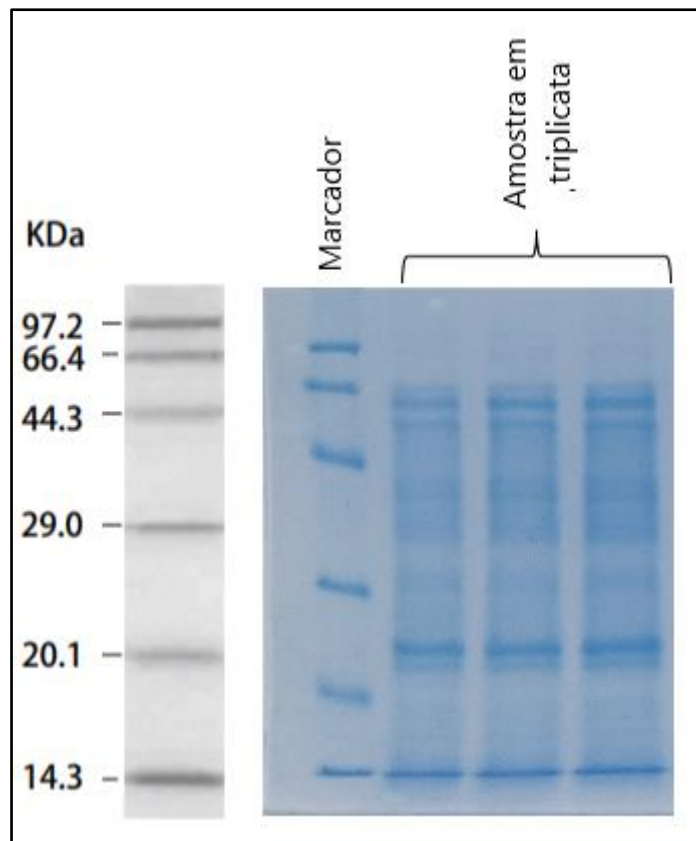
Os resultados obtidos nesta análise - teor total de açúcares, lipídeos e proteínas - estão em acordo com a porcentagem de matéria orgânica, presente no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, encontrada na TG.

⁴ Extrato Etéreo: determina o teor de lipídeos, incluindo ácidos graxos livres, triglicerídeos, ceras, esteróis etc., ou seja, os componentes insolúveis em água que são solúveis em solventes orgânicos. Nesta técnica, utilizou-se como solvente apolar, o éter, para extrair a fração lipídica da amostra (GALERIANI; COSMO, 2020).

6.1.4 Eletroforese

A análise de eletroforese foi realizada a fim de identificar a faixa da massa molecular das proteínas presentes no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. A Figura 37 mostra o gel obtido nesta análise.

Figura 37 – Gel obtido na análise de eletroforese do caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C dialisado e concentrado.



Fonte: Autoria própria.

Através do *Software ImageJ* foram obtidos os valores de migração relativa das bandas no gel de eletroforese. Os valores do marcador *Protein Molecular Weights – Low Range* foram plotados e através da equação da reta foi possível obter as massas em kDa das bandas das proteínas contidas na amostra do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C (Tabela 12 e Figura 38).

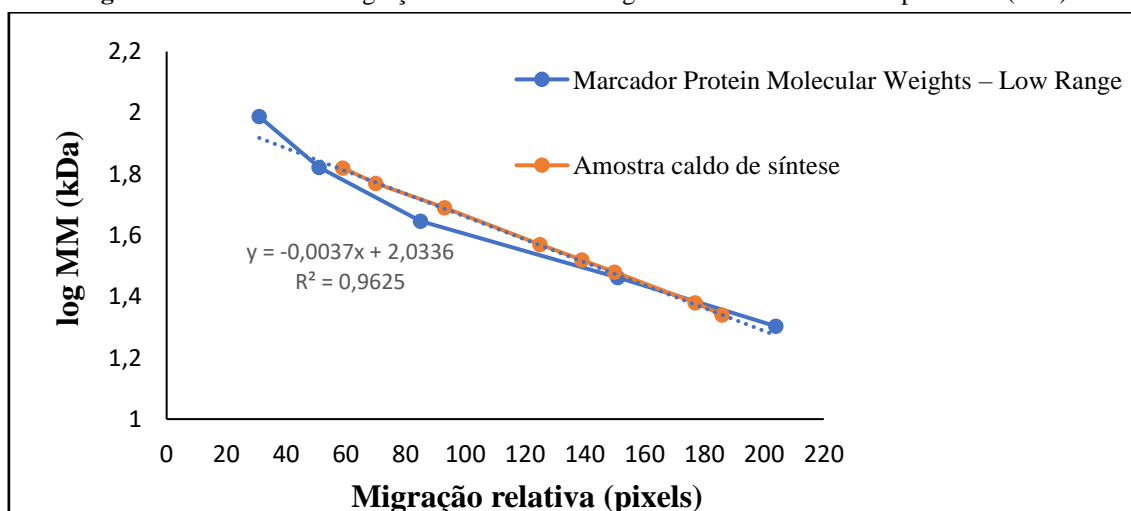
A análise de eletroforese confirmou a presença de proteínas no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e que elas possuíssem massa molecular entre 22,1 e 65,4 kDa, conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Migração relativa e massa molecular das proteínas do marcador *Protein Molecular Weights – Low Range* e do caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C obtidas do gel na análise de eletroforese.

	Migração relativa (pixels)	Log MM (kDa)	MM (kDa)	Proteína
Marcador <i>Protein Molecular Weights – Low Range</i>	31	1,99	97,2	Fosforilase B
	51	1,82	66,4	Albumina sérica
	85	1,65	44,3	Ovalbumina
	151	1,46	29	Anidrase carbônica
	204	1,30	20,1	Inibidor de tripsina
Caldo de síntese <i>B. megaterium</i> RF1C	59	1,82	65,4	-
	70	1,77	59,5	Amilase
	93	1,69	48,9	-
	125	1,57	37,3	Esteróide hidrolase
	139	1,52	33,1	-
	150	1,48	30,1	Glicose desidrogenase
	177	1,38	23,9	-
	186	1,34	22,1	-

Fonte: Autoria própria.

Figura 38 – Gráfico da migração relativa *versus* log da massa molecular das proteínas (kDa).



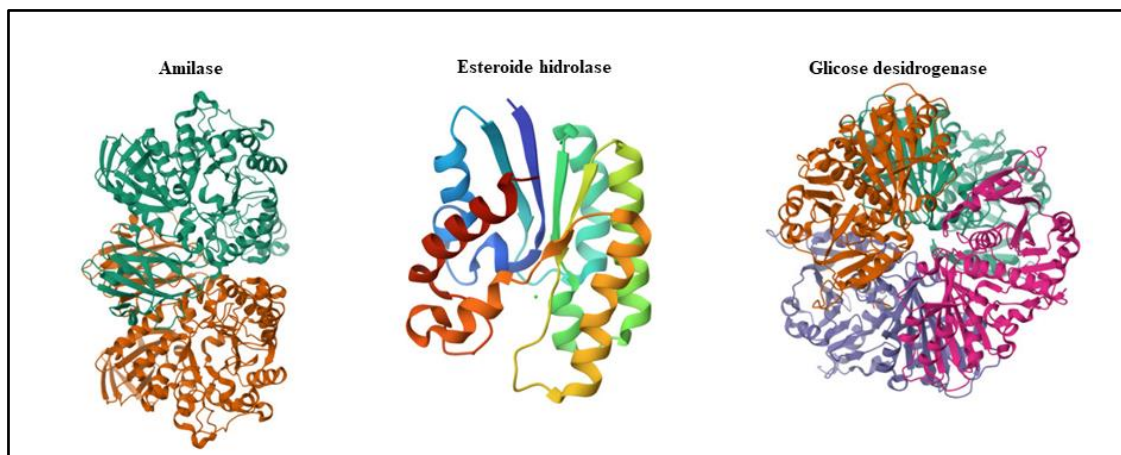
Fonte: Autoria própria.

De acordo com a literatura (SOUZA, 2007) a bactéria *B. megaterium* RF1C poderia produzir as proteínas amilase, esteroide hidrolase, glicose desidrogenase, dentre outras. Os valores das massas destas proteínas fornecidos no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB), são 56,0 kDa, 37,0 kDa e 28,8 kDa (115 kDa / 4). Observou-se que na análise de eletroforese foram encontradas proteínas com massas de 59,5 kDa, 37,3 kDa e 30,1 kDa (Tabela 12). Estes valores estão próximos aos valores das massas das proteínas fornecidos no banco de dados PDB. Isso permite sugerir a presença das proteínas amilase, esteroide hidrolase, glicose desidrogenase no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium*

RF1C que foi usado nas sínteses das NPs-ZnO (Figura 39). Contudo, para a confirmação destas proteínas no *caldo* seria necessário realizar a análise de *Western Blotting*.

É importante ressaltar que a massa molecular da proteína glicose desidrogenase fornecida no PDB foi de 115 kDa. No entanto, esta proteína é um tetrâmero e como a amostra na análise de eletroforese sofre desnaturação, o tetrâmero se desintegra e massa da proteína desnaturada pode ser dividida por 4.

Figura 39- Ilustração das proteínas amilase, esteroide hidrolase e glicose desidrogenase.



Fonte: Disponível em <https://www.rcsb.org/> Acesso em 03 de jun. 2023.

6.1.5 RMN de líquido

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica valiosa para a elucidação estrutural, tanto de moléculas pequenas quanto de macromoléculas. Contudo, o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C possui uma rica composição de compostos e desta forma, o perfil dos espectros de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) obtidos foram complexos, impossibilitando a elucidação estrutural dos vários compostos presentes.

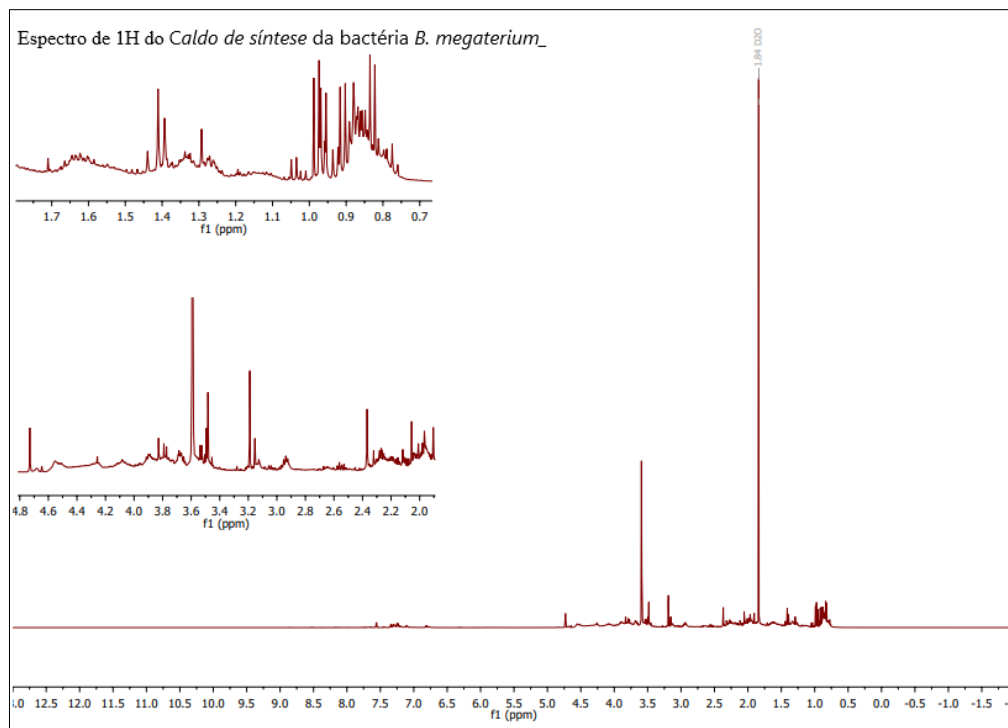
As análises a partir dos espectros permitiram identificar as possíveis classes de compostos orgânicos através dos deslocamentos químicos característicos de determinados grupos funcionais presentes no *caldo de síntese* (Figuras 40-41).

A literatura consultada para a análise dos resultados desta técnica foi PAVIA et al. (2012).

Os sinais de hidrogênios encontrados na região entre 0,7 e 1,7 ppm apresentaram um menor deslocamento químico, logo, podem estar associados a carbonos com hibridação sp^3 que não estão diretamente ligados a nenhum tipo de substituinte retirador de elétrons. Nesta região, podem ser encontrados hidrogênio ligados a cadeias carbônicas – R-CH_3 ; $\text{R-CH}_2\text{-R}$ e $\text{R}_3\text{-CH}$ como de proteínas e ácidos graxos, já que nas análises de

proteínas totais e de extrato etéreo foram obtidos um teor de 32,30% de proteínas e 0,85% de lipídeos.

Figura 40- Espectro de RMN de ^1H (500 MHz D_2O) do caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C.



Fonte: Autoria própria.

Na região de deslocamento químico entre 2,0 e 4,0 ppm é possível a presença de hidrogênios ligados a carbonos que estão ligados diretamente a grupos retiradores de elétrons, como por exemplo, o nitrogênio das aminas presente nos resíduos de aminoácidos, as amidas das proteínas, dentre outros. O alto teor de proteínas encontrado nas análises de proteínas totais e na análise de eletroforese está em acordo com esta interpretação. Além disso, VÍLCHEZ (2018) relatou a produção de poliaminas por *B. megaterium*.

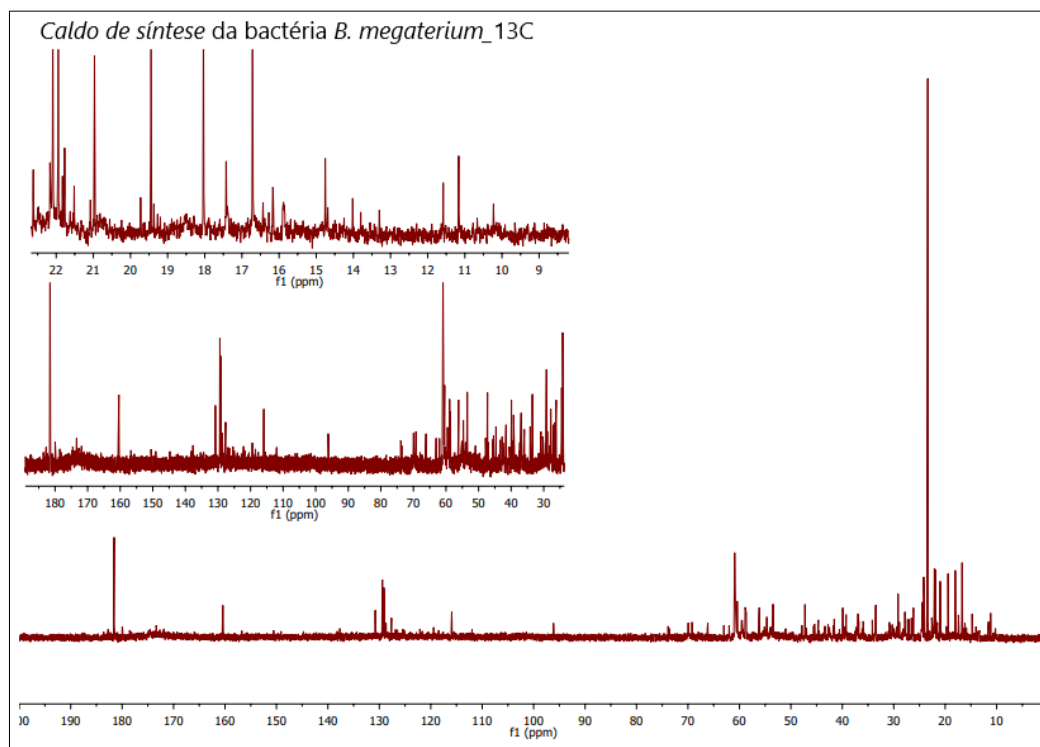
Ainda na região entre 2,0 e 4,0 ppm os sinais encontrados podem ser atribuídos a hidrogênios de ésteres, assim como, de hidrogênios ligados a carbonos adjacentes aos carbonos das carbonilas, como ocorre nas proteínas. Também podem ter hidrogênios associados a carbonos com hibridação sp^3 próximo a grupos $\text{C}=\text{C}$ e aromáticos ($-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$; CH_2-Ar).

Entre 3,0 e 4,8 ppm os deslocamentos químicos podem estar associados a átomos de hidrogênios ligados a carbonos que estejam diretamente ligados a grupos fortemente retiradores de elétrons como o oxigênio das hidroxilas e os hidrogênios dos éteres, como nos açúcares, já que foi encontrado um teor de 0,11% de sacarose no caldo de síntese e conforme as estruturas C5, C17 e C18 encontradas na análise de CG (Seção 6.1.7, p. 109).

Na região de deslocamento químico entre 6,25 e 7,5 ppm tem-se sinais que podem estar associados a hidrogênios aromáticos, já que como mencionado na Seção 1.5 (p. 50) a bactéria *B. megaterium* RF1C pode produzir compostos fenólicos. Ainda nesta região, o deslocamento químico também pode ser atribuído a presença de alcenos, de amidas, aminas, bases nitrogenadas, dentre outros.

Na Figura 41 tem-se o espectro de ^{13}C .

Figura 41- Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz D_2O) do caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C.



Fonte: Autoria própria.

Na região do espectro entre 9 e 20 ppm os sinais encontrados são característicos de átomos de carbono que não estão diretamente ligados a grupos retiradores de elétrons. Na região espectral, em valores mais baixos (8 a 30 ppm) são mais prováveis a presença de grupos R-CH_3 , R-CH_2 -, $\text{RR}'\text{-CH}$ -, etc. que não estão ligados diretamente a átomos eletronegativos. Em valores de ppm maiores (30 a 60 ppm) são mais prováveis a presença de diversos grupos de carbonos ($\text{R}_2\text{-CH}_2$, R-CH_3 , R-CH_2 -, $\text{RR}'\text{-CH}$ -, etc.) ligados diretamente ou próximos a átomos eletronegativos, com destaque para o oxigênio e nitrogênio. Nestas regiões (30 a 60 ppm) podem ocorrer a presença de hidrogênios que estejam ligados em estruturas cíclicas do tipo -CH_2 - e $\text{-RCH-R}'$ -.

Os sinais encontrados entre 35 e 75 ppm podem ser atribuídos a átomos de carbono ligados a substituintes eletronegativos como o oxigênio (C-O), que estão presentes principalmente em açúcares e como o nitrogênio (C-N), que estão presentes em resíduos

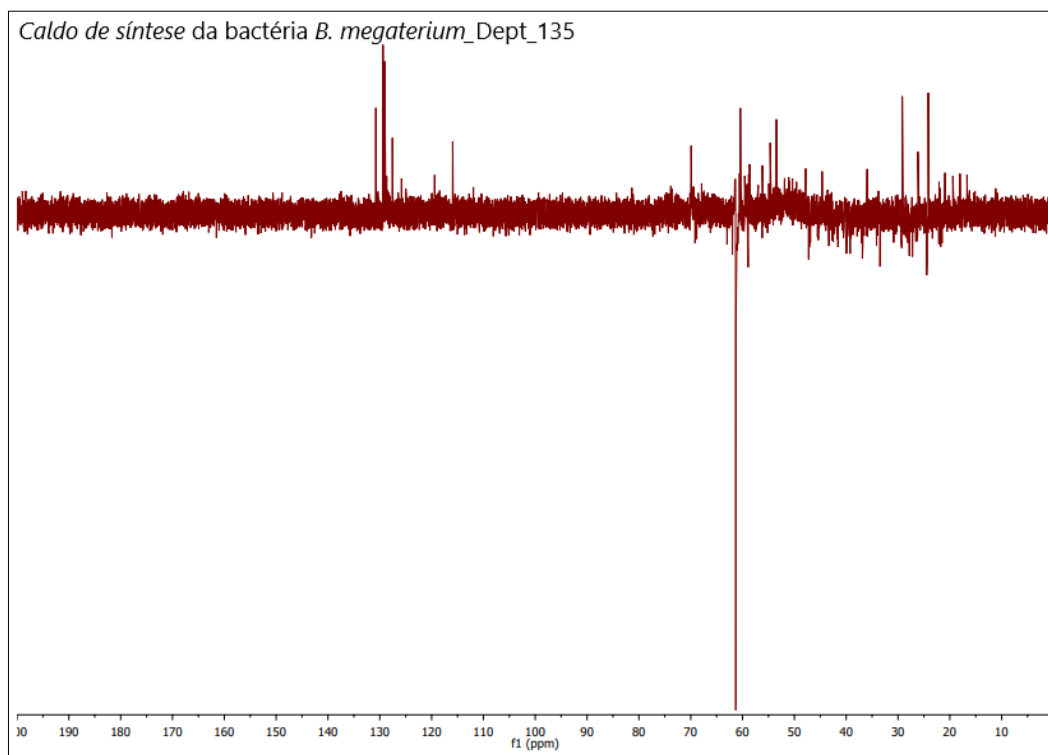
de aminoácidos, bases nitrogenadas etc. O pico em 95 ppm também pode ter a mesma atribuição.

Na região do espectro entre 110 e 175 ppm podem ser atribuídos os picos pela presença de carbonos sp^2 (C=C) aromáticos, alcenos, álcoois, ésteres etc. Os carbonos aromáticos estão presentes em fenóis, possível metabólito produzido pela bactéria *B. megaterium* RF1C e em alguns aminoácidos de proteínas. As ligações duplas (alcenos) podem ser encontrados em lipídeos (ácidos graxos insaturados), como foram identificados no *caldo de síntese*, dentre outros. Ainda dentro desta região, entre 130 e 160 ppm os sinais podem ser de amidas presentes em proteínas.

Os picos encontrados entre 175 e 185 ppm, sinais mais desblindados obtidos no espectro de RMN de ^{13}C , são característicos de carbonos carbonílicos (C=O), especialmente os ésteres (RCO₂R') e as amidas (RCONH₂), o que estão em concordância com a presença de ligações amídicas e lipídicas, possivelmente presentes no *caldo de síntese*, nos metabólitos secundários.

Para verificar a presença de carbonos metilênicos (-CH₂-), carbonos metínicos (-CH-) e carbono não ligados a hidrogênios (-C-) foi realizada também a análise de DEPT-135° no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C (Figura 42).

Figura 42- Espectro de RMN de ^{13}C (500 MHz D₂O) - DEPT-135° do caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C.

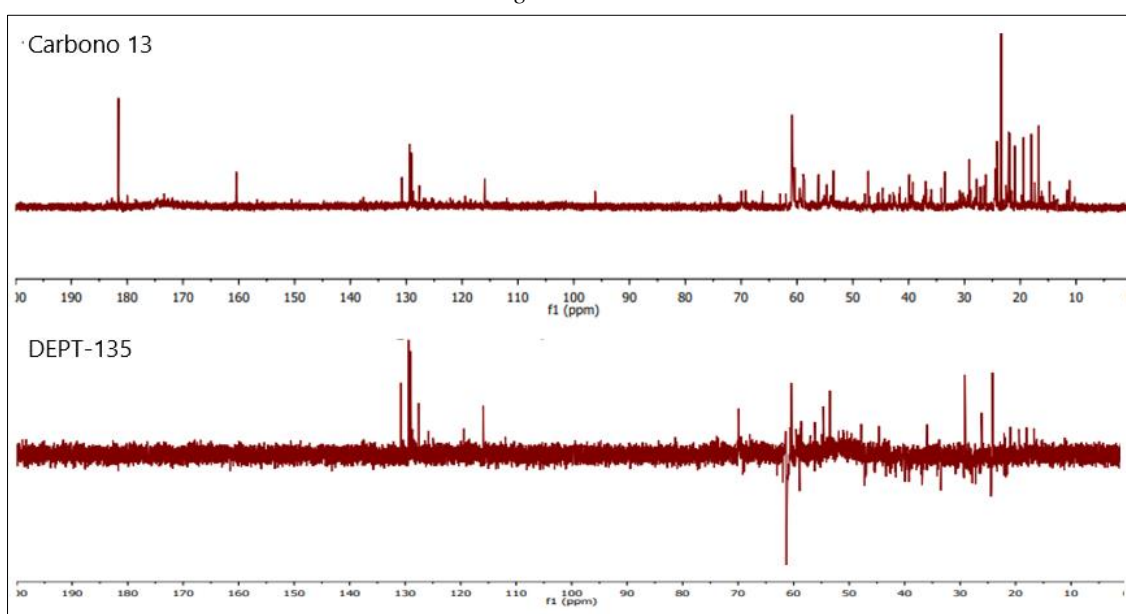


Fonte: Autoria própria.

Na região do espectro entre 20 e 70 ppm foram encontrados “sinais invertidos” no espectro DEPT 135°, os quais são característicos de carbonos metilênicos (-CH₂-). Nesta região do espectro foram encontrados átomos de carbonos que não estão diretamente ligados a átomos retiradores de elétrons (até 50 ppm) e átomos de carbonos metilênicos que poderiam estar diretamente ligados a grupos retiradores de elétrons (acima de 50 ppm), conforme discutido anteriormente. São grupos de átomos característicos de cadeias carbônicas presentes nos lipídeos e aminoácidos por exemplo.

A Figura 43 ilustra os Espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135°.

Figura 43- Comparação entre os espectros de RMN de ¹³C e DEPT-135° do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.



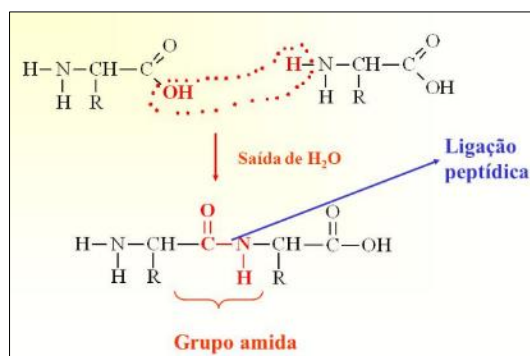
Fonte: Autoria própria.

Ao comparar os espectros de RMN de ¹³C e de DEPT-135° pode-se afirmar a presença de carbonos não hidrogenados (-C-) na amostra analisada, *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, pois eles foram suprimidos no espectro de DEPT-135°. Desta forma, os sinais positivos no espectro DEPT-135° são característicos de carbonos metínicos (-CH-) ou metílicos (-CH₃-). Na Figura 43 é possível notar que a densidade de sinais no espectro de RMN de ¹³C é maior do que a obtida no espectro DEPT-135°. Pode-se inferir, que a diferença entre as duas densidades é atribuída à presença de carbonos não hidrogenados (-C-) no espectro de RMN de ¹³C.

De acordo com o exposto acima, os sinais encontrados na região entre 160 ppm e 180 ppm do espectro de RMN de ¹³C foram suprimidos no DEPT-135° evidenciando que seriam sinais típicos de carbonos não hidrogenados (-C-), característicos de ligações C=O, de ésteres e amidas, por exemplo. Há a possibilidade destes carbonos serem de

ligações peptídicas das proteínas (Figura 44) pois há um alto teor de proteínas no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

Figura 44- Representação de ligação peptídica.



Fonte: Disponível em ligação peptídica - Bing images/Acesso em: 24 de mar. 2023.

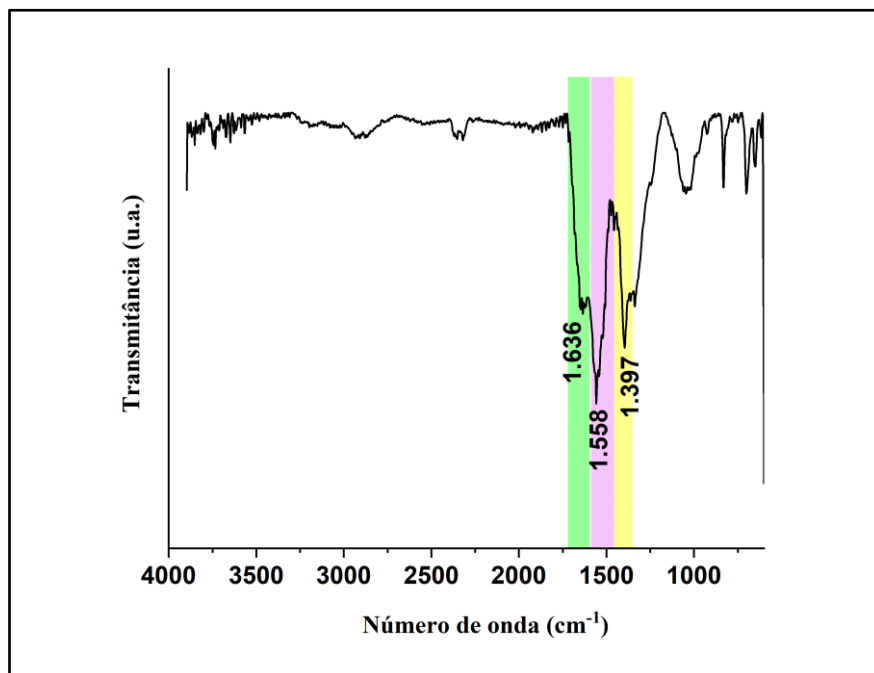
6.1.6 FT-IR

A análise de infravermelho foi realizada com a finalidade de identificar os possíveis grupos funcionais presentes no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. Devido ao alto teor de proteínas, era esperado a presença de bandas de ligações características de amidas. No entanto, devido à complexidade da composição do *caldo de síntese*, a interpretação do espectro foi feita com auxílio dos resultados obtidos nas análises de RMN e na análise de CG.

A região de absorção de maior energia de ligação ($3.600 - 2.700 \text{ cm}^{-1}$) está comumente associada às vibrações de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligados a carbono, oxigênio e nitrogênio (C-H, O-H e N-H). No entanto, não foi observada banda característica desta deformação nesta região do espectro, conforme pode ser visto na Figura 45 que mostra o espectro obtido na análise.

A interpretação do espectro foi feita a partir das bandas na região de menor energia. O estiramento em 1.636 cm^{-1} pode ser atribuído a ligação dupla entre carbono e oxigênio, C=O. A banda em 1.558 cm^{-1} pode ser devida a deformação angular da ligação entre nitrogênio e hidrogênio, N-H. Em 1.397 cm^{-1} o estiramento atribuído à ligação entre carbono e nitrogênio (C-N).

Figura 45- Espectro de absorção na região do infravermelho do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.

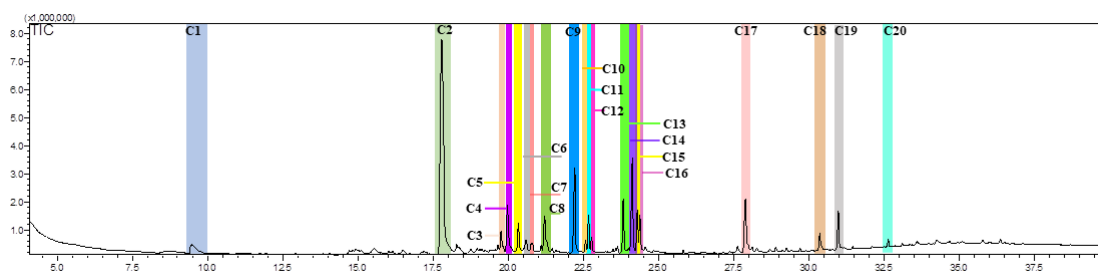


Fonte: Autoria própria.

6.1.7 Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A Figura 46 mostra o cromatograma do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C obtido por análise de CG-EM

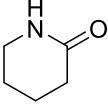
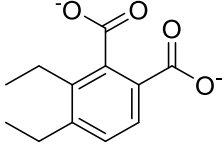
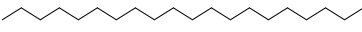
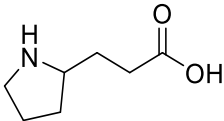
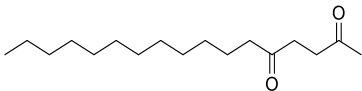
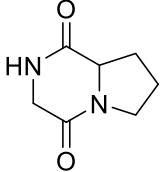
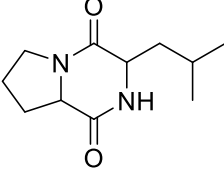
Figura 46- Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.



Fonte: Autoria própria.

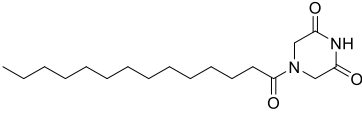
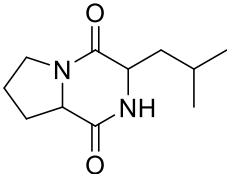
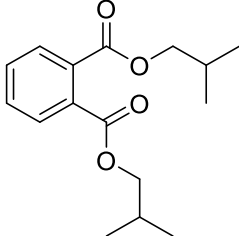
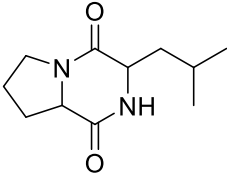
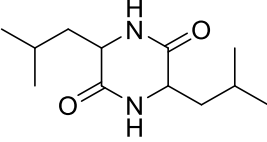
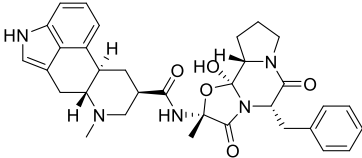
Na Tabela 13 estão contidos os nomes dos compostos (metabólitos) identificados através da análise de cromatografia a gás – espectrometria de massas, assim como suas estruturas, o tempo de retenção de cada um dos compostos na coluna SLB-5MS e a porcentagem de similaridade na respectiva biblioteca consultada através do banco de dados do equipamento. As condições de análise foram descritas na Seção 4.3.2 (p. 70).

Tabela 13- Compostos identificados por análise de CG-EM (IE, 70 eV) do caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C.

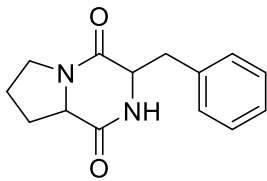
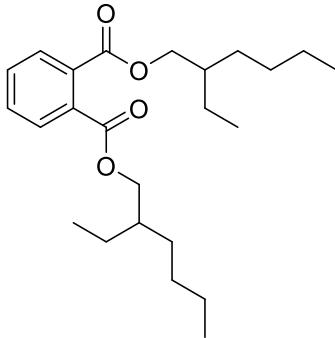
Compostos	Estrutura e nome dos compostos	Tempo de retenção (min)	Similaridade e (%)	Biblioteca
C1	 2-piperidinona	9,455	87	WILEY8.LIB
C2	 ftalato de dietila	17,790	97	NIST107.LIB
C3	 eicosano	19,765	92	NIST05s.LIB
C4	Estrutura não fornecida. 7-amino-1,4-dimetilpirimido(4,5-C)-piridazina-3,5-(1H, 2H)-diona	19,975	69	WILEY8.LIB
C5	 3-(2-pirrolidinil) ácido propanóico	20,340	78	WILEY8.LIB
C6	 2,5-heptadecadiona	20,595	79	NIST05.LIB
C7	Estrutura não fornecida. 2-isopropil-2,5-dimetilciclohexanona-6,6-D2	20,775	77	WILEY8.LIB
C8	 pirrolo(1,2a)pirazina-1,4-diona, hexa-hidro	21,210	93	NIST05.LIB
C9	 pirrolo(1,2a)pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)	22,210	84	NIST05.LIB

Continua

Continuação

Compostos	Estrutura e nome dos compostos	Tempo de retenção (min)	Similaridade e (%)	Biblioteca
C10	 <p>4-tetradecanoil-2,6-piperazinadiona</p>	22,575	75	WILEY8.LIB
C11	 <p>pirrolo(1,2a)pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)</p>	22,680	85	NIST05.LIB
C12	 <p>1,2-ácido dicarboxílico benzeno bis (2-metilpropil) ester</p>	22,780	88	WILEY8.LIB
C13		23,830	88	NIST05.LIB
C14		24,130	91	NIST05.LIB
C15		24,295	91	NIST05.LIB
C16	pirrolo(1,2a) pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil)	24,375	79	NIST107.LIB
C17	 <p>2,5- piperazinadiona,3,6-bis (2-metilpropil)</p>	27,890	88	NIST107.LIB
C18	 <p>ergotaman-3',6',18-triona,9,10-di-hidro-12'-hidroxi-2'-metil-5'-(fenilmetil)-,(5'.alfa,10.alfa)</p>	30,365	86	NIST05.LIB

Continua

				Conclusão
Compostos	Estrutura e nome dos compostos	Tempo de retenção (min)	Similaridade e (%)	Biblioteca
C19	 <p>pirrolo (1,2a) pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(fenilmetil)</p>	30,975	90	NIST107.LIB
C20	 <p>1,2-ácido dicarboxílico benzeno, bis (2-etilhexil) ester</p>	32,640	78	WILEY8.LIB

Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados da Tabela 13, observou-se que muitos metabólitos apresentaram o grupo amida, tais como os compostos C1, C8, C9-C11, C13-C19 o que está em acordo com o alto teor de proteínas totais encontrado no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e com as proteínas verificadas na análise de eletroforese. Além disso, verificou-se a presença do grupo carboxila em alguns compostos, o que possivelmente favorece a síntese das NPs-ZnO já que o zinco possui uma alta afinidade por grupos carboxilas.

Os dados obtidos por CG-EM confirmaram também a presença dos grupos funcionais identificados nas análises por RMN de ^1H e ^{13}C . Por exemplo, os grupos ésteres foram verificados nos compostos C2, C12 e C20 (Tabela 13). Porém, estes três compostos são derivados de ftalatos, um contaminante comum oriundo de tampas plásticas utilizadas para vedar solventes orgânicos. Desta forma, os sinais referentes aos possíveis grupos ésteres podem ser atribuídos a estes derivados de ftalatos.

Corroborando com os sinais característicos de hidrogênios aromáticos do RMN ^1H , foram encontrados anéis aromáticos nos compostos C2, C12, C18-C20. Destaca-se que dentre esses compostos aromáticos, apenas o C18 e o C19 são possíveis metabólitos produzidos e liberados pela bactéria *B. megaterium* RF1C, pois os demais podem ser derivados de ftalatos.

Os grupos metilas (CH₃) e os carbonos carbonílicos (C=O) identificados nos espectros de RMN de ¹³C foram verificados na maioria dos metabólitos por CG-EM. Também foram encontrados carbonos ligados a grupos retiradores de elétrons como N e O em diversos compostos. Notou-se a presença de cadeias longas, com os grupos CH₂ nos compostos C3, C6 e C10, corroborando com os diversos grupos metilênicos encontrados no RMN de ¹³C- DEPT 135°.

É interessante observar a recorrência de estruturas bastante semelhantes entre os compostos C9, C11 e C13-C16, que também se assemelharam às estruturas dos compostos C8 e C19. Nelas houve a presença do grupo amida, muito presente nas proteínas. Esta interpretação levou a sugerir que o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C tinha uma composição com alta afinidade pelos íons Zn²⁺.

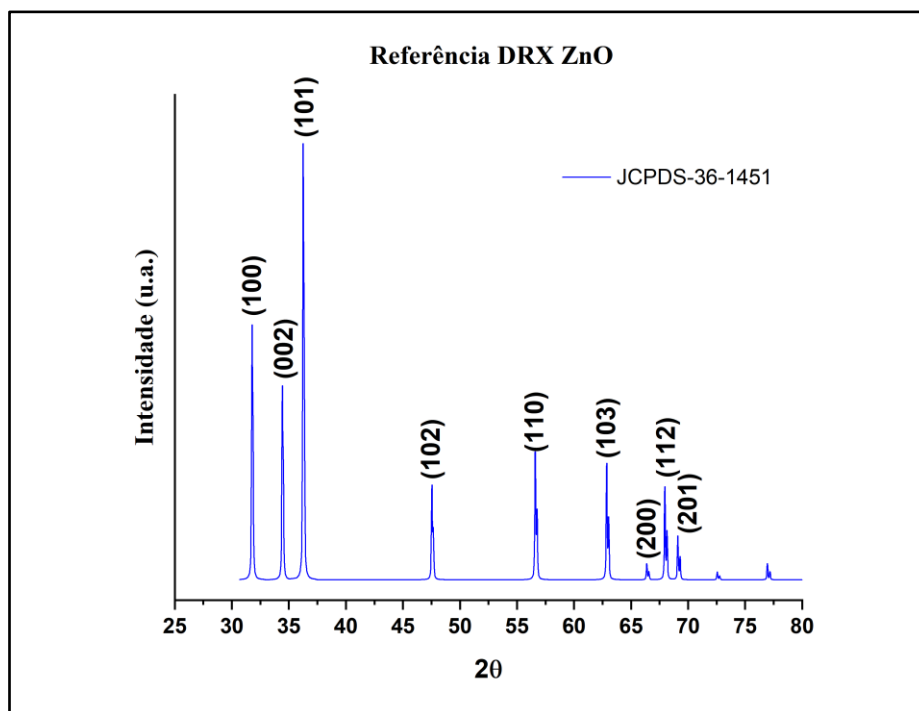
RESULTADO E DISCUSSÃO DA PARTE EXPERIMENTAL II

➤ Considerações gerais

As lavagens das NPs-ZnO obtidas nas sínteses das Seções 5.1 (p. 81), 5.2 (85) e 5.3 (p. 94) foram realizadas com água deionizada esterilizada com a finalidade de remover o excesso de íons Na⁺ e NO₃⁻ provenientes do ajuste de pH (feito com solução de NaOH a 1 M) e do sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O, respectivamente. Possivelmente, pode ter removido alguns componentes da matéria orgânica e sais do meio de cultura, provenientes do *caldo de síntese*.

Nas análises de DRX, os difratogramas provenientes das sínteses das NPs-ZnO foram comparados com o difratograma de referência de cristais de ZnO (JCPDS-36-1451) do banco de dados JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) (Figura 47). Os picos proeminentes em 2θ 31,8°, 34,4°, 36,3°, 47,5°, 56,6°, 63,0°, 66,4°, 68,1° e 69,4° correspondem aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina wurtzita do ZnO do difratograma de referência.

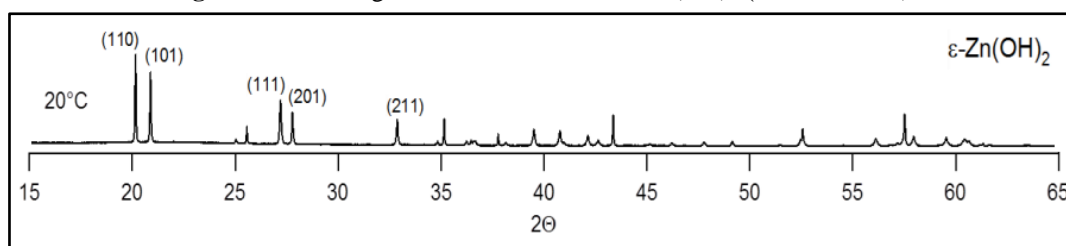
Figura 47- Difratoograma de referência do ZnO de estrutura cristalina hexagonal wurtzita.



Fonte: Autoria própria.

Nos difratogramas das *Sínteses 1-8* foram comumente encontrados picos que não corresponderam aos planos cristalográficos do ZnO. De acordo com alguns estudos, como o de NICHOLAS (2011), estes outros picos foram atribuídos aos planos cristalográficos do ϵ -Zn(OH)₂ (Figura 48) cuja fonte foi o banco de dados *Inorganic Crystal Structures Databases - ICSD #50447*.

Figura 48- Difratoograma de referência do ϵ -Zn(OH)₂ (ICSD #50447).



Fonte: Modificado de NICHOLAS (2011).

No **Apêndice A** estão os cálculos feitos para a obtenção do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO, a partir dos picos obtidos das análises de DRX, usando a equação de Debye-Scherrer (**Equação 8**, p. 71).

No final de cada síntese, a primeira evidência de que foram obtidas as NPs-ZnO foi o aspecto visual branco leitoso da suspensão.

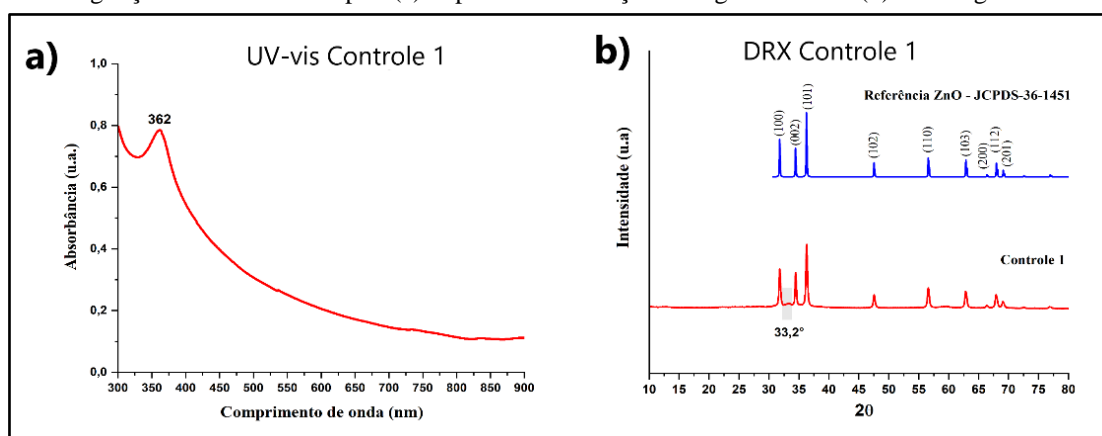
6.2 Controles

6.2.1 Controle 1 – sem matéria orgânica

Para o **Controle 1**, sem a presença de matéria orgânica, foi feita uma síntese de ZnO sem a utilização do *caldo de síntese*. A síntese foi realizada com 4 mL de água deionizada esterilizada e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na concentração de 0,32 M em pH 8,0 e permaneceu por 24 h à temperatura de 32°C em agitação de 150 rpm no shaker.

A Figura 49 mostra os resultados referentes às análises de UV-vis e DRX.

Figura 49- Espectro de absorção na região UV-vis e difratograma do **Controle 1** sintetizado com 4 mL de água deionizada esterilizada e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M) em pH 8,0, 24 h, 32°C e agitação orbital em 150 rpm. (a) Espectro de absorção na região UV-vis. (b) Difratograma.



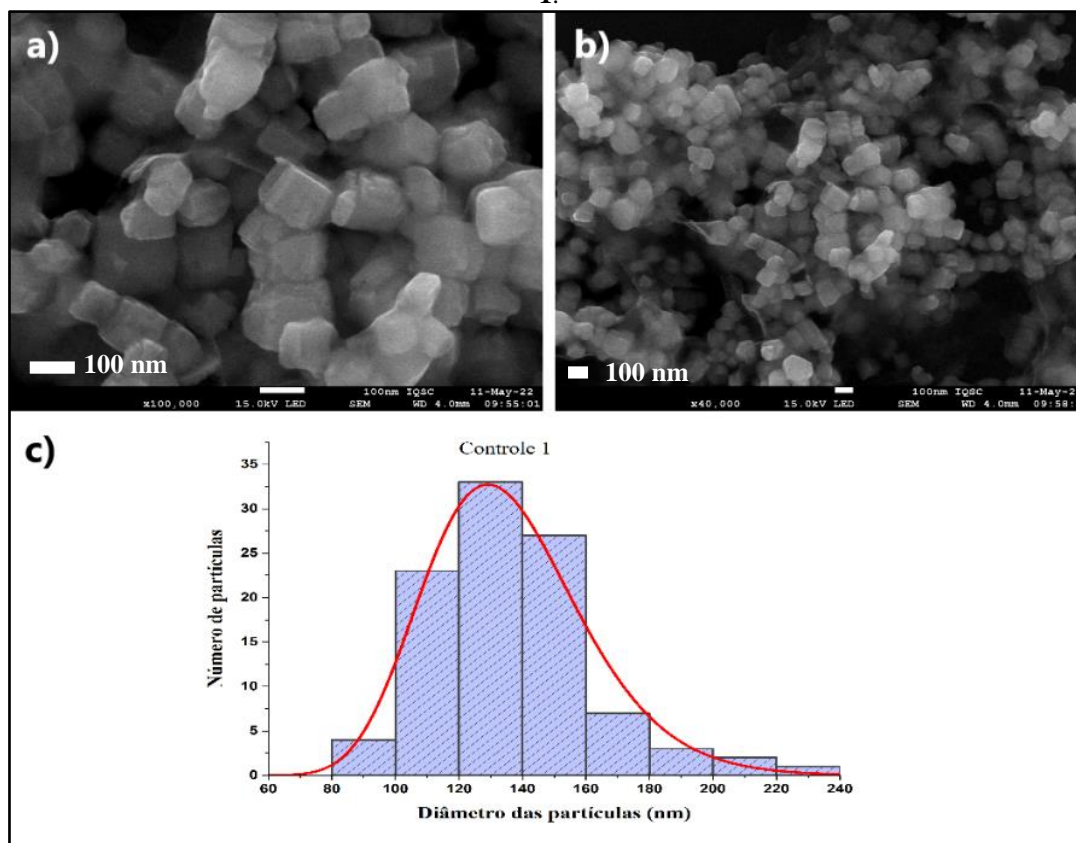
Fonte: Autoria própria.

No espectro de UV-vis (Figura 49a.) observou-se uma banda com máximo de absorção em 362 nm, que poderia ser atribuída à formação do ZnO. No difratograma (Figura 49b.) as difrações observadas nos picos em 31,7°, 34,4°, 36,2°, 47,7°, 56,8°, 62,9°, 66,4°, 68,2° e 69,3° corresponderam aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina wurtzita do ZnO do difratograma de referência JCPDS-36-1451. Foi observado um pico em 33,2° que não correspondeu aos planos cristalográficos do ZnO, mas que foi atribuído ao plano (211) do $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$ (Figura 48).

O tamanho médio do cristalito calculado do **Controle 1**, usando a equação de Debye-Scherrer com base na largura-a-meia-altura dos picos fornecidos pelo difratograma foi 27 ± 3 nm.

A fim de verificar o tamanho do grão de ZnO obtido foi feita uma análise de microscopia eletrônica de varredura do material (Figura 50).

Figura 50- Controle 1 sintetizado com 4 mL de água deionizada esterilizada e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker. (a) MEV com aumento de 100.000X. (b) MEV com aumento de 40.000X. (c) Histograma referente ao tamanho dos grãos obtidos no **Controle 1**.



Fonte: Autoria própria.

O tamanho médio dos grãos foi de 136 ± 26 com coeficiente de variação de 19%. Pela observação do histograma (Figura 50c.) notou-se que a maioria dos grãos apresentaram tamanho acima de 100 nm. Comparando o tamanho médio do grão com o tamanho médio do cristalito calculado (27 ± 3 nm) foi possível sugerir que o ZnO obtido no **Controle 1** foi um policristal, ou seja, grãos contendo mais de um cristalito.

Com base no exposto acima, foi possível constatar que através da síntese do **Controle 1**, feita na ausência do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, obteve-se o ZnO, mas não em tamanhos nanométricos (< 100 nm).

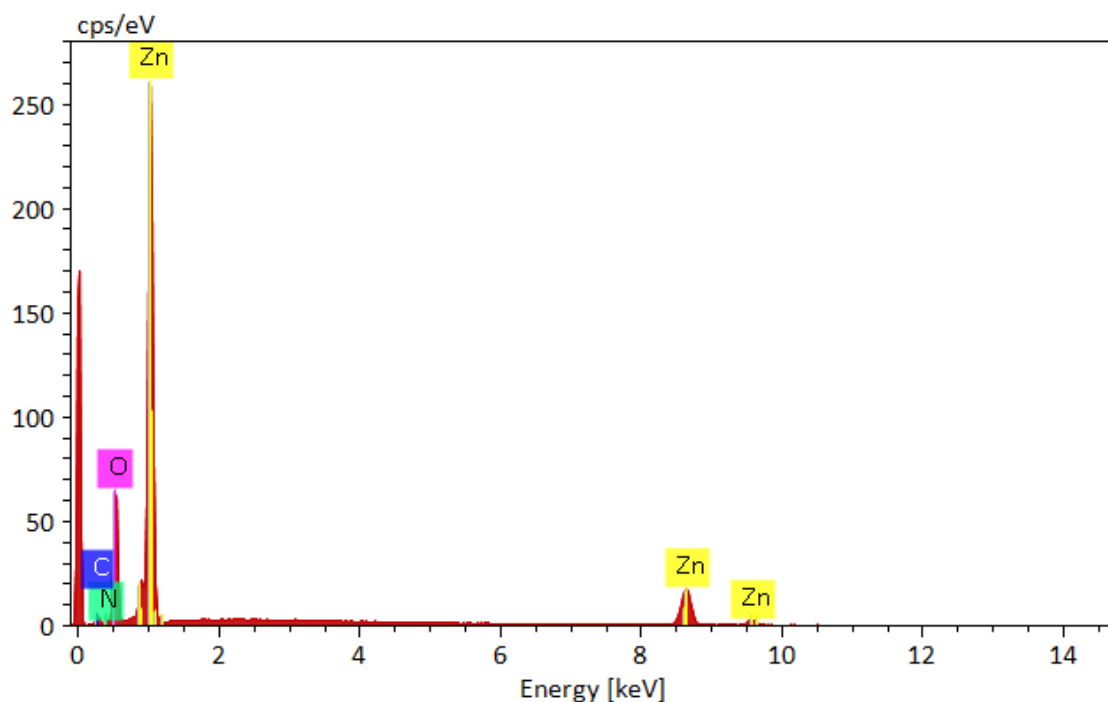
A fim de verificar a constituição elementar das partículas de ZnO obtidas na síntese do **Controle 1**, foram feitas as análises de EDS e Elementar. A análise de EDS foi feita em três regiões distintas, a Figura 51 mostra o espectro obtido em uma das regiões, as outras duas podem ser vistas no **Apêndice C**. Como pôde ser observado, além dos elementos Zn e O, que eram esperados, houve também a presença dos elementos C e N.

Como mostrado na Tabela 14, os coeficientes de variação dos elementos Zn (2,65%), O (1,88%) e C (2,04%) presentes nas partículas de ZnO do **Controle 1** foram baixos, indicando uma boa homogeneidade da amostra. A porcentagem de N ($1,15 \pm 0,33$

%) foi pequena, no entanto a de C ($13,04 \pm 0,27$ %) foi considerável. Nas NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*, onde foi usado *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, rico em proteínas, a porcentagem de C foi de $15,68 \pm 1,76$ % (Seção 6.4.8 p. 186). Este teor considerável de C pode ser explicado pela realização da análise. O pó das partículas de ZnO do **Controle 1**, não era suficiente para fazer uma pastilha, então ele foi colocado sobre uma fita de carbono. Assim, pode-se sugerir que o C da fita pode ter contribuído para um maior teor de C obtido na análise.

Foi possível notar que a proporção atômica de Zn e O nas partículas de ZnO do **Controle 1** não foi de 1:1. Além do ZnO não ter uma proporção estequiométrica de 1:1, o O também pode ser proveniente de outras fontes, como foi abordado na Seção 6.4.9 (p. 188).

Figura 51 - Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) das NPs-ZnO obtidas na síntese do **Controle 1** realizada com 4 mL de água deionizada e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, 32°C, 24 h a 150 rpm no shake.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 14 - EDS, % atômica dos elementos nas partículas de ZnO obtidas no **Controle 1**.

Elemento	Região 1		Região 2		Região 3		% Atômica média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
	% Atômica	Erro (%)	% Atômica	Erro (%)	% Atômica	Erro (%)			
Zn	36,78	9,20	34,91	8,75	35,59	9,06	35,76	0,95	2,65
O	49,12	2,95	51,00	3,02	50,02	3,03	50,05	0,94	1,88
C	12,79	0,80	13,32	0,82	13,01	0,82	13,04	0,27	2,04
N	1,30	0,22	0,77	0,21	1,38	0,23	1,15	0,33	28,83

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 15 mostra os resultados da análise elementar.

Tabela 15 – Análise Elementar das partículas de ZnO do **Controle 1**, porcentagem dos elementos N, C e H.

Partículas de ZnO do Controle 1						
Elemento	Análise 1 (% m/m)	Análise 2 (% m/m)	Análise 3 (% m/m)	Média (% m/m)	Desvio padrão (%)	Coefficiente de variação (%)
N	0,157024	0,156877	0,128919	0,147607	0,016184	10,9641
C	1,532681	1,512575	1,519359	1,521538	0,010229	0,6723
H	1,135088	1,186102	1,15598	1,159056	0,025646	2,2126

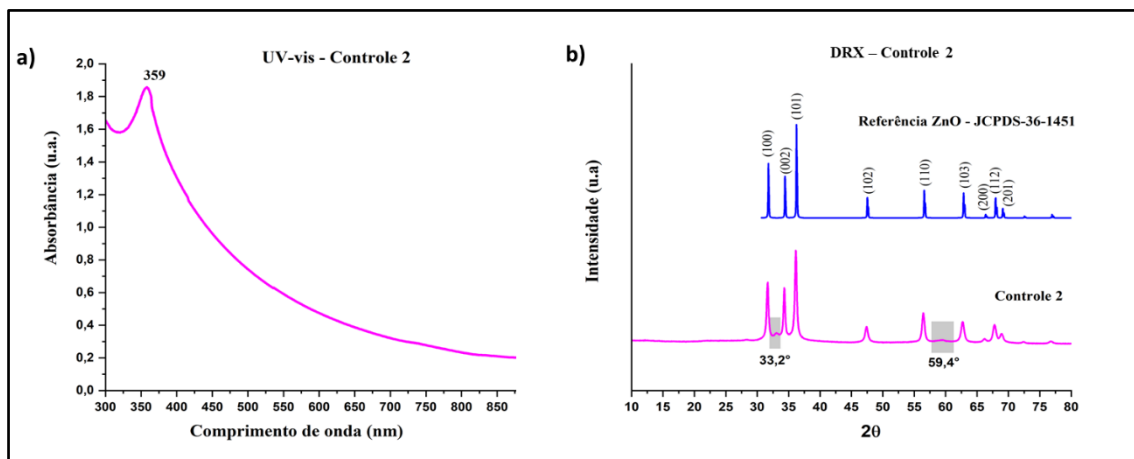
Fonte: Autoria própria.

A análise elementar está em acordo com a espectroscopia de energia dispersiva (EDS), indicando a presença de C e N na amostra, sendo a porcentagem de N bastante pequena. Também apresentou a presença de H.

6.2.2 Controle 2 – síntese feita com o caldo nutriente

O *caldo de síntese* utilizado na obtenção das NPs-ZnO, após o cultivo da bactéria pode ainda ter resquícios dos constituintes do caldo nutriente, portanto foi feito este controle. A Figura 52 mostra o espectro de absorção na região do ultravioleta-visível e o difratograma do **Controle 2**. As condições de síntese foram as mesmas do **Controle 1**.

Figura 52- Espectro de absorção na região UV-vis e difratograma do **Controle 2** sintetizado com 4 mL de caldo nutriente esterilizado e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C e agitação orbital em 150 rpm. (a) Espectro de absorção na região UV-vis. (b) Difratograma.



Fonte: Autoria própria.

No espectro de UV-vis, Figura 52a, observou-se uma banda com o máximo de absorção em 359 nm, que poderia ser atribuída à formação do ZnO. O difratograma da Figura 52b, confirmou a formação de ZnO através das difrações observadas nos picos em 31,69°, 34,36°, 36,22°, 47,69°, 56,76°, 62,9°, 66,37°, 68,24° e 69,30° que correspondem

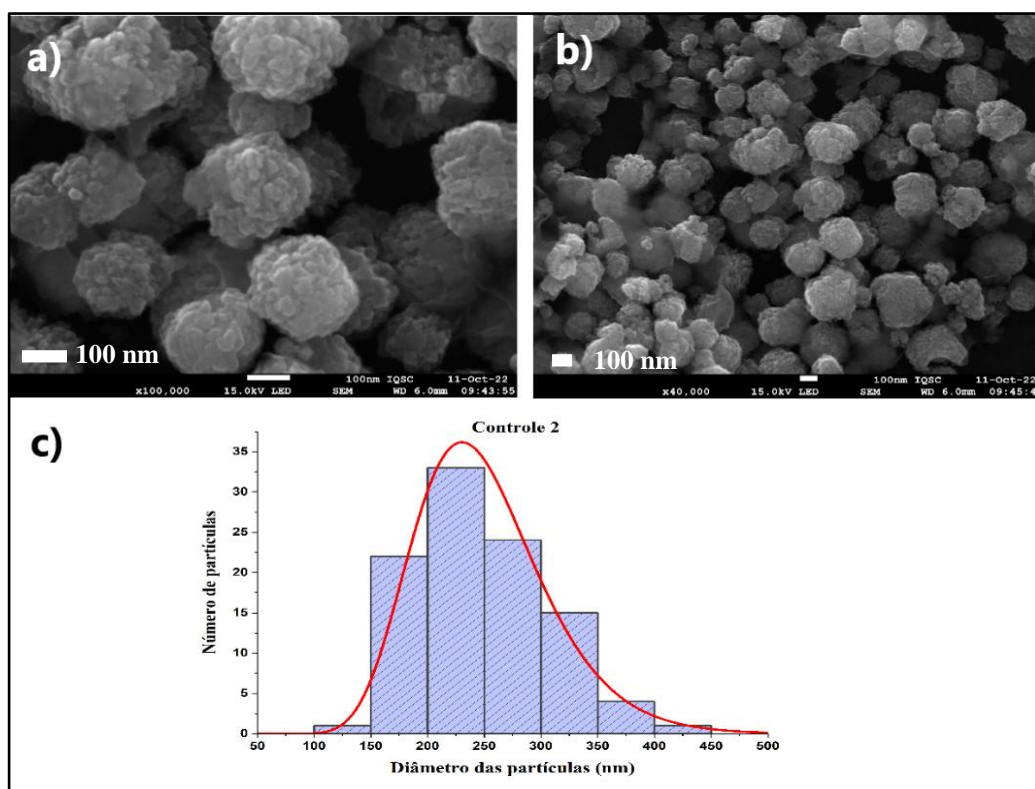
aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina wurtzita do ZnO do difratograma de referência JCPDS-36-1451.

Os outros dois picos observados em $33,2^\circ$ e $59,4^\circ$ permitiu sugerir a presença de ϵ -Zn(OH)₂, conforme o difratograma de referência - ICSD #50447 (Figura 48, p. 114).

O tamanho médio do cristalito, calculado através da equação de Debye-Scherrer, com base na largura-a-meia-altura dos picos fornecidos pelo difratograma foi de 19 ± 5 nm.

Para verificar o tamanho das partículas obtidas no **Controle 2**, foi feita uma análise de microscopia eletrônica de varredura do material (Figura 53).

Figura 53- Controle 2 sintetizado com 4 mL de caldo nutriente esterilizada e o sal precursor de Zn(NO₃)₂·6H₂O (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker. (a) MEV com aumento de 100.000X. (b) MEV com aumento de 40.000X. (c) Histograma referente ao tamanho dos grãos obtidos no **Controle 2**.



Fonte: Autoria própria.

Como pôde ser observado no histograma (Figura 53c.) as partículas obtidas no **Controle 2** apresentaram tamanhos acima de 100 nm. O tamanho médio dos grãos foi de 250 ± 58 nm com coeficiente de variação de 23%.

Comparando o tamanho do cristalito de 19 ± 5 nm, com o tamanho do grão, 250 ± 58 nm, observou-se que o grão foi aproximadamente 13X maior do que o cristalito, sendo provavelmente um policristal.

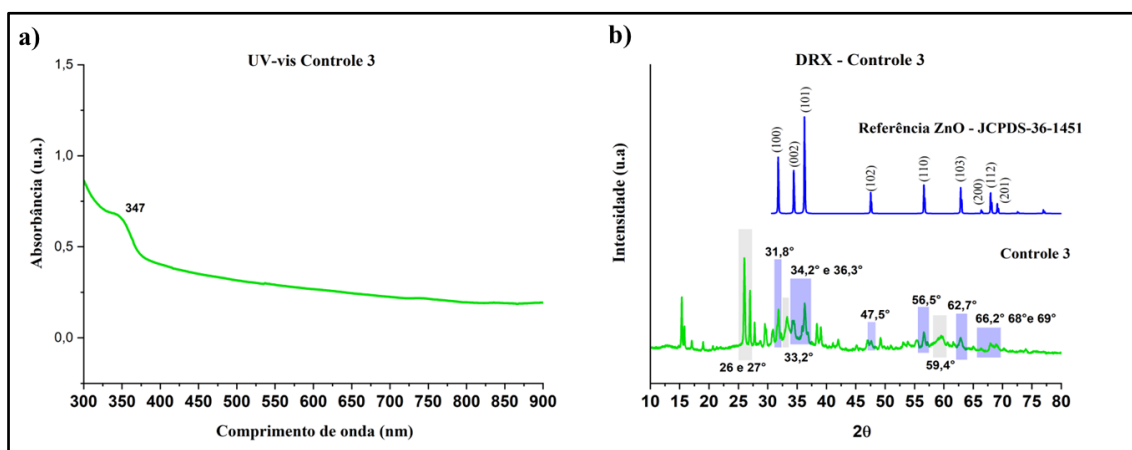
De acordo com o exposto, pôde-se inferir que na síntese do **Controle 2** foi possível a obtenção do ZnO, porém não em tamanho suficiente para ser classificado como um material nanométrico (<100 nm).

6.2.3 Controle 3 – síntese com o caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C previamente autoclavado

Conforme inferido na Seção 6.1, o *caldo de síntese*, usado nas *Sínteses 1-8* para a obtenção das NPs-ZnO, contém vários tipos de compostos orgânicos. Na Seção 6.1.3 (p. 100) foi verificado ainda que havia uma quantidade significativa de proteínas nele. Assim, para analisar a importância das proteínas na obtenção das NPs-ZnO, realizou-se o processo de autoclavagem a 120°C para desnaturá-las. As condições de síntese foram as mesmas do **Controle 1**.

A Figura 54 ilustra o espectro UV-vis e o difratograma do **Controle 3**.

Figura 54- Espectro de absorção na região UV-vis e difratograma do **Controle 3** sintetizado com 4 mL de *caldo de síntese* autoclavado e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C e agitação orbital em 150 rpm.



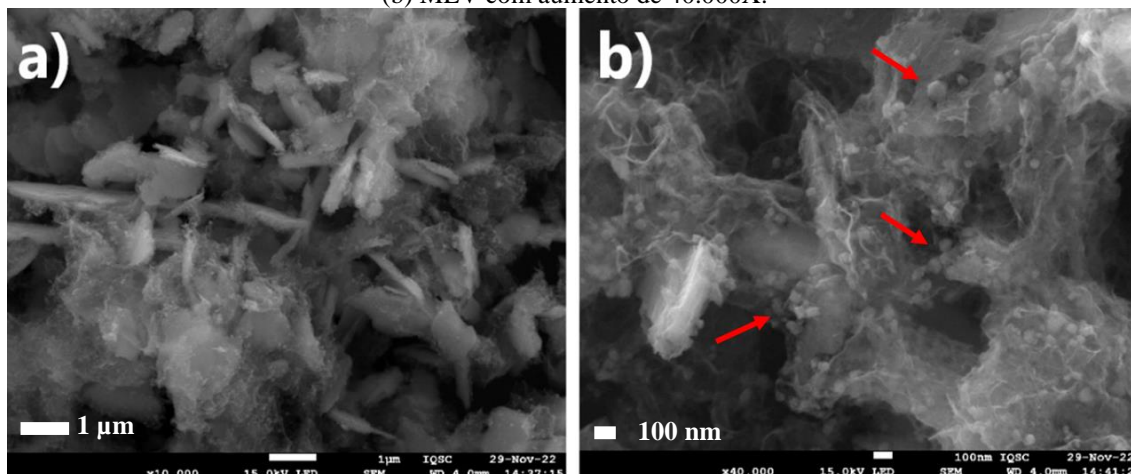
Fonte: Autoria própria.

No espectro de UV-vis (Figura 54) observou-se uma banda com o máximo de absorção em 347 nm, que poderia ser devido à absorção de radiação pelo ZnO. O difratograma do **Controle 3**, apresentou vários picos, alguns que poderiam ser atribuídos à presença de ZnO, outros à presença do $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$ e, ainda, alguns outros não identificados.

Os picos em 26°; 27°; 33,2° e 59,4° poderiam ser atribuídos aos planos cristalinos do $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$ e os picos em 31,8°; 34,2°; 36,3°; 47,5°; 56,5°; 62,7°; 66,24°; 68° e 69°; poderiam ser atribuídos aos planos (100) (002) (101) (102) (110) (103) (200) (112) e (201) do ZnO. Assim, a absorção de energia em 347 nm, no espectro de UV-vis poderia ser devido à absorção por estes dois tipos de materiais formados.

Foi realizada uma microscopia do **Controle 3** (Figura 55) para verificar o aspecto do material obtido.

Figura 55- MEV do **Controle 3** sintetizado com 4 mL de *caldo de síntese* autoclavado e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker. (a) MEV com aumento de 10.000X. (b) MEV com aumento de 40.000X.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 55a. notou-se a presença de um material lamelar característico do hidróxido de zinco. Na Figura 55b. foi possível notar algumas partículas soltas que sugeriram ser partículas de ZnO. Aparentemente, estas partículas apresentaram um tamanho menor do que 100 nm. Estes resultados estão em acordo com o difratograma da Figura 54 onde houve a obtenção de picos dos planos cristalinos tanto do $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$, quanto do ZnO.

6.3 Sínteses das NPs-ZnO – sínteses sem o ajuste de pH

6.3.1 Síntese 1 – Estudos da variação da concentração do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

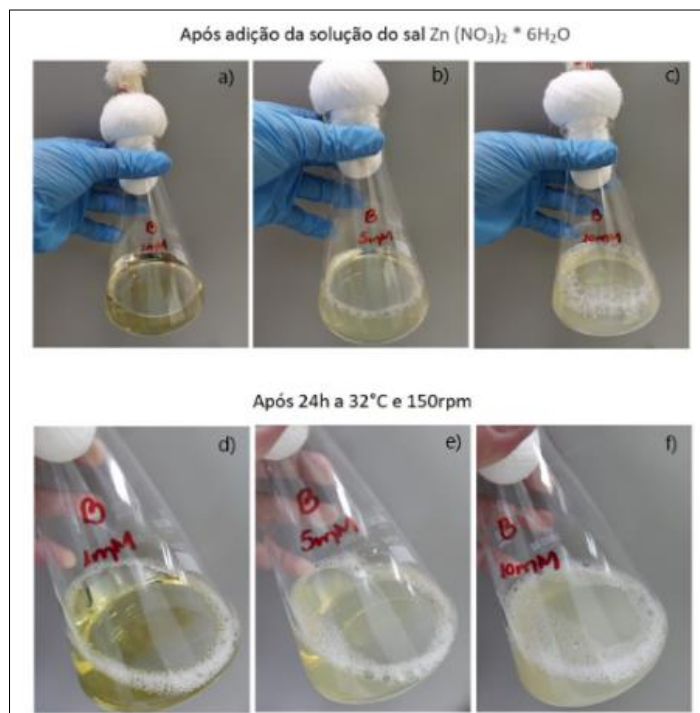
6.3.1.1 Aspecto visual

Na *Síntese 1* foram utilizadas três bactérias de forma distinta *B. megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycoides* 2RF2C empregando três concentrações do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (*Síntese 1.1* - 1 mM, *Síntese 1.2* - 5 mM e *Síntese 1.3* - 10 mM). Estas sínteses tiveram como finalidade verificar com qual(is) bactéria(s) seria(m) possível(eis) obter as NPs-ZnO.

O aspecto do *caldo de síntese*, logo após a adição da solução do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e após 24 h de síntese, para as bactérias *B. megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycoides* 2RF2C estão ilustrados nas Figuras 56-

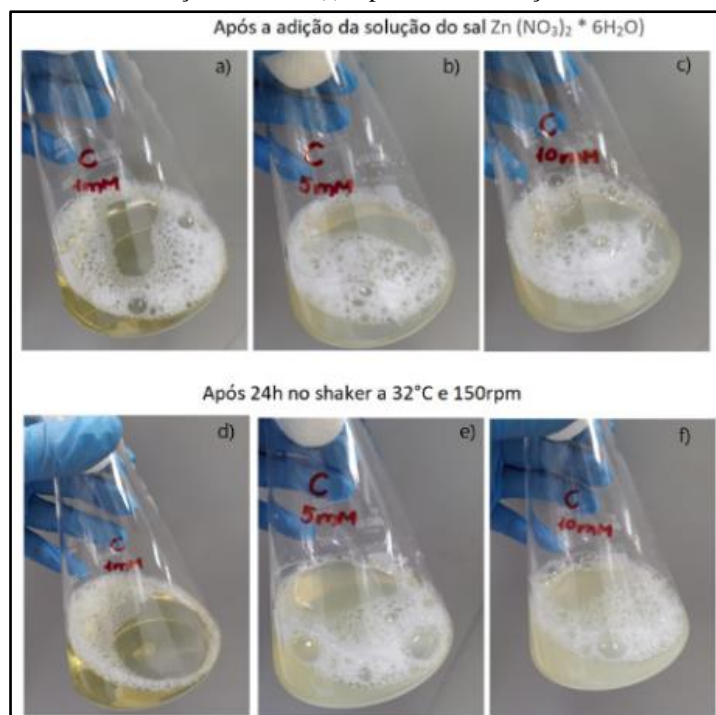
58, respectivamente. Na Tabela 16 está compilado o aspecto visual do meio reacional obtido após 24 h, para cada uma das sínteses.

Figura 56- Síntese 1 realizada com o caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (a) Síntese 1.1 - após a adição do sal - 1 mM. (b) Síntese 1.2 - após a adição do sal - 5 mM. (c) Síntese 1.3 - após a adição do sal - 10 mM. (d) Após 24 h de reação - 1 mM. (e) Após 24 h de reação - 5 mM. (f) Após 24 h de reação - 10 mM.



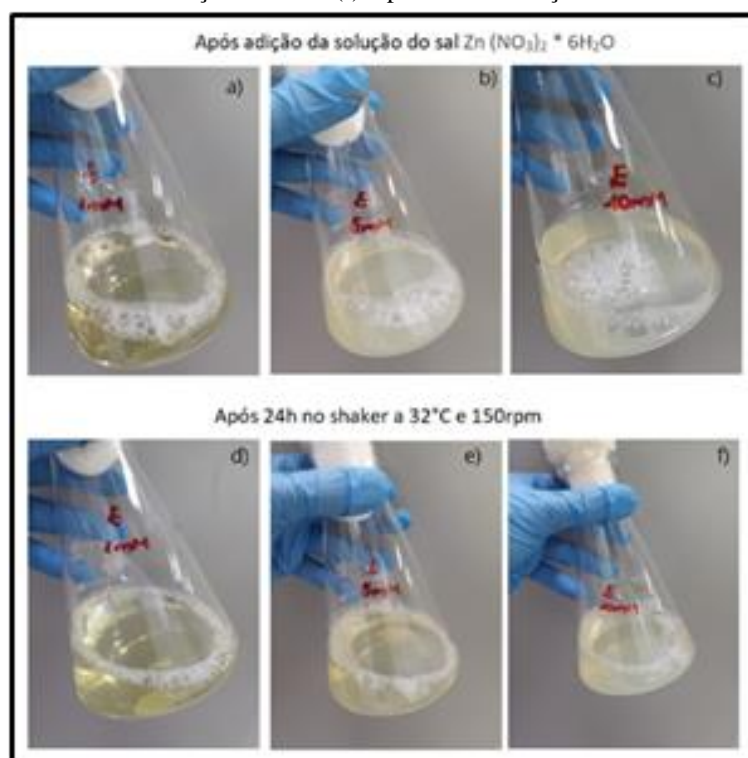
Fonte: Autoria própria.

Figura 57- Síntese 1 realizada com o caldo de síntese da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (a) Síntese 1.1 - após a adição do sal - 1 mM. (b) Síntese 1.2 - após a adição do sal - 5 mM. (c) Síntese 1.3 - após a adição do sal - 10 mM. (d) Após 24 h de reação - 1 mM. (e) Após 24 h de reação - 5 mM. (f) Após 24 h de reação - 10 mM.



Fonte: Autoria própria.

Figura 58- Síntese 1 realizada com o caldo de síntese da bactéria *B. pseudomycoides* 2RF2C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (a) Síntese 1.1 - após a adição do sal -1 mM. (b) Síntese 1.2 - após a adição do sal - 5 mM. (c) Síntese 1.3 - após a adição do sal - 10 mM. (d) Após 24 h de reação - 1 mM. (e) Após 24 h de reação - 5 mM. (f) Após 24 h de reação - 10 mM.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 16- Aspecto visual das Sínteses 1.1, 1.2 e 1.3, após 24 h, feita com as bactérias, distintamente (*B. megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycoides* 2RF2C), usando três concentrações distintas do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$.

Síntese	Caldo de síntese utilizado	Concentração final do sal precursor $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (mM)	Aspecto da síntese após 24 h
1.1	<i>B. megaterium</i> RF1C	1	Límpida
1.1	<i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C	1	Límpida
1.1	<i>B. pseudomycoides</i> 2RF2C	1	Límpida
1.2	<i>B. megaterium</i> RF1C	5	Turva
1.2	<i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C	5	Turva
1.2	<i>B. pseudomycoides</i> 2RF2C	5	Turva
1.3	<i>B. megaterium</i> RF1C	10	Turva
1.3	<i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C	10	Turva
1.3	<i>B. pseudomycoides</i> 2RF2C	10	Turva

Fonte: Autoria própria.

Após 24 h de síntese, a primeira evidência de obtenção das NPs-ZnO seria o aspecto visual de uma suspensão branca leitosa. No entanto, como pode ser visto nas Figuras 56-58, em nenhuma das sínteses realizadas, Sínteses 1.1, 1.2 e 1.3, com as três

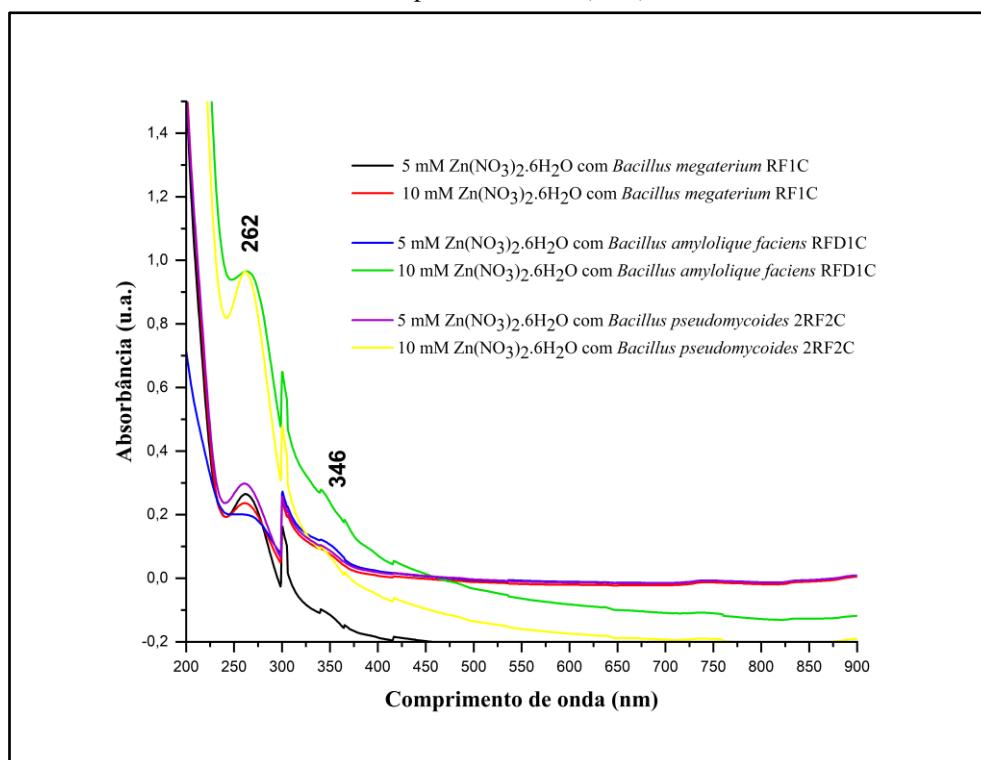
bactérias este aspecto foi obtido. Foi notado apenas uma turvação do meio, nas concentrações de 5 mM e 10 mM (Tabela 16), que permitiu sugerir a complexação dos íons Zn^{2+} com a água e / ou com os compostos orgânicos presentes, ou ainda a presença de pequenas quantidades de $Zn(OH)_2$ e / ou das NPs-ZnO. Assim, foi realizada análise de UV-vis e DRX para verificar a formação de NPs-ZnO nas sínteses.

6.3.1.2. UV-vis

Após a centrifugação da *Síntese 1* feita com o *caldo de síntese* das três bactérias, de forma distinta e com o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ nas concentrações de 5 mM e 10 mM, o material obtido apresentou aspecto de uma massa sólida de coloração marrom clara. Foram realizadas análises de UV-vis deste material. A análise foi realizada com o material sem lavagem, foi feito apenas o descarte do sobrenadante e em seguida uma ressuspensão em água deionizada esterilizada.

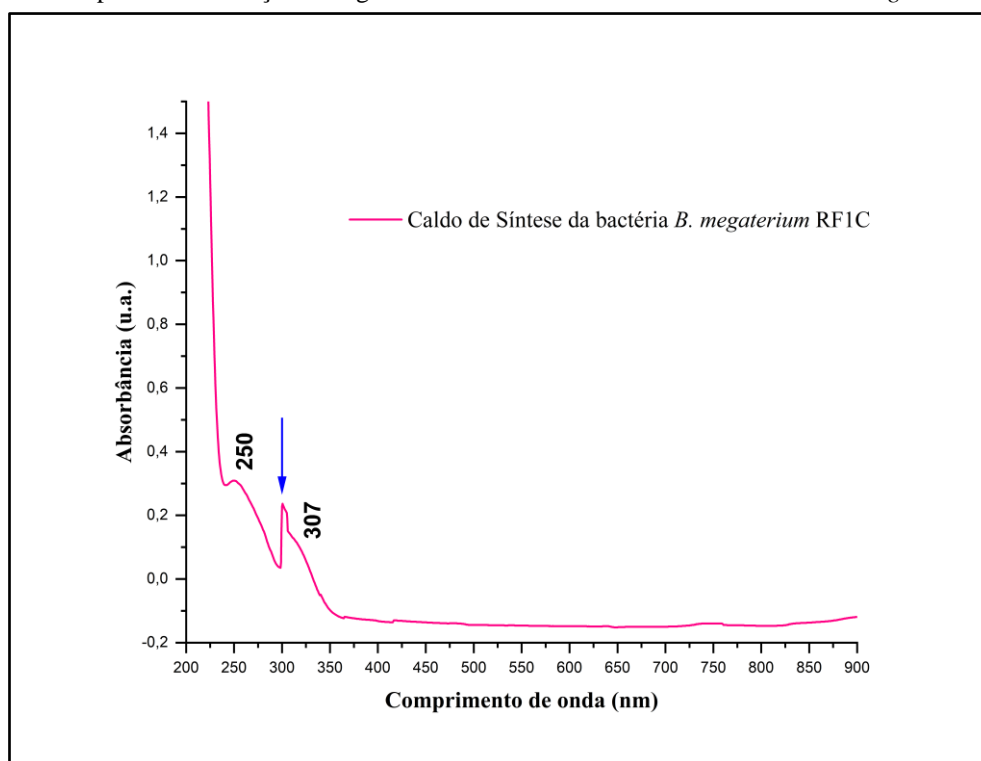
A Figura 59 mostra as bandas de absorção de radiação na região UV-vis pelo material formado nas *Sínteses* e a Figura 60 mostra a banda de absorção do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C o qual foi diluído por 20X.

Figura 59- Espectros de absorção na região UV-vis das amostras obtidas via *Síntese 1* feita com o *caldo de síntese* das bactérias *B. megaterium* RF1C, *B. amyloliquefaciens* RFD1C e *B. pseudomycoides* 2RF2C usando o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$.



Fonte: Autoria própria.

Figura 60- Espectro de absorção na região UV-vis do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C.



Fonte: Autoria própria.

Analisando os espectros da Figura 59, uma banda discreta com máximo de absorção em 346 nm foi observada nas sínteses realizadas na concentração de 5 mM do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ usando o *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C e com 10 mM do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ usando o *caldo de síntese* das bactérias *B. megaterium* RF1C e *B. pseudomycooides* 2RF2C.

No trabalho de SARAVANAN et al. (2018) as NPs-ZnO obtidas a partir do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, com diâmetro na faixa de 45-95 nm, apresentaram uma banda com máximo de absorção em 346 nm. Enquanto no trabalho de KUNDU et al. (2014) as NPs-ZnO obtidas a partir do sal de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, com diâmetro na faixa de 100-120 nm, apresentaram uma banda com máximo de absorção em 340 nm. Estes dados permitiram sugerir que a absorção de radiação no comprimento de onda de 346 nm pode ser devido a formação das NPs-ZnO. Para confirmar a obtenção das NPs-ZnO foi feita análise de DRX (Seção 6.3.1.3, p. 126).

Ainda nos espectros da Figura 59, foram observadas bandas com máximo de absorção em 262 nm e no espectro da Figura 60, absorbância nos comprimentos de onda em 250 e 307 nm. Estas bandas, possivelmente, foram devido à absorção de radiação por grupos funcionais (chamados cromóforos⁵) de compostos orgânicos provenientes do meio

⁵ Cromóforos: grupos funcionais que contêm elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas (SKOOG et al., 2002).

de cultura e/ou produzidos pela bactéria. Conforme foi descrito na Seção 6.1.3 (p. 100) verificou-se a presença de proteínas, lipídeos, açúcares, dentre outros compostos, no *caldo de síntese* utilizado nas *Sínteses 1*. A transição eletrônica das moléculas orgânicas, que ocorre entre os orbitais HOMO (de menor energia) e LUMO (de maior energia), em sua maioria acontecem na região ultravioleta visível.

Devido a complexidade do *caldo de síntese*, foi possível apenas fazer uma análise mais generalizada sobre o que se pode atribuir às bandas com absorção em 250, 262 e 307 nm. É preciso ainda considerar a presença de grupos auxocromos que podem aumentar ou diminuir a intensidade de absorção de radiação, assim como aumentar ou diminuir o comprimento de onda absorvido. Desta forma, na Tabela 17 foram sugeridos alguns possíveis grupos cromóforos que podem ter absorvido energia nos comprimentos de onda em 250, 262 e 307 nm. As literaturas consultadas para a obtenção dos dados da Tabela 17 foram SKOOG et al., 2002 e PAVIA et al., 2012.

Tabela 17- Características de absorção de alguns cromóforos isolados/comuns.

Cromóforo (classe)	λ (nm)	Tipo de transição
R ₂ CO	280	n→ π^*
RCOOH	205	n→ π^*
RCOOR'	205	n→ π^*
RCONH ₂	210	n→ π^*
Ar-NH ₂	230 - 280	-
Ar-COOH	230 - 273	-
Ar-COCH ₃	245,5	-
Ar-CHO	249,5	-
Ar-NO ₂	268,5	-
Enona simples	310 - 330	n→ π^*
Enona simples	220 - 250	π → π^*

Fonte: Autoria própria.

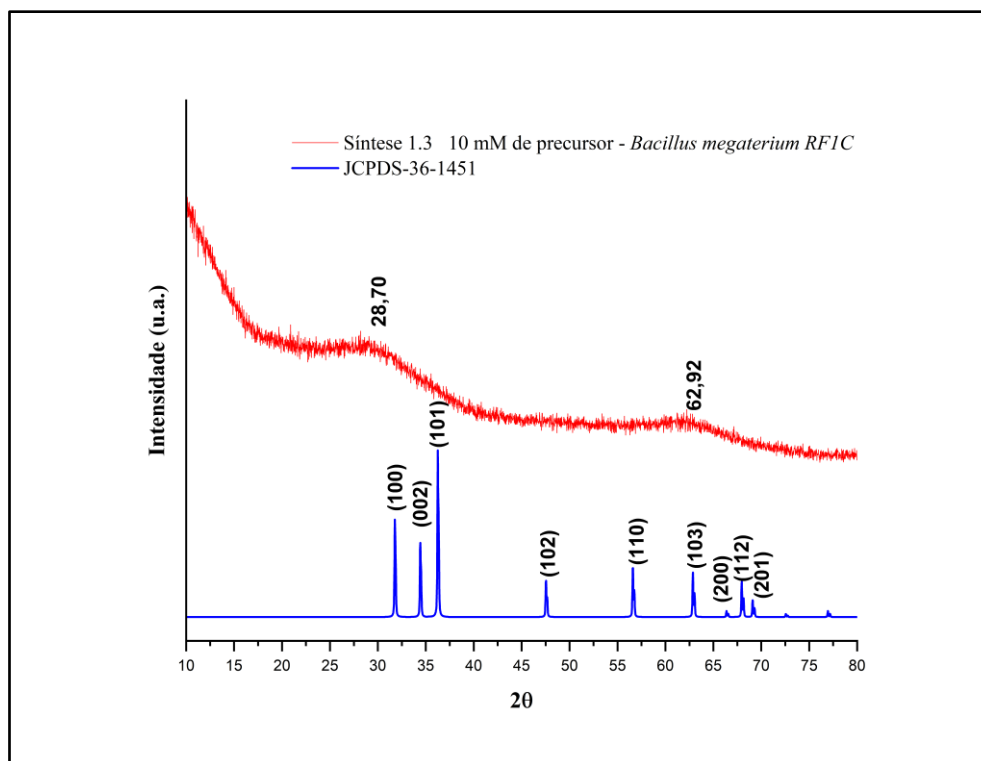
Tanto nos espectros da Figura 59 quanto no espectro da Figura 60, em 300 nm (destacado pela seta azul na Figura 60), foi observado um sinal que não é característico de uma banda de absorção no UV-vis. Possivelmente, o sinal em 300 nm foi devido a troca automática da lâmpada de Tungstênio-Halogênio (região do Visível) para a lâmpada de Deutério (região Ultravioleta) do equipamento.

6.3.1.3 Difração de raios-X

Foi realizada análise de difração de raios-X do material obtido na *Síntese 1*, na concentração de 10 mM do sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C (Figura 61), a fim de verificar se a banda discreta com

absorção em 346 nm, na análise de UV-vis, foi proveniente da absorção de energia pelas NPs-ZnO.

Figura 61- Difratoograma da *Síntese 1.3* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mM, 24 h).



Fonte: Autoria própria.

Foram observados no difratograma dois picos largos, em 28,7° e 62,9°. Os picos largos podem ser devido a presença de material amorfo ou de pequenas partículas, chamadas de sementes ou germes.

No difratograma de referência do $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$ (Figura 48, p. 114) obtido da literatura (NICHOLAS, 2011) cuja fonte foi o banco de dados *Inorganic Crystal Structures Databases* (ICSD #50447) há um pico em aproximadamente 28,7° o que permitiu sugerir a presença deste hidróxido na amostra.

O pico em 62,9° coincidiu com o plano cristalográfico (103) do ZnO, o que permitiu sugerir a presença de partículas bem pequenas das NPs-ZnO. No entanto, houve também um plano cristalográfico do $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$ próximo a 61,0°. Assim, o pico largo em 62,9° pode ser devido a presença de germes de NPs-ZnO e / ou de $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$.

Logo, foi possível sugerir que a banda obtida no espectro de UV-vis com absorção no comprimento de onda em 346 nm foi devido à absorção de energia tanto por sementes de NPs-ZnO quanto por sementes de $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$ (WANG et al., 2015).

Desta forma, é possível que se obteve NPs-ZnO na *Síntese 1.3* onde foi usada a solução de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mM com caldo da bactéria *B. megaterium* RF1C. No

entanto, visualmente, não foi possível observá-las, provavelmente pela pequena quantidade e pelo pequeno tamanho.

6.3.2 Síntese 2 – Estudo da variação da quantidade do caldo de síntese e aumentando da concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Após a *Síntese 1*, selecionou-se a bactéria *B. megaterium* RF1C para dar continuidade no estudo de obtenção das NPs-ZnO, pois no trabalho de SARAVANAN et al. (2018) foram obtidas NPs-ZnO usando o *caldo de síntese* de uma linhagem desta bactéria.

De acordo com a literatura apresentada na Seção 1.4.3 (p. 48) e com ATKINS et al. (2008) os estabilizantes evitam o crescimento das nanopartículas. Os constituintes orgânicos (proteínas, lipídeos etc.) presentes no *caldo de síntese*, devem apresentar esta função de evitar o crescimento e a aglomeração das nanopartículas.

Desta forma, realizou-se um conjunto de experimentos na *Síntese 2* reduzindo a quantidade de *caldo de síntese*, a fim de favorecer o crescimento das NPs-ZnO. Usou-se a proporção de 2:1 na *Síntese 2.1* (100 mL do *caldo de síntese*: 50 mL de solução do sal precursor a 10 mM) e 1:1 na *Síntese 2.2* (50 mL do *caldo de síntese*: 50 mL de solução do sal precursor a 10 mM).

A proporção entre o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e a solução precursora do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ teve como base os estudos de JAYASEELAN et al. (2012), SELVARAJAN et al. (2013), ZAHRANI et al. (2018), SINGH et al. (2014) e RAJABAIRAVI et al. (2017). O tempo de síntese foi de 48 h, a fim de verificar se a obtenção das NPs-ZnO ocorreria em um período mais longo.

Na *Síntese 2.3* usou-se a proporção 1:1 entre o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e a solução precursora do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. No entanto, a fim de favorecer a nucleação (discutida na Seção 1.4.2, p. 47) aumentou-se a concentração do sal precursor para 0,32 M. Esta concentração teve como referência o trabalho de PRASAD e JHA (2009).

6.3.2.1 Aspecto visual

A Tabela 18 apresenta o aspecto visual de cada uma das sínteses (*Sínteses 2.1, 2.2 e 2.3*).

Tabela 18- Aspecto visual das *Sínteses 2.1, 2.2 e 2.3* após a adição do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e após 48 h de síntese.

<i>Síntese</i>	Aspecto visual	
	Após adição do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Após 48 h de síntese
2.1	Límpido	Límpido
2.2	Turvo	Turvo
2.3	Turvo	Turvo

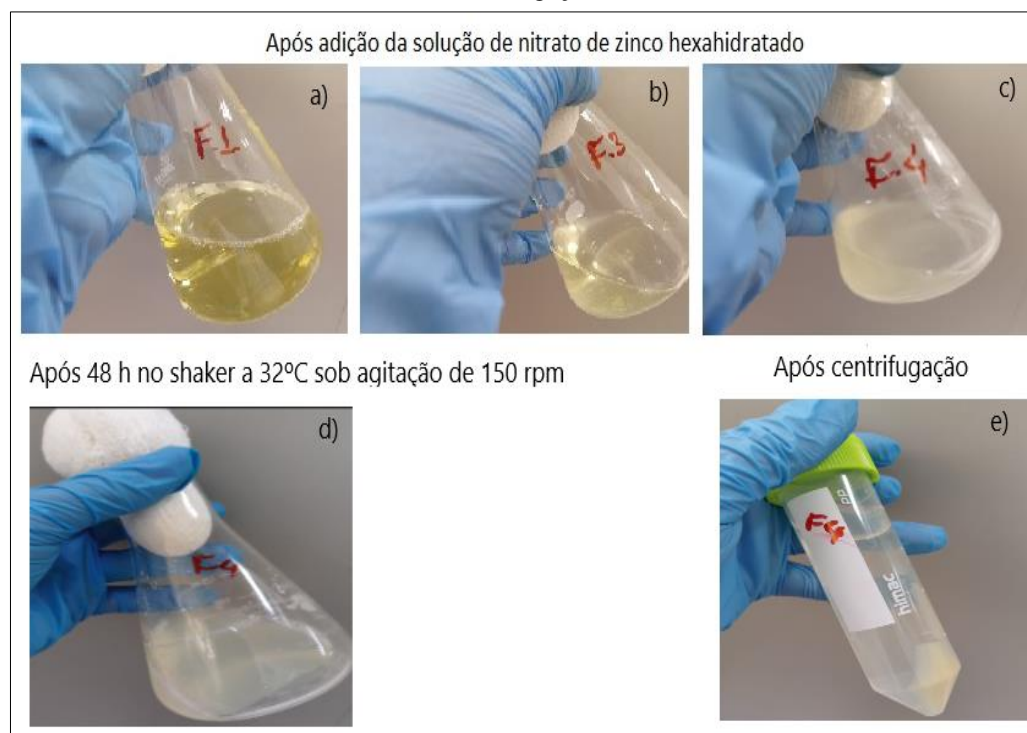
Fonte: Autoria própria.

A Figura 62 ilustra a *Síntese 2* logo após a adição da solução do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e após 48 h de síntese.

Na *Síntese 2.1* não foi observada a turvação do meio após a adição do sal precursor (Figura 62.a) nem após 48 h de síntese. No entanto, observou-se que logo após a adição da solução do sal precursor na *Síntese 2.2* (Figura 62.b) e na *Síntese 2.3* (Figura 62.c) houve uma rápida/instantânea turvação do meio reacional.

Na *Síntese 2.3* após 48 h houve a formação de um material sólido e gelatinoso de aspecto translúcido aderido na parede do frasco erlenmeyer (Figura 62.d) e que após a centrifugação apresentou coloração marrom claro (Figura 62.e).

Figura 62- *Síntese 2* realizada com o caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. (a) *Síntese 2.1* – 100 mL do caldo de síntese, após a adição de 50 mL da solução do sal a 10 mM. (b) *Síntese 2.2*- 50 mL do caldo de síntese, após a adição de 50 mL da solução do sal a 10 mM. (c) *Síntese 2.3* – 50 mL do caldo de síntese após a adição de 50 mL da solução do sal a 0,32 M. (d) *Síntese 2.3* - após 48 h de adição do sal no shaker a 32°C em agitação de 150 rpm. (e) *Síntese 2.3* após centrifugação.

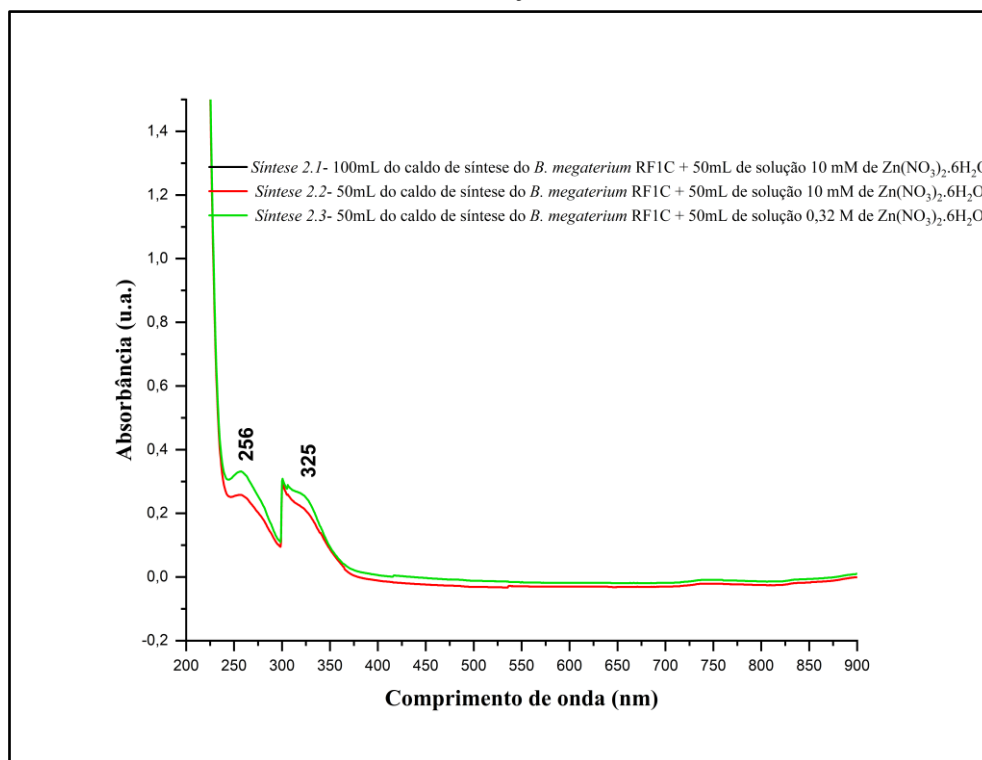


Fonte: Autoria própria.

6.3.2.2 UV-vis

Nas *Sínteses 2.1, 2.2 e 2.3* os espectros de absorção na região UV-vis mostraram a absorção de radiação em 256 nm e 325 nm (Figura 63).

Figura 63- Espectros de absorção na região UV-vis das amostras obtidas nas *Síntese 2* realizada com o caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M) após 48 h de reação.



Fonte: Autoria própria.

A banda com máximo de absorção de radiação em 256 nm provavelmente foi devido a presença de compostos orgânicos conforme foi discutido na Seção 6.3.1.2 (p. 124). Para verificar se a absorção em 325 nm foi em decorrência da presença de NPs-ZnO, foram obtidos difratogramas de raios X.

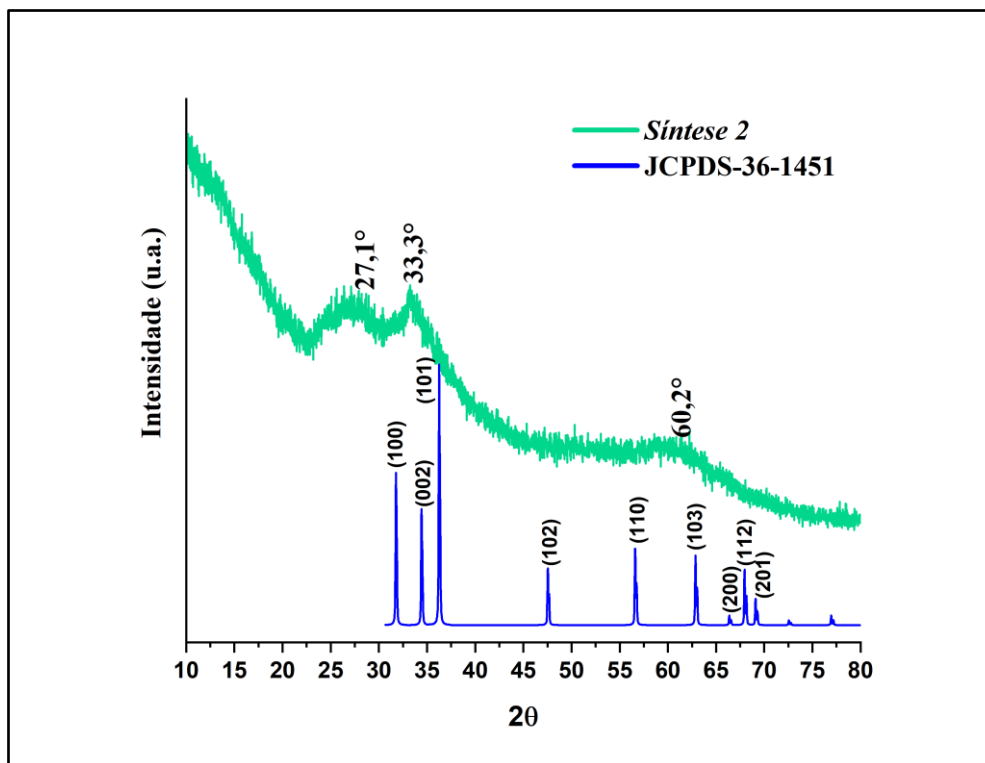
6.3.2.3 Difração de raios-X

A Figura 64 apresenta o difratograma da *Síntese 2.3*. Foram observados no difratograma três picos largos em $27,1^\circ$, $33,3^\circ$ e $60,2^\circ$. No entanto, estes picos não coincidiram com os picos do difratograma de referência do ZnO. Estes picos provavelmente ocorreram devido a formação de sementes do ϵ -Zn(OH)₂ (Figura 48, p. 114).

O comprimento de onda em 325 nm pode ser devido à absorção de energia pelas sementes de ϵ -Zn(OH)₂ (WANG et al., 2015).

Logo, a diminuição da quantidade de *caldo de síntese*, assim como o aumento da concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ não favoreceram a obtenção das NPs-ZnO nas condições realizadas nas *Sínteses 2.1*, *2.2* e *2.3*.

Figura 64- Difratograma da *Síntese 2* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,32 M) após 48 h de reação.



Fonte: Autoria própria.

6.3.3 *Síntese 3* – Estudo da variação da temperatura

Após as *Sínteses 1* e *2*, prosseguiu-se o estudo com a bactéria *B. megaterium* RF1C para dar continuidade na obtenção das NPs-ZnO variando a temperatura de reação, uma vez que a quantidade de *caldo de síntese* e o aumento da concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ já foram estudados nas condições de síntese sem o ajuste de pH.

A *Síntese 3.1* sobre o estudo da variação da temperatura teve como base o trabalho de TRIPATHI et al. (2014) que foi a 60°C e a *Síntese 3.2* os trabalhos de SINGH et al. (2014) e PRASAD e JHA (2009) em que utilizaram a temperatura de 80°C.

Até este momento, os estudos das sínteses de NPs-ZnO foram realizados em agitação orbital no shaker a 150 rpm na temperatura de 32°C por 24 h. No entanto, devido ao aumento da temperatura nas *Sínteses 3.1* e *3.2* foi utilizada uma chapa aquecedora com agitação magnética a 350 rpm a fim de atingir as temperaturas que seriam estudadas para a obtenção das NPs-ZnO. Em alguns trabalhos como o de RAJABAIRAVI et al. (2017)

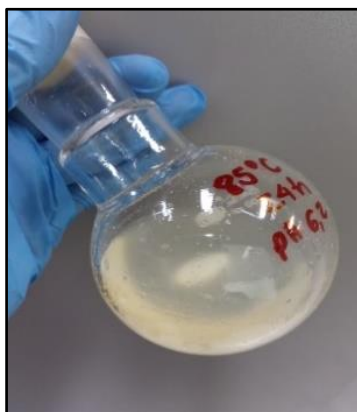
a síntese para a obtenção de NPs-ZnO também foi feita em um equipamento de agitador magnético.

A *Síntese 3.2* foi realizada sob o sistema de refluxo para evitar a evaporação do solvente de síntese (água deionizada esterilizada) que permaneceu por 24 h em aquecimento a 80°C.

6.3.3.1 Aspecto visual

Após a adição do sal precursor, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), nas *Sínteses 3.1* e *3.2* houve turvação do meio de reação. A Figura 65 ilustra a solução turva no balão da *Síntese 3.2* após 24 h a 80 °C.

Figura 65- *Síntese 3.2* realizada com o caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M) após 24 h, pH 6,2 a 80 °C em agitação magnética a 350 rpm.



Fonte: Autoria própria.

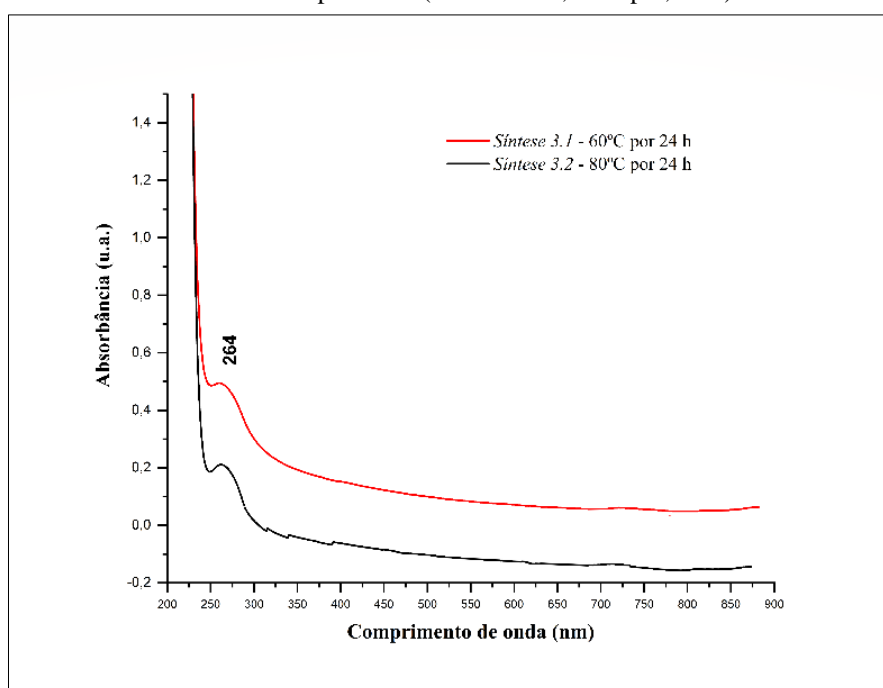
A fim de verificar se a turvação do meio foi devido a formação das NPs-ZnO, foi realizada uma análise preliminar por UV-vis.

6.3.3.2 UV-vis

A Figura 66 apresenta os espectros obtidos nas análises de UV-vis para as *Sínteses 3.1* e *3.2* os quais apresentaram uma banda com máximo de absorção em 264 nm. Como já foi discutido na Seção 6.3.1.2 (p. 124) possivelmente a banda em 264 nm foi proveniente da absorção de radiação por compostos oriundos da matéria orgânica.

Não houve absorção de radiação, na região UV-vis, característica das NPs-ZnO, conforme valores de referência da Tabela 6 (p. 75). Assim, constatou-se que o aumento da temperatura nas condições das *Sínteses 3.1* e *3.2* não favoreceu a obtenção das NPs-ZnO.

Figura 66- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 3* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M) em agitação magnética e em diferentes temperaturas (60°C e 80°C, 350 rpm, 24 h).



Fonte: Autoria própria.

6.4 Sínteses das NPs-ZnO – sínteses com o ajuste de pH

As *Sínteses 4, 5, 6 e 7* foram realizadas com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, obtido conforme procedimento descrito na Seção 4.2.5.2 (p. 64).

É importante mencionar que nas *Sínteses 5-8*, 80% do volume da solução de NaOH 1 M foi adicionado em uma única vez, os 20% restantes foram adicionados de forma a ajustar o pH para o valor desejado. Nesta etapa acontece a precipitação dos íons Zn^{2+} formando o hidróxido de zinco. Esta é uma das maneiras de gerar, de forma controlada e simultânea, um grande número de núcleos estáveis, o que favorece as partículas a crescerem com tamanhos mais uniformes. Teoricamente, quando isto acontece, são obtidas NPs-ZnO monodispersas com tamanhos nanométricos (ATKINS et al., 2008).

Os cálculos dos tamanhos dos cristalitos foram realizados a partir da equação de Debye-Scherrer e dos dados obtidos nos difratogramas e estão registrados no **Apêndice A**.

6.4.1 Síntese 4 – Estudo da variação do pH

Uma vez em que os estudos realizados anteriormente (*Sínteses 1-3*) não levaram a obtenção das NPs-ZnO, nesta etapa foi estudada a variação do pH do meio reacional.

BALRAJ et al. (2017) em seus estudos de obtenção de NPs-ZnO pela via extracelular, mediada pela bactéria *Streptomyces* sp., ajustou o pH das sínteses para 9,0. Conforme exposto na Seção 1.4.1 (p. 46) nos métodos químicos para a obtenção das NPs-ZnO, como a precipitação e o sol-gel, as sínteses são normalmente realizadas em pH alcalino (9,0-11,0), pois os íons Zn^{2+} são solúveis em pH ácido. Assim, o pH alcalino favorece a insolubilidade dos íons Zn^{2+} favorecendo a obtenção das nanopartículas (POURBAIX, 1974).

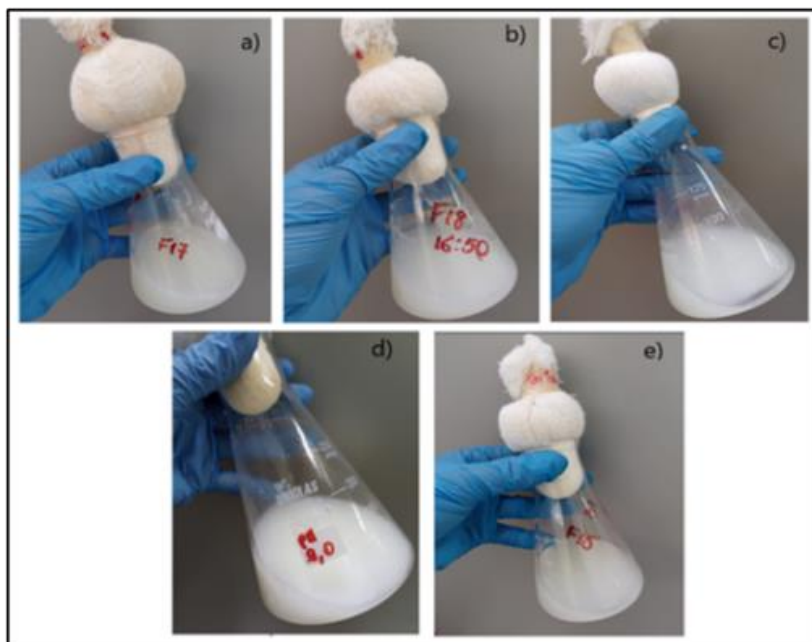
Na *Síntese 4*, devido ao ajuste do pH, o procedimento de obtenção das NPs-ZnO foi diferente do realizado nas *Sínteses 1-3*. O ajuste do pH foi feito em frasco béquer em agitação magnética (350 rpm) a fim de se ter uma maior homogeneidade do meio reacional. Somente após o valor de pH ter sido ajustado foi que o conteúdo dos frascos béquer foi vertido nos frascos erlenmeyer onde permaneceram em agitação orbital no shaker (150 rpm, 24 h, 32°C).

6.4.1.1 Aspecto visual

Após o ajuste de pH do sistema (pH 7,0; 7,5; 8,0, 9,0; 10,0) contendo a solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ e o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C observou-se que o meio turvou. Em todos os casos observou-se uma suspensão branca leitosa, sendo ainda mais acentuada nas sínteses de maiores valores de pH (8, 9 e 10). A Figura 67 ilustra o aspecto da reação da *Síntese 4* após 24 h em agitação orbital no shaker (150 rpm, 32°C).

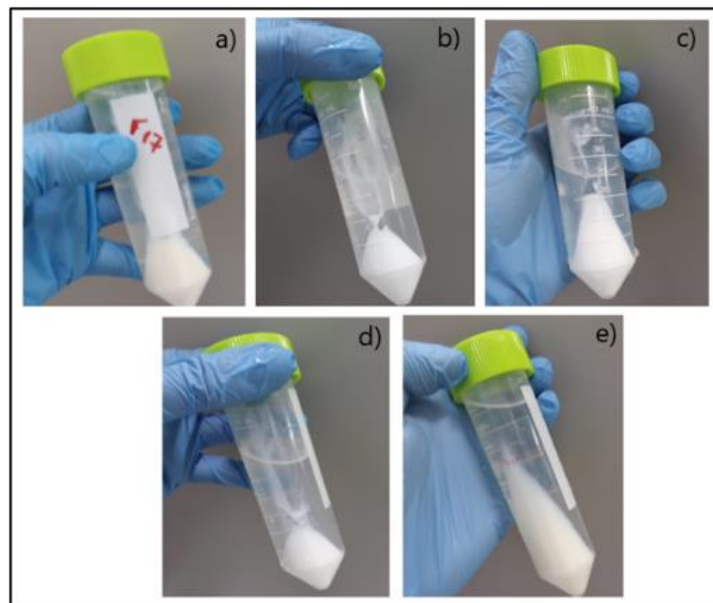
Após a centrifugação do conteúdo formado nos frascos erlenmeyer foi obtido um material com aspecto de um sólido branco e uniforme, conforme ilustrado na Figura 68.

Figura 67- *Síntese 4* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, 24 h, 150 rpm, 32°C) em diferentes valores de pH. (a) pH 7,0. (b) pH 7,5. (c) pH 8,0. (d) pH 9,0. (e) pH 10,0.



Fonte: Autoria própria.

Figura 68- Obtenção das NPs-ZnO, após centrifugação da reação de *Síntese 4* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, 24 h, 150 rpm, 32°C) em diferentes valores de pH. (a) pH 7,0. (b) pH 7,5. (c) pH 8,0. (d) pH 9,0. (e) pH 10,0.



Fonte: Autoria própria.

6.4.1.2 UV-vis

Para verificar se o sólido de coloração branca obtido eram as NPs-ZnO foi realizada uma análise preliminar de UV-vis para verificar se haveria absorção de radiação no comprimento de onda característico do ZnO.

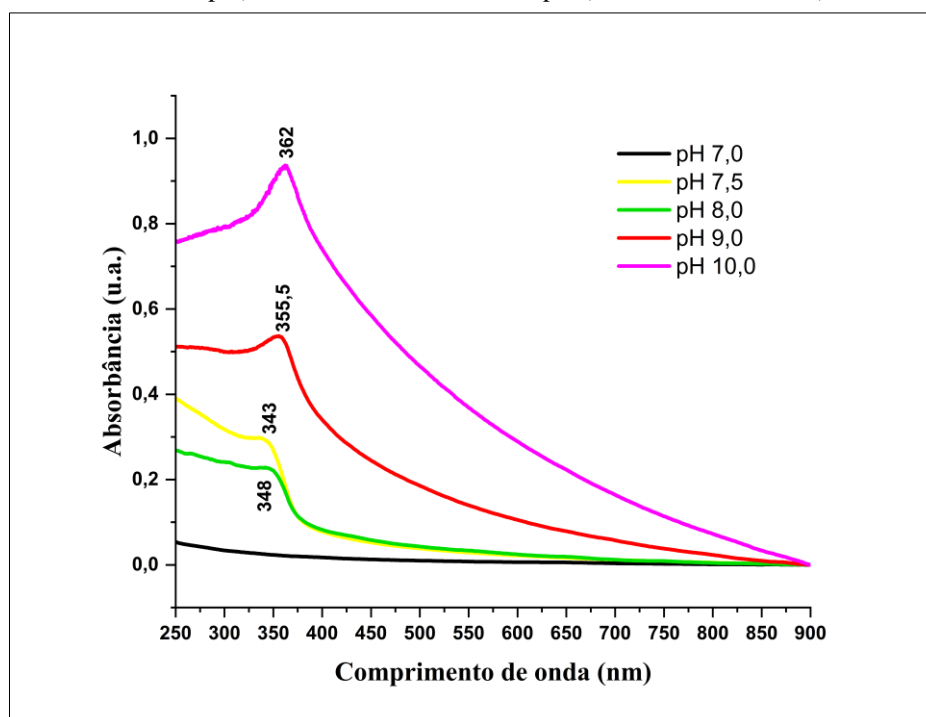
A Figura 69 mostra os espectros de absorção na região UV-vis para as NPs-ZnO obtidas na *Síntese 4*.

Nos espectros de UV-vis foram observadas bandas com máximo de absorção em 343, 348, 355,5 e 362 nm para os valores de pH 7,5, 8,0, 9,0 e 10, respectivamente. Não foi observada absorção de radiação em nenhum comprimento de onda para a *Síntese 4.1* onde o pH foi ajustado para 7,0.

No trabalho de SARAVANAN et al. (2018) as NPs-ZnO obtidas a partir do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, com diâmetro na faixa de 45-95 nm, apresentaram absorção em 346 nm. Enquanto no trabalho de KUNDU et al. (2014) as NPs-ZnO obtidas a partir do sal precursor de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, com diâmetro na faixa de 100-120 nm, apresentaram absorção em 340 nm. Sendo assim, as bandas com máximo de absorção em 343 nm, 348 nm, 355,5 nm e 362 nm podem ser devido à absorção de radiação pelas NPs-ZnO, já que como mencionado na Seção 6.4.1.1 (p. 134) também o aspecto visual da *Síntese 4* sugeriu a formação de ZnO.

Para verificar a formação da fase cristalina do ZnO nas *Sínteses 4.1-4.5* foram obtidos difratogramas de raios X.

Figura 69- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 4* realizada com o caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, 24 h, 32°C, agitação orbital em 150 rpm) e em diferentes valores de pH (7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10).

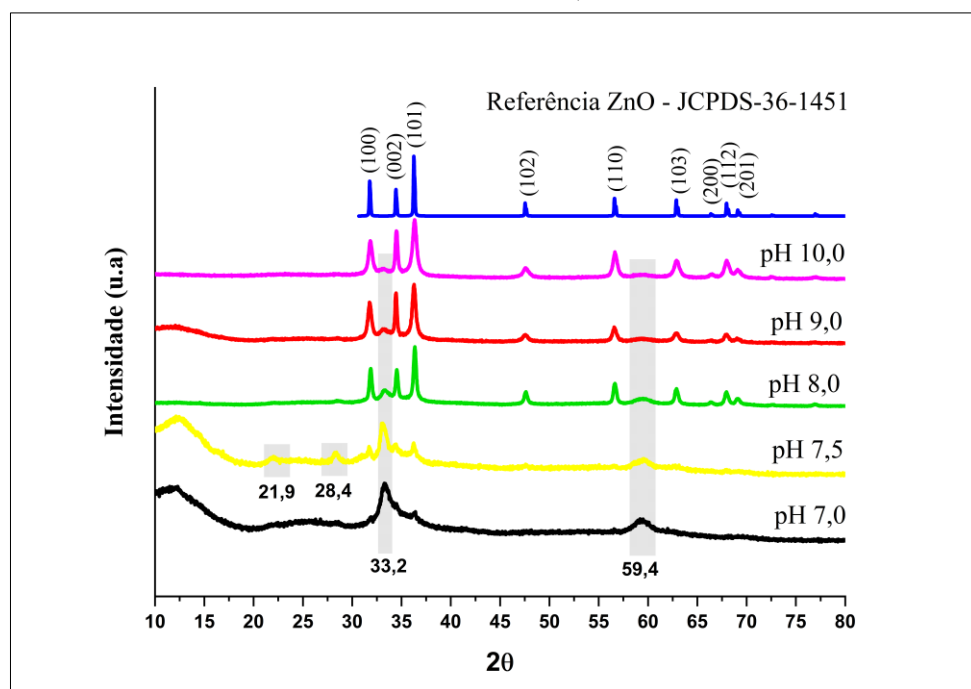


Fonte: Autoria própria.

6.4.1.3 Difração de raios-X

A Figura 70 mostra os difratogramas obtidos nas análises de difração de raios-X.

Figura 70- Difratomogramas de raios-X da *Síntese 4* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (0,32 M, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) e em diferentes valores de pH (7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10).



Fonte: Autoria própria.

Em relação a *Síntese 4.3* (pH 8,0), a *Síntese 4.4* (pH 9,0) e a *Síntese 4.5* (pH 10,0) as difrações observadas referentes aos picos 31,7°, 34,4°, 36,2°, 47,7°, 56,8°, 62,9°, 66,4°, 68,2° e 69,3° corresponderam aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina wurtzita do ZnO do difratograma de referência (JCPDS-36-1451). Assim, os espectros obtidos nas análises de UV-vis com absorção de energia nos comprimentos de onda em 348, 355,5 e 362 nm para as *Sínteses 4.3*, *4.4* e *4.5* foram atribuídos à absorção de energia pelas NPs-ZnO. Na região UV-vis, a absorção das NPs-ZnO ocorre devido às transições eletrônicas da banda de valência para a banda de condução (O_{2p} para Zn_{4s}).

Na Figura 70 foram observados ainda outros picos adicionais nos difratogramas. Um pico em 33,2° nas *Sínteses 4-1-4.5* (pH 7,0; 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0), sendo menos proeminente na *Síntese 4.5* (pH 10,0). Outro pico em 59,4°, também observado nas *Sínteses 4.1-4.5*, sendo menos acentuado na *Síntese 4.4* (pH 9,0) e na *Síntese 4.5* (pH 10,0). De acordo com os trabalhos de NICHOLAS (2011) e KRÓL et. al (2018) esses dois picos corresponderam à formação de hidróxido de zinco, como um intermediário das NPs-ZnO (Figura 48, p. 114). KRÓL et. al (2018) mencionaram em seus estudos que a presença desses dois picos no difratograma confirmaram o mecanismo de síntese biológica de NPs-ZnO por eles proposto (Seção 1.2.3, p. 35) onde a obtenção de ZnO primeiro passou pela formação do $Zn(OH)_2$.

Analisando ainda a Figura 70, devido a solubilidade dos íons Zn^{2+} em função do pH, notou-se que no difratograma da *Síntese 4.2* (pH 7,5) apenas três planos da estrutura cristalina wurtzita do ZnO (100) (002) e (101) observados nos ângulos de $31,7^\circ$, $34,4^\circ$ e $36,2^\circ$, respectivamente, começaram a se formar. Isso está em acordo com a absorção de energia no comprimento de onda de 343 nm (Figura 69), onde a banda está presente de forma discreta. Os demais planos, (102), (110), (103), (200), (112) e (201), característicos da estrutura wurtzita do ZnO, foram observados no difratograma a partir do pH 8,0.

Ainda na *Síntese 4.2* (pH 7,5) mais outros dois picos em $21,9^\circ$ e $28,4^\circ$ foram obtidos. Estes dois picos foram observados no difratograma de referência do ϵ -Zn(OH)₂ (Figura 48, p. 114). Logo, nesta síntese houve a presença de 4 picos, em $21,9^\circ$; $28,4^\circ$; $33,2^\circ$ e $59,4^\circ$, os quais são característicos dos planos cristalográficos do ϵ -Zn(OH)₂ e três picos, em $31,7^\circ$, $34,4^\circ$ e $36,2^\circ$ característicos dos planos cristalinos do ZnO. Observou-se que estes picos foram mais alargados, o que permitiu sugerir a formação destes cristais em tamanhos muito pequenos.

No difratograma da *Síntese 4.1* (pH 7,0) (Figura 70) foram observados dois picos bastante discretos em $36,4^\circ$ e $31,8^\circ$ característicos dos planos (101) e (100), respectivamente, do ZnO. E mais dois outros picos, mais acentuados e alargados, em $59,4^\circ$ e em $33,2^\circ$ característicos dos planos cristalográficos do ϵ -Zn(OH)₂ (Figura 48, p. 114). No entanto, conforme apresentado na Figura 69, na análise de UV-vis não foi observada absorção de energia em nenhum comprimento de onda desta síntese. Possivelmente devido a presença de pequenas quantidades destes cristais, ainda em formação, no meio.

Em relação à cristalinidade, visualmente, observou-se que nas *Sínteses 4.3* (pH 8,0) e *4.5* (pH 10,0) os difratogramas possuíram melhor cristalinidade em relação às demais sínteses (*Sínteses 4.1*, *4.2* e *4.4*).

Assim, na *Síntese 4* em valores abaixo do pH 8,0, ocorreu uma condição mais favorável à solubilidade dos íons Zn^{2+} , além disso, os íons Zn^{2+} encontram-se complexados com o meio, o que poderia dificultar a formação de hidróxido de zinco e a subsequente formação de ZnO. SÁNCHEZ et al. (1996) mostraram em seus estudos a alta estabilidade dos íons Zn^{2+} com glicinato. Como foi descrito na Seção 6.1 (p. 96), o *caldo de síntese* utilizado nas sínteses das NPs-ZnO contém proteínas, lipídeos etc. que possivelmente proporcionam uma boa estabilidade com os íons Zn^{2+} . Sendo assim, se faz necessário valores de pH acima de 7,5 para favorecer a formação de hidróxido de zinco e a posterior formação das NPs-ZnO. Estes dados foram bastante interessantes, pois na

síntese hidrotérmica o crescimento de cristais de ZnO estão limitados entre o pH 9-13 (NICHOLAS, 2011).

A partir da equação de Debye-Scherrer (**Equação 8**, p.71) e com base na largura-a-meia-altura dos picos fornecidos pelos difratogramas da Figura 70 foram calculados o tamanho dos cristalitos das *Sínteses 4.3-4.5*. Os picos usados bem como os cálculos realizados estão no **Apêndice A**. O tamanho médio dos cristalitos calculados foram de 25 ± 2 nm, 19 ± 2 nm e 17 ± 2 nm para os valores de pH 8,0, 9,0 e 10,0, respectivamente. O desvio padrão entre o tamanho médio dos cristalitos dos pH 8,0, 9,0 e 10,0 foi de ± 4 nm, com um coeficiente de variação de 20% (Tabela 19), ou seja, houve uma média dispersão entre os tamanhos dos cristalitos de uma síntese para outra. Isto permitiu sugerir que a variação de pH alterou as características de tamanho do cristalito das NPs-ZnO obtidas. Os cristalitos menores foram obtidos em pH 10,0 e os cristalitos maiores foram obtidos em pH 8,0.

A fim de verificar a morfologia e o tamanho médio dos grãos foi feita a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.

Tabela 19- Comparação do tamanho dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 4.3-4.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho do cristalito (nm)	Tamanho médio do cristalito (nm)	Desvio padrão (nm)	Coeficiente de variação (%)
4.3 (pH 8,0)	25			
4.4 (pH 9,0)	19	21	4	20
4.5 (pH 10,0)	17			

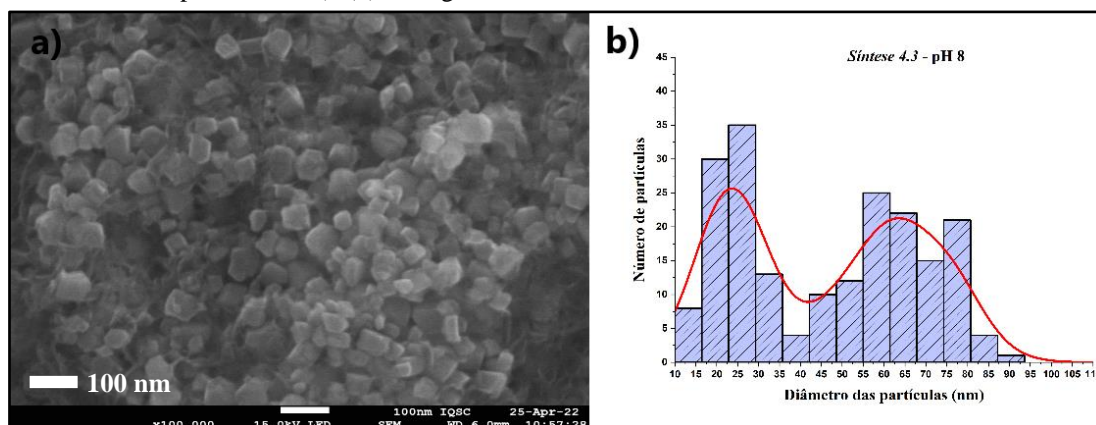
Fonte: Autoria própria.

6.4.1.4 MEV

Na Figura 71, referente à análise de MEV, foi observada a morfologia das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 4.3* (pH 8,0) a qual apresentou formas variáveis. No entanto, em sua maioria a presença de morfologia relativamente cúbica foi obtida. Notou-se que a superfície das NPs-ZnO foi regular e que elas estavam bastante aglomeradas (Figura 71a.). A Figura 71b. apresentou uma distribuição bimodal de tamanho, com dois valores médios (23 nm e 64 nm), a distribuição do tamanho compreendeu partículas entre 10 e 95 nm.

Comparando os valores médios dos grãos, 23 nm e 64 nm, com o valor médio do cristalito obtido na análise de DRX (25 nm) foi possível sugerir que na *Síntese 4.3* houve a presença tanto de monocristais quanto de policristais (grão formado por mais de um cristalito).

Figura 71- MEV das NPs-ZnO – aumento de 100.000 X. (a) MEV das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 4.3* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (0,32 M, pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker). (b) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO da *Síntese 4.3*.

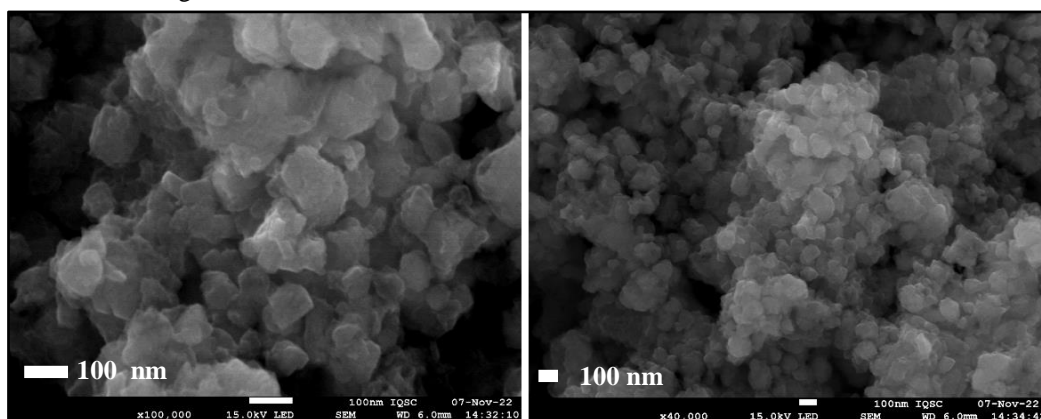


Fonte: Autoria própria.

Nas Figuras 72 e 73 através das análises por MEV, foram observadas a morfologia das nanopartículas de ZnO obtidas na *Síntese 4.4* (pH 9,0) e na *Síntese 4.5* (pH 10,0), respectivamente. Observou-se que com o aumento do pH as NPs-ZnO, apresentaram morfologias de difícil definição não sendo possível fazer a contagem de tamanho das partículas formadas. Aparentemente os grãos estavam maiores. As partículas obtidas na *Síntese 4.4* (Figura 72) estavam bastante aglomeradas, mesmo a análise tendo sido realizada com uma suspensão bastante diluída.

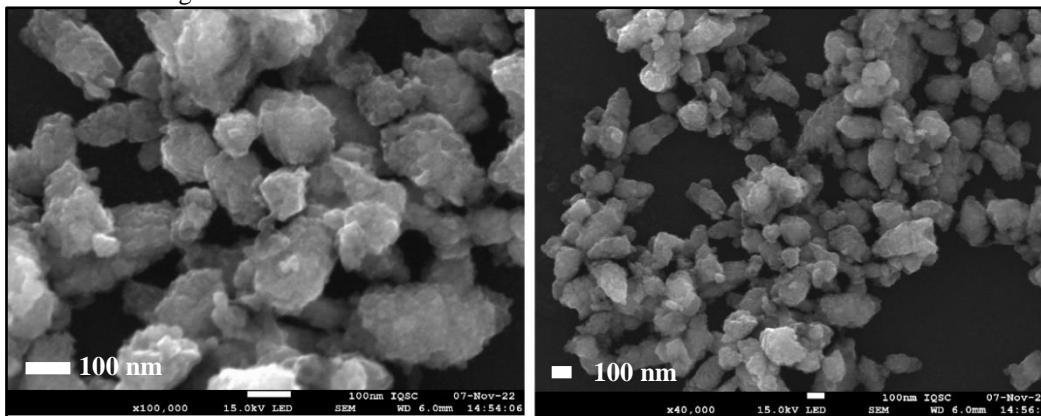
Como descrito na Seção 6.1 (p. 96) o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C usado nas *Sínteses 4.4* e *4.5* das NPs-ZnO continha uma quantidade significativa de proteínas que poderiam estar envolvidas na formação/estabilização das NPs-ZnO já que nos estudos de SÁNCHEZ et al. (1996) houve formação de complexo bastante estável entre os íons Zn^{2+} com glicinato, indicando uma alta afinidade entre grupos carboxilas com o zinco. A alta estabilidade do complexo foi em pH próximo a 5,5. O sistema usado nas *Sínteses 4.4* e *4.5*, 20 mL solução do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M com 20 mL de *caldo de síntese* forneceu um pH de 6,0. E ainda, houve estudos na literatura relacionando a obtenção das NPs-ZnO com as proteínas (KRÓL et al., 2018). Sendo assim, foi possível sugerir que o aumento do pH na *Síntese 4.4* e especialmente na *Síntese 4.5* pode ter provocado a desnaturação das proteínas (NELSON; COX, 2014) dificultando assim, a estabilização do tamanho dos grãos.

Figura 72- MEV das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 4.4* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (0,32 M, pH 9,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker). À esquerda tem-se a imagem com aumento de 100.000X e à direita com aumento de 40.000X.



Fonte: Autoria própria.

Figura 73- MEV das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 4.5* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot H_2O$ (0,32 M, pH 10,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker). À esquerda tem-se a imagem com aumento de 100.000X e à direita com aumento de 40.000X.



Fonte: Autoria própria.

Logo, neste estudo observou-se que o ajuste de pH para os valores entre 8,0 e 10,0 na *Síntese 4* foi a condição ideal para a obtenção de NPs-ZnO realizadas neste estudo.

6.4.2 *Síntese 5* – Estudos da variação da quantidade de caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C

Uma vez obtidas as NPs-ZnO nas *Sínteses 4.3-4.5*, através do ajuste de pH, com o objetivo de padronizar as posteriores condições, as *Sínteses 5, 6, 7 e 8* foram realizadas com o ajuste do pH em 8,0. Esta condição de reação além de ser mais branda, possibilitou a obtenção de NPs-ZnO com morfologia mais definida em relação às NPs-ZnO obtidas com o ajuste de pH nos valores de 9,0 e 10,0 (*Sínteses 4.4 e 4.5*, respectivamente).

Na *Síntese 5* a variação da quantidade de caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C, teve como finalidade estudar a relação entre a quantidade de caldo de síntese e o tamanho dos grãos das NPs-ZnO.

6.4.2.1 Aspecto visual

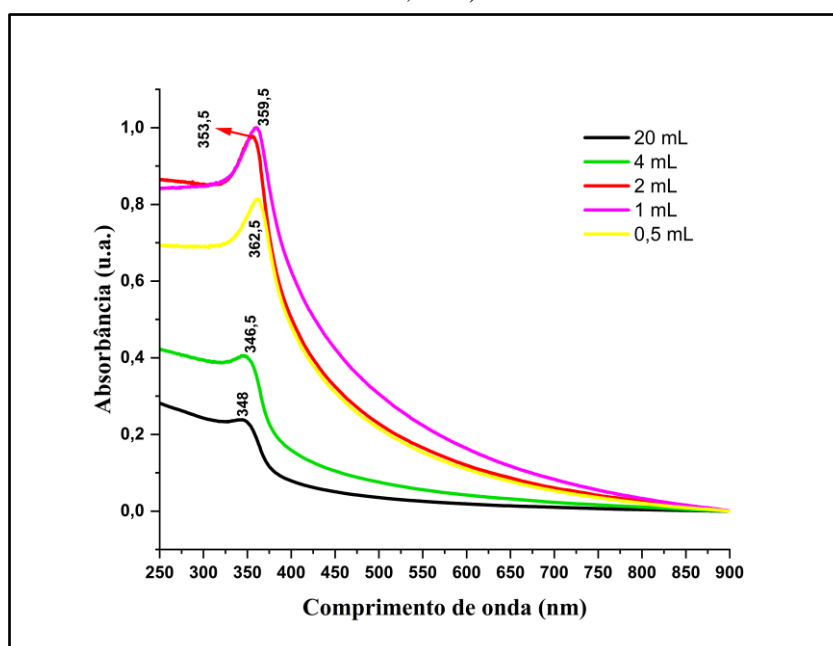
Em geral, na *Síntese 5* as NPs-ZnO, nas diferentes quantidades de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C adicionadas nas sínteses, forneceram uma suspensão branca leitosa em todas as *Sínteses* (5.1-5.5), assim como foi obtido inicialmente na *Síntese 4*. Após a centrifugação do material leitoso formado obteve-se um sólido branco, sendo a Figura 68 representativa dos sólidos obtidos (Seção 6.4.1.1, p. 134).

6.4.2.2 UV-vis

A Figura 74 mostra os espectros de UV-vis das *Sínteses 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5* correspondentes à adição de 20 mL, 4 mL, 2 mL, 1 mL e 0,5 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, respectivamente.

Em todos os espectros observou-se a presença de bandas de absorção características das NPs-ZnO na região UV-vis (20 mL, 348 nm; 4 mL, 346,5 nm; 2 mL, 353,5 nm; 1 mL, 359,5 nm; 0,5 mL, 362,5 nm). Observou-se que à medida em que a quantidade de *caldo de síntese* adicionado na síntese das NPs-ZnO foi reduzida, o comprimento de onda absorvido foi deslocado para a região de maior comprimento de onda, ou seja, de menor energia. Para 20 mL de *caldo de síntese*, obteve-se uma banda com máximo de absorção em 348 nm e para 0,5 mL de *caldo de síntese* obteve-se uma banda com máximo de absorção em 362,5 nm.

Figura 74- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 5* realizada com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8,0, 24 h, 32°C, agitação orbital em 150 rpm) e em diferentes quantidades de *caldo de síntese* (20 mL; 4 mL; 2 mL; 1 mL; 0,5 mL e 0,0 mL).



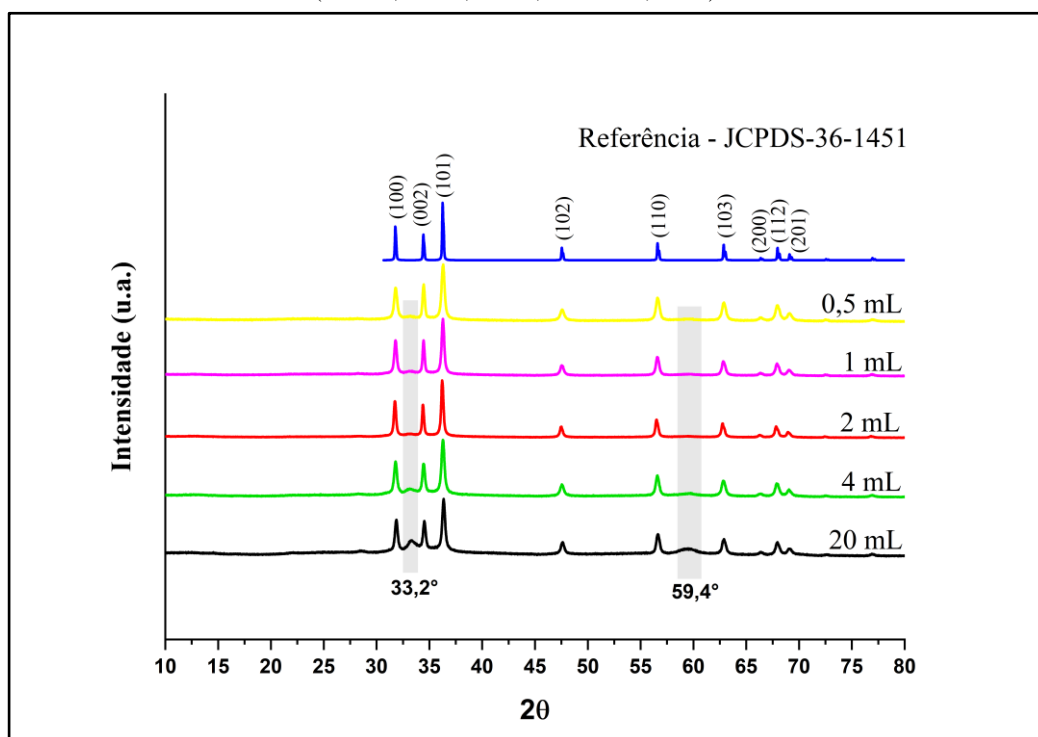
Fonte: Autoria própria.

Na síntese controle, sem a adição de *caldo de síntese*, Seção 6.2.1 (p. 115) o comprimento de onda absorvido foi em 363 nm. Como exposto na Seção 1.3.2 (p. 41), a redução do tamanho da partícula de ZnO aumenta sua energia de *band gap* sendo necessária uma maior energia (menor comprimento de onda) para excitarem os elétrons da banda de valência (VB) para a banda de condução (CB). Portanto, o aumento do comprimento de onda na absorção da radiação ultravioleta pode estar relacionado com fatores físicos, por exemplo, como o aumento do tamanho das NPs-ZnO. KUNDU et al. (2014) descreveram uma banda com máximo de absorção em 373 nm para o ZnO *bulk*. No entanto, para uma conclusão mais assertiva seria necessário medir o valor de *band gap* das nanopartículas através da técnica de Espectroscopia de Reflectância Difusa. O tamanho e a morfologia das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5* foram analisados através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura e foram discutidos posteriormente na Seção 6.4.2.4 (p. 146).

6.4.2.3 Difração de raios-X

A formação de cristais de NPs-ZnO obtidos pelo *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C apresentaram um arranjo hexagonal wurtzita, em todas as *Sínteses 5.1* – 5.5, que foi confirmado pelas análises de DRX como mostrado na Figura 75.

Figura 75- Difratomogramas da *Síntese 5* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8,0, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) e em diferentes quantidades de *caldo de síntese* (20 mL; 4 mL; 2 mL; 1 mL e 0,5 mL).



Fonte: Autoria própria.

A difração observada nos picos 31,7°, 34,4°, 36,2°, 47,7°, 56,8°, 62,9°, 66,4°, 68,2° e 69,3° corresponderam aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina hexagonal wurtzita do ZnO em comparação ao difratograma de referência JCPDS-36-1451.

Na obtenção das NPs-ZnO com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C observou-se outros dois picos adicionais, em 33,2° e 59,4° nos difratogramas de DRX das *Sínteses 5.1-5.5*. Estes dois picos não corresponderam a nenhum plano dos cristais de ZnO do difratograma de referência JCPDS-36-1451. Estes dois picos, conforme discutido na Seção 6.3.1.3 (p. 126) Figura 48 (p. 114), foram provenientes da formação de Zn(OH)₂ (ICSD#50447). Notou-se ainda que estes picos foram mais acentuados na *Síntese 5.1* no qual continha maior volume de *caldo de síntese* (20 mL) e foi menos acentuado na *Síntese 5.5* que continha menor quantidade de *caldo de síntese* (0,5 mL).

Os difratogramas obtidos, visualmente, apresentaram boa cristalinidade.

O tamanho médio dos cristalitos de ZnO foram calculados a partir da equação de Debye-Scherrer com base na largura-a-meia-altura dos picos fornecidos pelo difratograma da Figura 75. Os picos usados bem como os cálculos realizados estão no **Apêndice A**. Os tamanhos médios encontrados foram 25 ± 2 nm; 25 ± 2 nm; 31 ± 5 nm; 29 ± 6 nm; 25 ± 4 nm para a adição de 20 mL, 4 mL, 2 mL, 1 mL e 0,5 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, respectivamente (Tabela 20).

Tabela 20- Tamanho médio dos cristalitos e o desvio padrão das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.1-5.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito (nm)	Desvio padrão (nm)
5.1 (20 mL)	25	2
5.2 (4 mL)	25	2
5.3 (2 mL)	31	5
5.4 (1 mL)	29	6
5.5 (0,5 mL)	25	4

Fonte: Autoria própria.

Observou-se que o desvio padrão aumentou à medida em que a quantidade de *caldo de síntese* na síntese foi reduzida, o que está em acordo com os histogramas, de cada síntese, obtidos na Seção 6.4.2.4 (p. 146).

Como pode ser observado na Tabela 21, a variação do tamanho médio dos cristalitos, entre as *Sínteses 5.1-5.5*, foi de 3. O coeficiente de variação dos tamanhos de cristalito entre as *Sínteses 5.1-5.5* foi de 10%, mostrando que houve uma baixa dispersão dos valores, ou seja, que a variação da quantidade de *caldo de síntese* de uma síntese para outra não teve grande influência sobre os tamanhos dos cristalitos obtidos. No entanto,

através das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura, observou-se que a quantidade de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C adicionado nas sínteses teve influência sobre o tamanho dos grãos, conforme foi exposto na próxima seção.

Tabela 21- Comparação do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.1-5.5*.

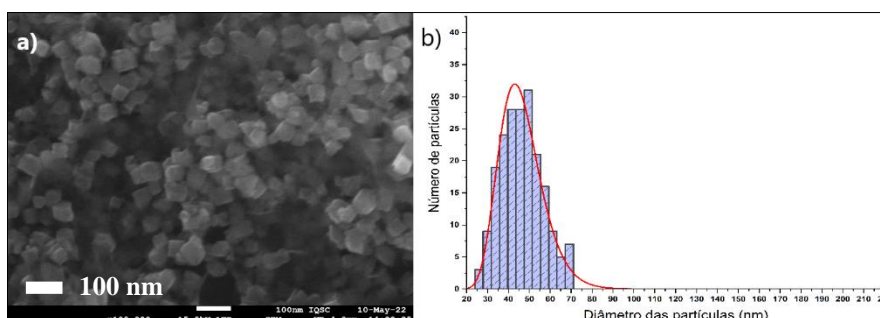
<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito de cada síntese (nm)	Tamanho médio do cristalito das <i>Sínteses 5.1-5.5</i> (nm)	Desvio padrão (nm)	Coefficiente de variação (%)
5.1 (20 mL)	25			
5.2 (4,0 mL)	25			
5.3 (2,0 mL)	31	27	3	10
5.4 (1,0 mL)	29			
5.5 (0,5 mL)	25			

Fonte: Autoria própria.

6.4.2.4 MEV

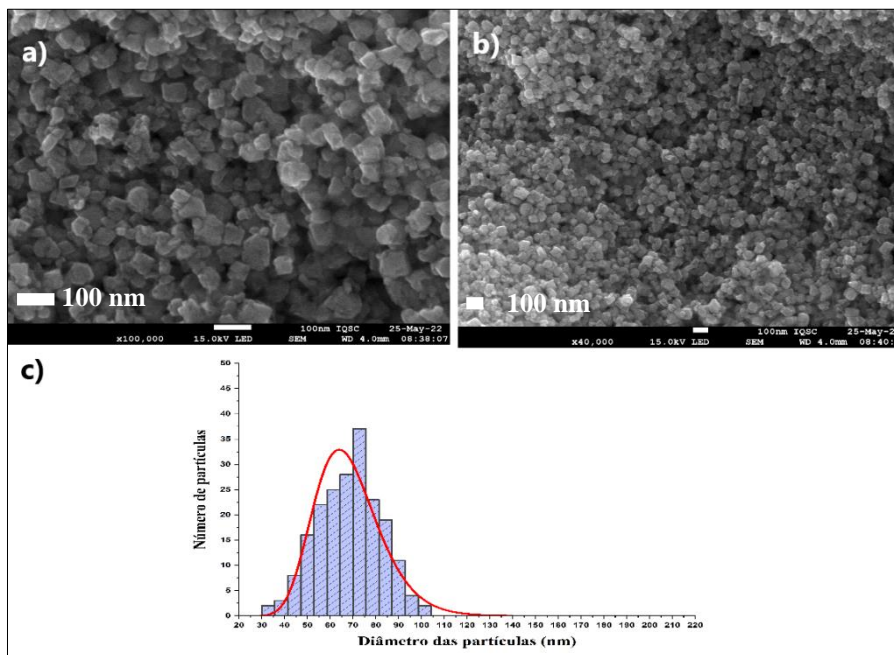
As Figuras 76 – 80 mostram a morfologia e o tamanho das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.1-5.5* com a adição de 20 mL, 4 mL, 2 mL, 1 mL, 0,5 mL e 0 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, respectivamente.

Figura 76- Microscopia Eletrônica de Varredura (a) MEV das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.1* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 20 mL de *caldo de síntese*. (b) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.1*.



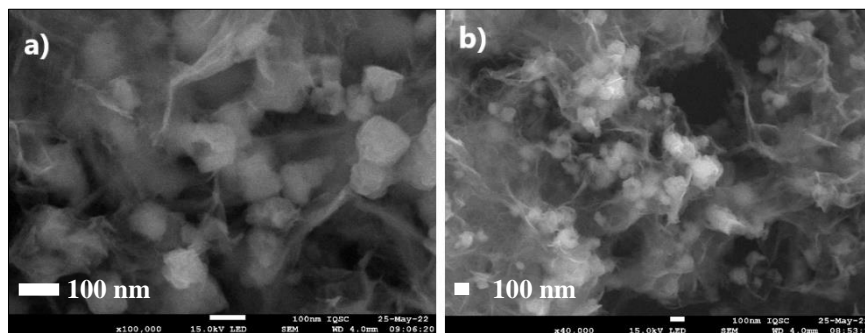
Fonte: Autoria própria.

Figura 77- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.2* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 4 mL de *caldo de síntese* (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2* (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*.



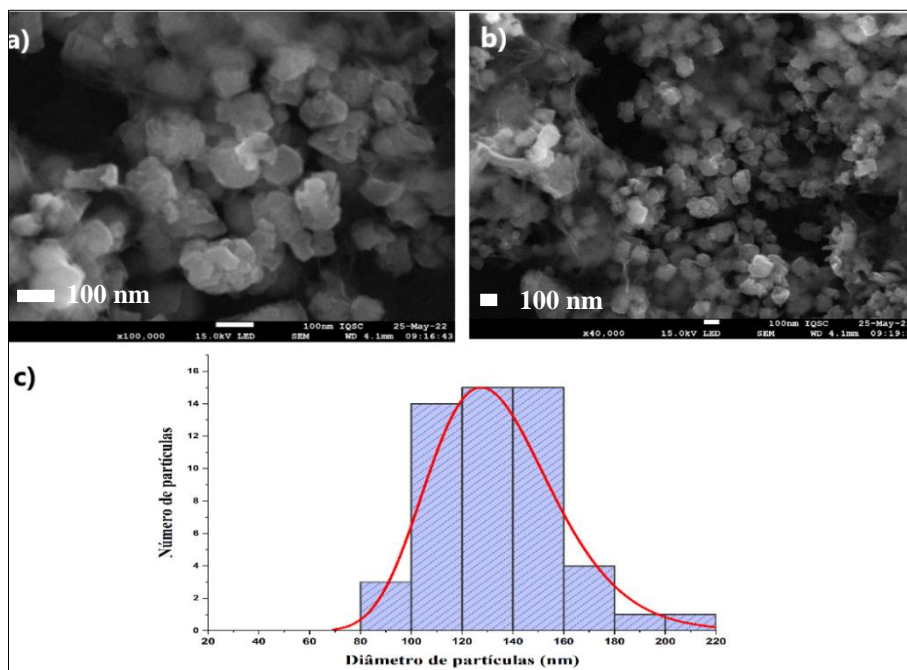
Fonte: Autoria própria.

Figura 78- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, obtidas da *Síntese 5.3* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 2 mL de *caldo de síntese*. (b) MEV, com aumento de 40.000X, obtidas da *Síntese 5.3*.



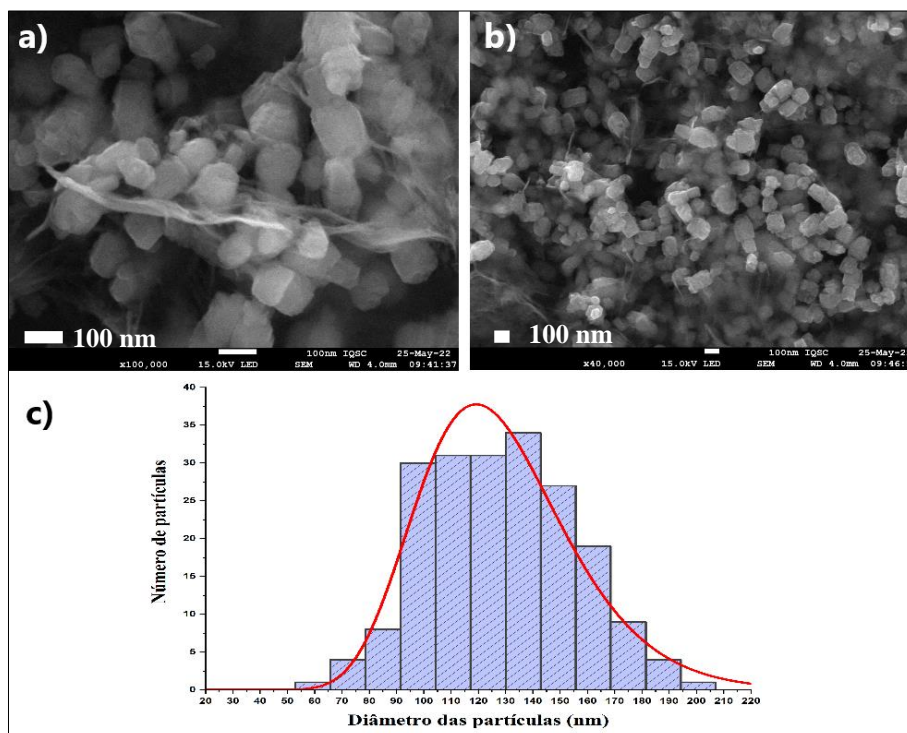
Fonte: Autoria própria.

Figura 79- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.4* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 1 mL de *caldo de síntese*. (b) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.4*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.4*



Fonte: Autoria própria.

Figura 80- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.5* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C, 150 rpm no shaker) com 0,5 mL de *caldo de síntese*. (b) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 5.5* (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.5*.



Fonte: Autoria própria.

Não foi observado alterações significativas na morfologia das NPs-ZnO, sendo que a maioria apresentou um aspecto, aproximadamente, cúbico nas micrografias por MEV. No entanto, observou-se um aumento no tamanho dos grãos das NPs-ZnO à medida em que a quantidade de *caldo de síntese* adicionado foi reduzido. Isso pôde ser melhor observado nos histogramas das Figuras 76.b, 77.c, 79.c e 80.c, onde as barras foram deslocadas para a direita no eixo x, na direção de diâmetros maiores onde houve menor quantidade de *caldo de síntese* adicionado na síntese das NPs-ZnO.

As imagens das NPs-ZnO (Figura 78) não foram favoráveis para fazer a medição dos grãos e o histograma da distribuição de tamanho. No entanto, comparando a Figura 77.a com a Figura 78.a, ambas com aumento de 100.000X, foi visualemnte notável que as partículas da Figura 78.a (referente à *Síntese 5.3*), onde foram usados 2 mL de *caldo de síntese*, foram maiores do que as da Figura 77.a (referente à *Síntese 5.2*), onde foram usados 4 mL de *caldo de síntese*.

Os valores médios dos grãos, extraídos das micrografias de MEV, das NPs-ZnO foram 46 ± 10 nm, 68 ± 14 nm, 134 ± 25 nm e 128 ± 27 nm para a adição de 20 mL, 4 mL, 1 mL e 0,5 mL de *caldo de síntese*, respectivamente. Observou-se um maior desvio em relação aos tamanhos das partículas nas sínteses em que foram adicionados menos *caldo de síntese*, conforme nos mostrado na Tabela 22 e os histogramas das Figuras 76.b, 77.c, 79.c e 80.c. No entanto, não houve diferença significativa entre os coeficientes de variação das sínteses, 22%; 20%; 18% e 21%, para as *Sínteses 5.1, 5.2, 5.4 e 5.5*, respectivamente, sugerindo uma heterogeneidade similar de tamanho dos grãos entre elas.

Tabela 22- Tamanho médio dos grãos, desvio padrão e coeficiente de variação das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.1-5.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio dos grãos (nm)	Desvio padrão (nm)	Coefficiente de variação (%)
5.1	46	10	22
5.2	68	14	20
5.4	134	25	18
5.5	128	27	21

Fonte: Autoria própria.

Comparando os valores dos tamanhos médio dos grãos (Tabela 23) obtidos em cada uma das sínteses, observou-se que a variação de tamanho do grão de ZnO entre elas foi considerável, 46%, ou seja, a variação da quantidade de *caldo de síntese* adicionada em cada uma das sínteses provocou uma alteração significativa no tamanho do grão.

Tabela 23- Comparação do tamanho médio dos grãos de ZnO obtidos nas *Sínteses 5.1-5.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio dos grãos de cada uma das sínteses (nm)	Tamanho médio dos grãos das <i>Sínteses 5.1-5.5</i> (nm)	Desvio padrão (nm)	Coefficiente de variação (%)
5.1	46			
5.2	68	94	44	46
5.4	134			
5.5	128			

Fonte: Autoria própria.

Comparando o tamanho dos cristalitos com o tamanho dos grãos (Tabela 24) notou-se que os grãos obtidos nas *Sínteses 5.1, 5.2, 5.4 e 5.5* foram maiores do que os cristalitos. Isso permitiu sugerir que houve presença de policristais, ou seja, houve mais de um cristalito em cada grão. Contudo, para a confirmação desta possibilidade seria necessário a realização da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Tabela 24- Comparação do tamanho médio do cristalito com o tamanho do grão de NPs-ZnO obtidos nas *Sínteses 5.1, 5.2, 5.4 e 5.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito (nm)	Tamanho médio do grão (nm)
5.1 (20 mL)	25 ± 2	46 ± 10
5.2 (4 mL)	25 ± 2	68 ± 14
5.4 (1 mL)	29 ± 6	134 ± 25
5.5 (0,5 mL)	25 ± 4	128 ± 27

Fonte: Autoria própria.

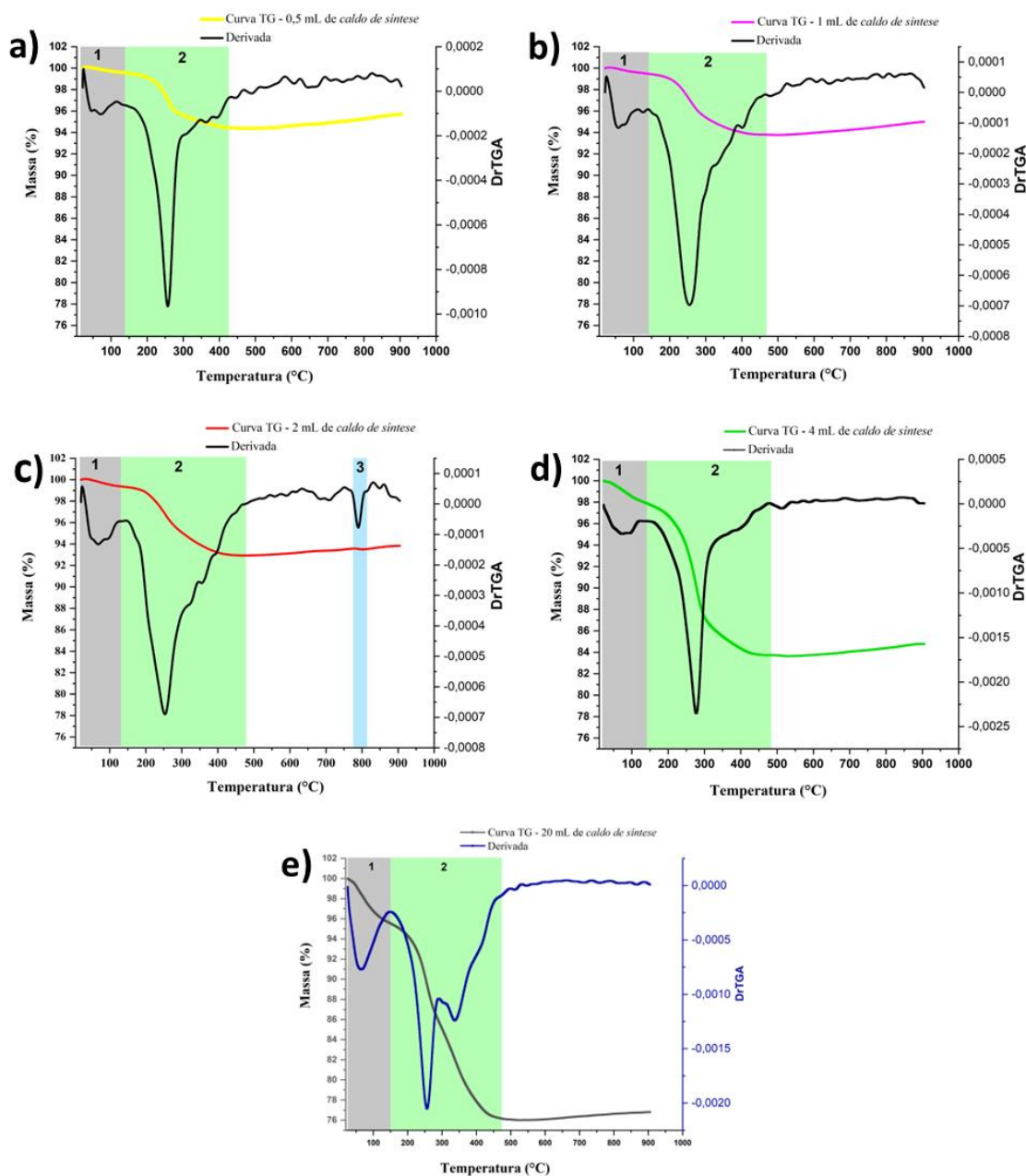
Desta forma, foi observado que na *Sínteses 5* a quantidade de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C adicionado na síntese teve influência sobre o tamanho dos grãos de ZnO nas condições de temperatura (32°C), pH (8,0) e concentração do sal de Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M) utilizadas. Verificou-se que abaixo da adição de 1 mL de *caldo de síntese*, obteve-se preferencialmente cristais de ZnO >100 nm. A distribuição de tamanho das NPs-ZnO foi menor nas quantidades de 20 mL e 4 mL de *caldo de síntese*.

6.4.2.5 Análise Termogravimétrica – TG

Para verificar a porcentagem de matéria orgânica presente nas NPs-ZnO, foram feitas análises termogravimétricas das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.1-5.5*. As Figuras 81a.-81e. ilustram as curvas termogravimétricas obtidas em cada uma das sínteses. Foi possível notar que a porcentagem de massa decomposta diminuiu à medida em que a quantidade do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C usado na síntese também diminuiu.

A porcentagem de massa decomposta das amostras de NPs-ZnO nos respectivos intervalos de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), assim como a porcentagem de massa do resíduo de cada síntese a 900°C estão descritas na Tabela 25.

Figura 81- Curvas de TG das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.1-5.5* realizadas com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M, pH 8, 24 h, 32°C , 150 rpm no shaker) variando a quantidade de *caldo de síntese*. (a) 0,5 mL. (b) 1 mL. (c) 2 mL. (d) 4 mL. (e) 20 mL.



Fonte: Autoria própria.

O comportamento térmico nas curvas termogravimétricas das Figuras 81a.-81e. pode ser dividido em dois eventos, 1 e 2. No evento 1 ocorreu a desidratação das NPs-ZnO com a perda de moléculas de água. Na Tabela 25 observou-se que a porcentagem de massa de água nas NPs-ZnO aumentou com o aumento da quantidade de *caldo de síntese*

adicionado nas sínteses 4,5%, 2,1%, 0,6%, 0,5% e 0,4% de saída de água para as respectivas quantidades de *caldo de síntese*, 20 mL; 4 mL; 2 mL; 1 mL e 0,5 mL. Com isso, foi possível inferir que a matéria orgânica favoreceu a adsorção de moléculas de água nas NPs-ZnO.

No evento 2, abaixo de 500°C, ocorreu a decomposição da matéria orgânica. Como era o esperado, as NPs-ZnO em que nas sínteses foram usadas uma maior quantidade de *caldo de síntese* tiveram maior porcentagem de matéria orgânica decomposta 19,4%; 14,2%; 6,4%; 5,7% e 5,1% para as sínteses feitas com 20 mL, 4 mL, 2 mL, 1 mL e 0,5 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, respectivamente.

Na Seção 6.4.2.4 (p. 146) foi mostrado que à medida em que a quantidade de *caldo de síntese* utilizada na síntese foi diminuída, houve um aumento no tamanho das NPs-ZnO. A análise termogravimétrica comprovou que de fato onde houve a presença de maior quantidade de matéria orgânica nas NPs-ZnO, *Síntese 5.1* (20 mL) e *Síntese 5.2* (4 mL), o material teve tamanhos menores, uma vez que a matéria orgânica poderia estar atuando como estabilizante favorecendo o controle do tamanho das partículas.

Tabela 25- Porcentagem de massa decomposta das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5* nos respectivos intervalos de temperatura (°C) e a porcentagem de massa de resíduo a 900°C.

Evento	Amostra	Intervalo de temperatura (°C)	Massa (%)
1	<i>Síntese 5.1</i> (20 mL)	26 – 147	4,5
	<i>Síntese 5.2</i> (4 mL)	23 - 138	2,1
	<i>Síntese 5.3</i> (2 mL)	23 - 129	0,6
	<i>Síntese 5.4</i> (1 mL)	23 - 142	0,5
	<i>Síntese 5.5</i> (0,5 mL)	22 - 135	0,4
2	<i>Síntese 5.1</i> (20 mL)	147 - 471	19,4
	<i>Síntese 5.2</i> (4 mL)	138 - 482	14,2
	<i>Síntese 5.3</i> (2 mL)	129 - 477	6,4
	<i>Síntese 5.4</i> (1 mL)	142 - 464	5,7
	<i>Síntese 5.5</i> (0,5 mL)	135 - 424	5,1
Resíduo (ZnO)	<i>Síntese 5.1</i> (20 mL)	900°C	76,1
	<i>Síntese 5.2</i> (4 mL)		83,7
	<i>Síntese 5.3</i> (2 mL)		92,9
	<i>Síntese 5.4</i> (1 mL)		93,8
	<i>Síntese 5.5</i> (0,5 mL)		94,5

Fonte: Autoria própria.

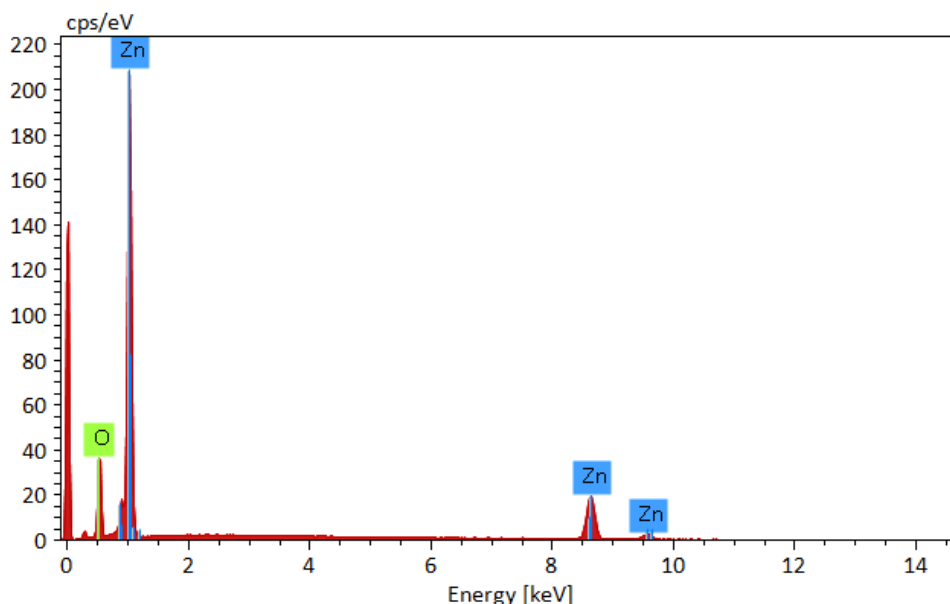
Conforme o esperado, a *Síntese 5.5* contendo menor quantidade de *caldo de síntese* (0,5 mL) forneceu maior porcentagem de massa de resíduo, 94,5% e a *Síntese 5.1* contendo maior quantidade de *caldo de síntese* (20 mL) forneceu menor quantidade de resíduo. Vale ressaltar que os resíduos das análises de TG são as NPs-ZnO.

Ainda foi possível observar nas Figuras 81a.-81e. que após a perda da matéria orgânica as curvas termogravimétricas apresentaram um pequeno crescimento, o que representa em menos de 1% de ganho de massa.

A fim de verificar quais elementos estariam presentes nas amostras após 500°C, foi feita uma análise de EDS do resíduo de TG da amostra de NPs-ZnO da *Síntese 5.2* (4 mL de caldo de síntese) (Figura 82). A análise foi feita em três regiões da amostra, na Figura 82 foi mostrado o espectro de uma região. Os espectros das outras duas regiões foram mostrados no **Apêndice D**.

Os elementos identificados pela técnica de Espectroscopia de Energia Dispersiva foram apenas o zinco e o oxigênio (Figura 82). Provavelmente outros elementos, se presentes, estariam abaixo do limite de detecção desta técnica. No entanto, como houve acréscimo de massa, foi possível sugerir que houve absorção de oxigênio para suprir as vacâncias deste elemento na estrutura cristalino do ZnO, pois como mostrado na Tabela 26, o teor de zinco (56,30 % \pm 2,24 %) foi maior do que o teor de oxigênio (43,70 % \pm 2,24 %). Contudo, seria necessário aprofundar o estudo dos defeitos de estrutura das NPs-ZnO obtidas para afirmar esta hipótese.

Figura 82- Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do resíduo após análise termogravimétrica das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 26- EDS, % atômica dos elementos presentes no resíduo de TG das NPs-ZnO da *Síntese 5.2*

Elemento	Região 1		Região 2		Região 3		% Atômica média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
	% Atômica	Erro (%)	% Atômica	Erro (%)	% Atômica	Erro (%)			
Zn	54,62	10,07	55,43	9,92	58,84	9,84	56,30	2,24	3,98
O	45,38	2,11	44,57	2,04	41,16	1,83	43,70	2,24	5,12

Fonte: Autoria própria.

6.4.3 Síntese 6 – Estudos da variação da concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Nesta etapa dos estudos buscou-se otimizar a concentração do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ frente à obtenção das NPs-ZnO. Na *Síntese 6* foram padronizados os valores de pH em 8,0. Na Seção 5.5 verificou-se que as quantidades de *caldo de síntese* de 4 mL e 20 mL proporcionaram tamanhos de grãos de ZnO menores e com menor distribuição de tamanho. Assim, por ser uma menor quantidade, foi padronizado o volume de 4 mL de *caldo de síntese* para prosseguir os estudos. A temperatura permaneceu em 32°C, assim como a agitação no shaker por 24 h a 150 rpm.

6.4.3.1 Aspecto visual

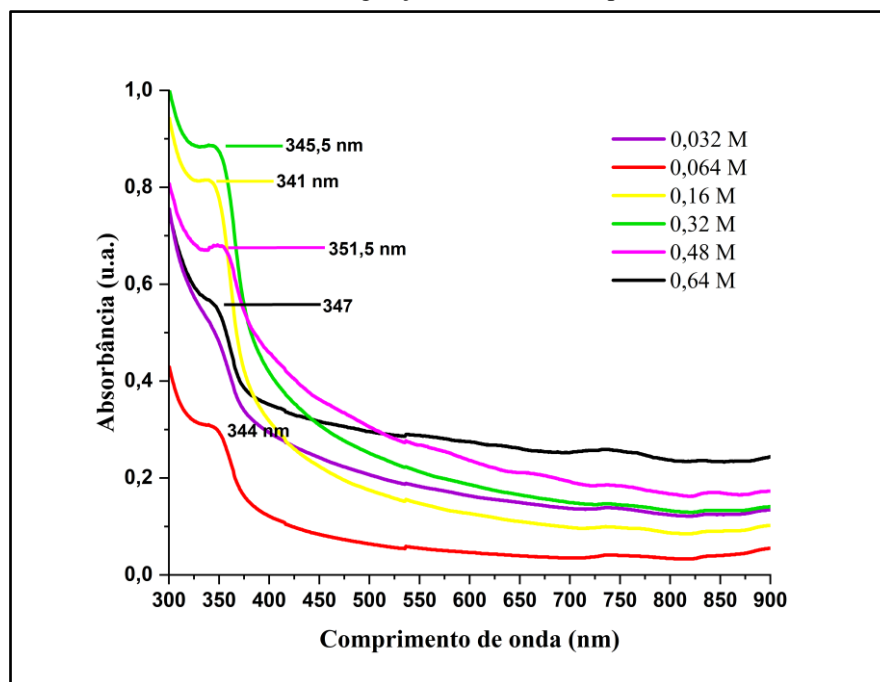
Também na *Síntese 6* o material obtido, após centrifugação, foi um sólido de coloração branca para todas as condições realizadas, com aspecto similar ao ilustrado na Figura 68 (Seção 6.4.1.1, p.134).

6.4.3.2 UV-vis

Como mostrado na Figura 83, o espectro UV-vis revelou bandas com máximo de absorção nos comprimentos de ondas de 344 nm, 341 nm, 345,5 nm e 351,5 e 347 nm, que foram atribuídas à absorção intrínseca da energia de *band gap* pelas NPs-ZnO resultante da transição eletrônica da banda de valência para a banda de condução ($\text{O}_{2p} \rightarrow \text{Zn}_{4s}$).

Observou-se que na menor (0,032 M) e na maior (0,64 M) concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, as bandas de absorção foram mais discretas.

Figura 83- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 6* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C em pH 8,0 e em diferentes concentrações do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,032 M, 0,064 M, 0,16 M, 0,32 M, 0,48 M e 0,64 M) à temperatura de 32°C por 24 h em agitação orbital de 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

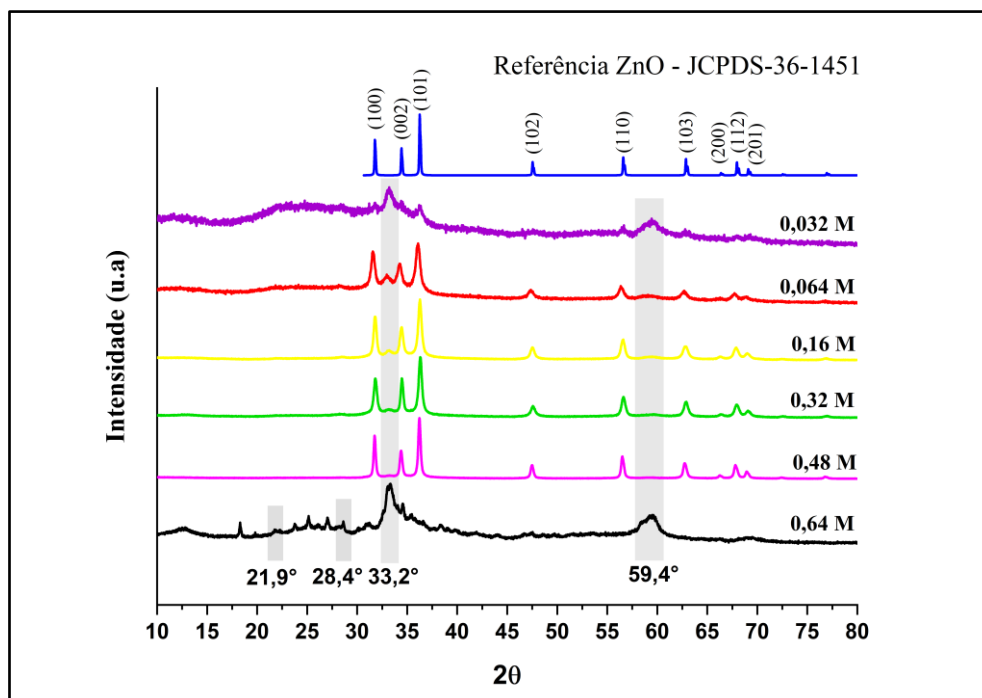
6.4.3.3 Difração de raios-X

Os difratogramas apresentados na Figura 84 mostraram a formação da estrutura cristalina wurtzita do ZnO para as *Sínteses 6.2-6.5* em conformidade com o difratograma de referência JCPDS-36-1451. As difrações observadas nos picos 31,7°, 34,4°, 36,2°, 47,7°, 56,8°, 62,9°, 66,4°, 68,2° e 69,3° corresponderam aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina hexagonal wurtzita do ZnO.

Como discutido na Seção 6.4.1.3 (p. 136), os picos presentes em 21,9°; 28,4°; 33,2° e 59,0° podem ser observados no difratograma de referência do ϵ -Zn(OH)₂ (ICSD#50447) (Figura 48, p. 114).

Visualmente, as *Sínteses 6.3, 6.4 e 6.5* cuja concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ foi 0,16 M, 0,32 M e 0,48 M, respectivamente, apresentaram boa cristalinidade. Observou-se ainda que na síntese feita com 0,48 M do sal precursor o plano (100) foi mais acentuado do que nas demais sínteses, o que pôde conferir ao cristalito uma morfologia distinta.

Figura 84- Difratogramas de raios-X da *Síntese 6* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C em pH 8,0 e em diferentes concentrações do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,032 M, 0,064 M, 0,16 M, 0,32 M, 0,48 M e 0,64 M) à temperatura de 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker.



Fonte: Autoria própria.

No difratograma da *Síntese 6.1* (0,032 M) observou-se ainda quatro picos, de forma pouco acentuada, em 31,8°; 36,2°; 56,6°; 62,8° característicos dos planos (100) (101) (110) e (103) do ZnO e outros dois picos mais proeminentes em 33,2° e 59,4° característicos dos planos cristalográficos do $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$ (Figura 48, p.114).

Os dois picos em 33,2° e 59,4° também foram observados de forma bastante acentuada no difratograma da *Síntese 6.6* (0,64 M), além de outros picos mais discretos em 21,9° e 28,4° também característicos do $\epsilon\text{-Zn}(\text{OH})_2$. Observou-se ainda a presença de picos característicos dos planos (100) e (002) do ZnO em 31,2° e 34,5°.

A partir dos difratogramas das *Sínteses 6* notou-se que nas concentrações extremas (0,032 M e 0,64 M) a formação de hidróxido foi favorecida em relação à formação de ZnO, nas condições de síntese realizadas. Os picos largos provavelmente foram devido a formação de partículas bastante pequenas de hidróxido de zinco, chamados de sementes ou germes.

Como apresentado na **Introdução**, na Seção 1.4.4 (p. 49) o estabilizante pode impedir o crescimento das NPs-ZnO. Assim, na *Síntese 6.1* (0,032 M), diante da baixa concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a matéria orgânica do *caldo de síntese*, que pode atuar como um estabilizante, pode ter dificultado a formação dos cristais de ZnO.

Os tamanhos médios de cristalito das NPs-ZnO foram calculados usando a equação de Debye-Scherrer com base na largura-a-meia-altura dos picos fornecidos pelos difratogramas da Figura 84. Os picos usados bem como os cálculos realizados estão no **Apêndice A**. O tamanho médio das NPs-ZnO calculado foi de 19 ± 5 nm; 20 ± 3 nm; 24 ± 3 nm e 27 ± 1 nm para as concentrações de sal precursor 0,064 M, 0,16 M, 0,32 M e 0,48 M, respectivamente (Tabela 27).

Tabela 27- Tamanho médio dos cristalitos e o desvio padrão das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 6.2-6.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito (nm)	Desvio padrão (nm)
6.2 (0,064 M)	19	5
6.3 (0,16 M)	20	3
6.4 (0,32 M)	24	3
6.5 (0,48 M)	27	1

Fonte: Autoria própria.

Observou-se que o tamanho do cristalito cresceu com o aumento da concentração do sal de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Tabela 28- Comparação do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 6.2-6.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito de cada síntese (nm)	Tamanho médio do cristalito das <i>Sínteses 6.2-6.5</i> (nm)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
6.2 (0,064 M)	19	23	4	16
6.3 (0,16 M)	20			
6.4 (0,32 M)	24			
6.5 (0,48 M)	27			

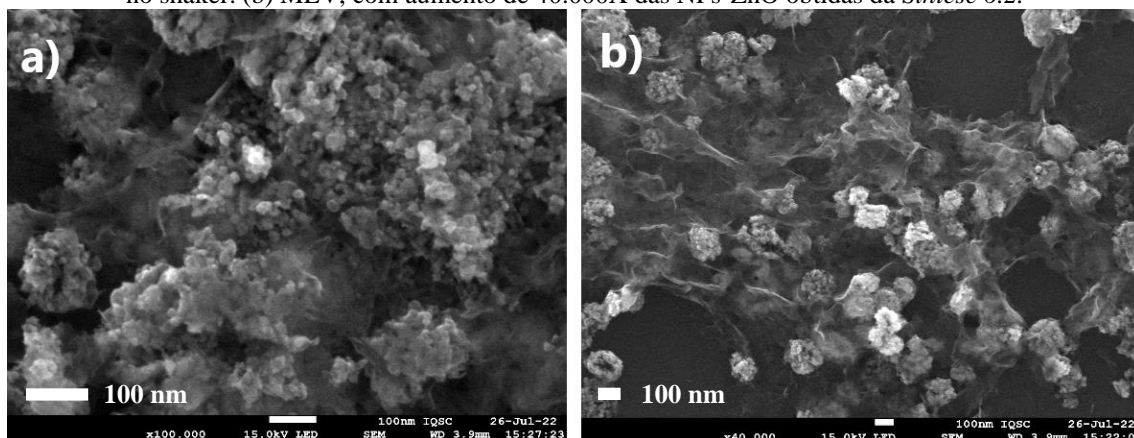
Fonte: Autoria própria.

Como mostrado na Tabela 28, a variação do tamanho médio dos cristalitos, entre as *Sínteses 6.2-6.5*, foi de 4 e o coeficiente de variação dos tamanhos de cristalito foi de 16%, indicando que houve uma média dispersão dos valores, ou seja, que a variação da concentração do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de uma síntese para outra teve uma certa influência sobre os tamanhos dos cristalitos obtidos. No entanto, seria necessário realizar replicatas suficientes para afirmar estatisticamente as variações dos tamanhos dos cristalitos obtidos com a variação da concentração do sal precursor.

6.4.3.4 MEV

Devido ao resultado obtido nas análises de DRX, onde observou-se a presença de poucos picos e bastante discretos de ZnO, não foi feita a microscopia das *Sínteses 6.1* (0,032 M) e *6.6* (0,64 M). Nas Figuras 85 – 87 tem-se as imagens de MEV das *Sínteses 6.2 – 6.5*.

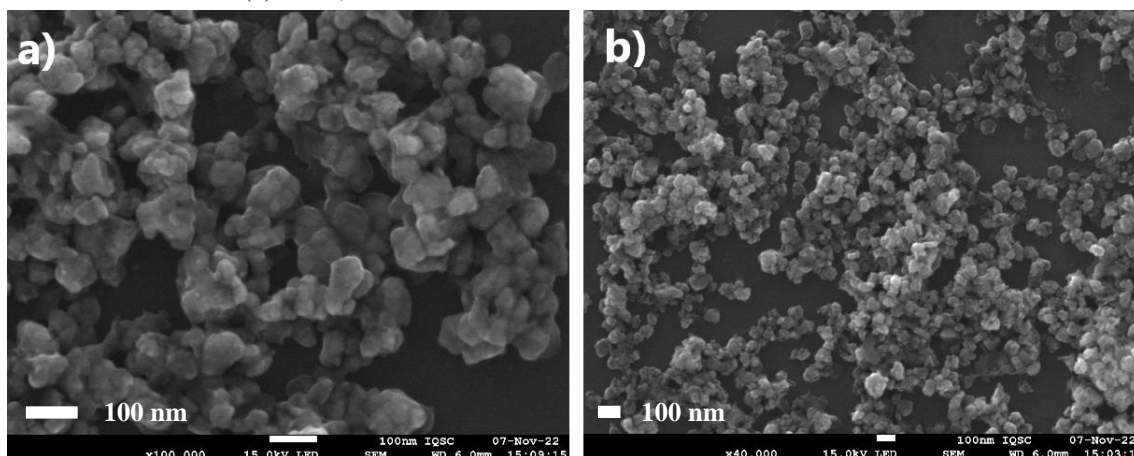
Figura 85- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.2* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,064 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 6.2*.



Fonte: Autoria própria.

As NPs-ZnO (Figura 85a. e b.) obtidas na *Síntese 6.2* (0,064 M) aparentemente tiveram tamanhos bem pequenos, no entanto, apesar da análise ter sido feita com a amostra bastante diluída, as NPs-ZnO ficaram muito aglomeradas, não sendo possível fazer a contagem do tamanho. Ao que parece, foram formados vários aglomerados lembrando o aspecto de cachos de uvas.

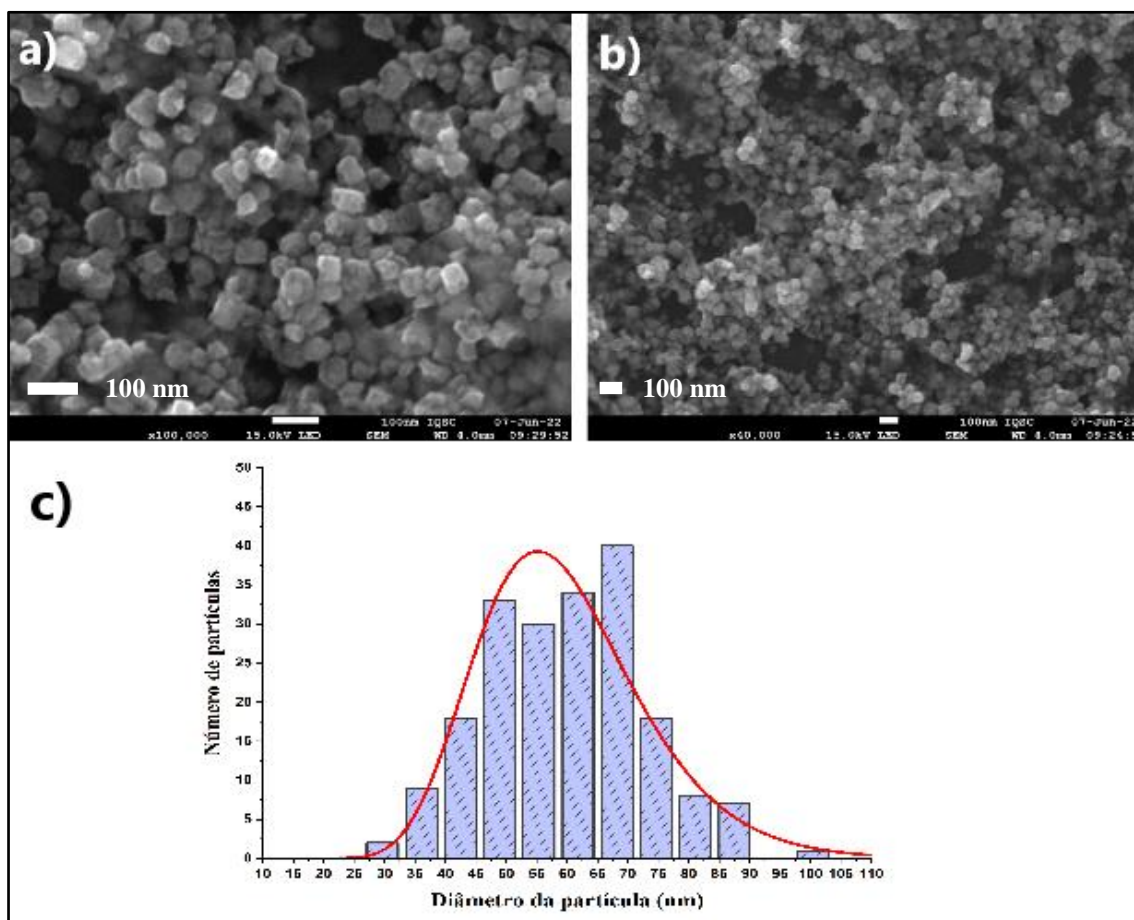
Figura 86 - Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.3* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,16 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.3*.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 86a. observou-se que as NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.3* (0,16 M) ficaram bastante aglomeradas, ao que parece algumas partículas fundiram-se umas nas outras. Este aspecto também não foi favorável para efetuar a contagem. Aparentemente tiveram tamanho abaixo de 100 nm, com morfologia diversa.

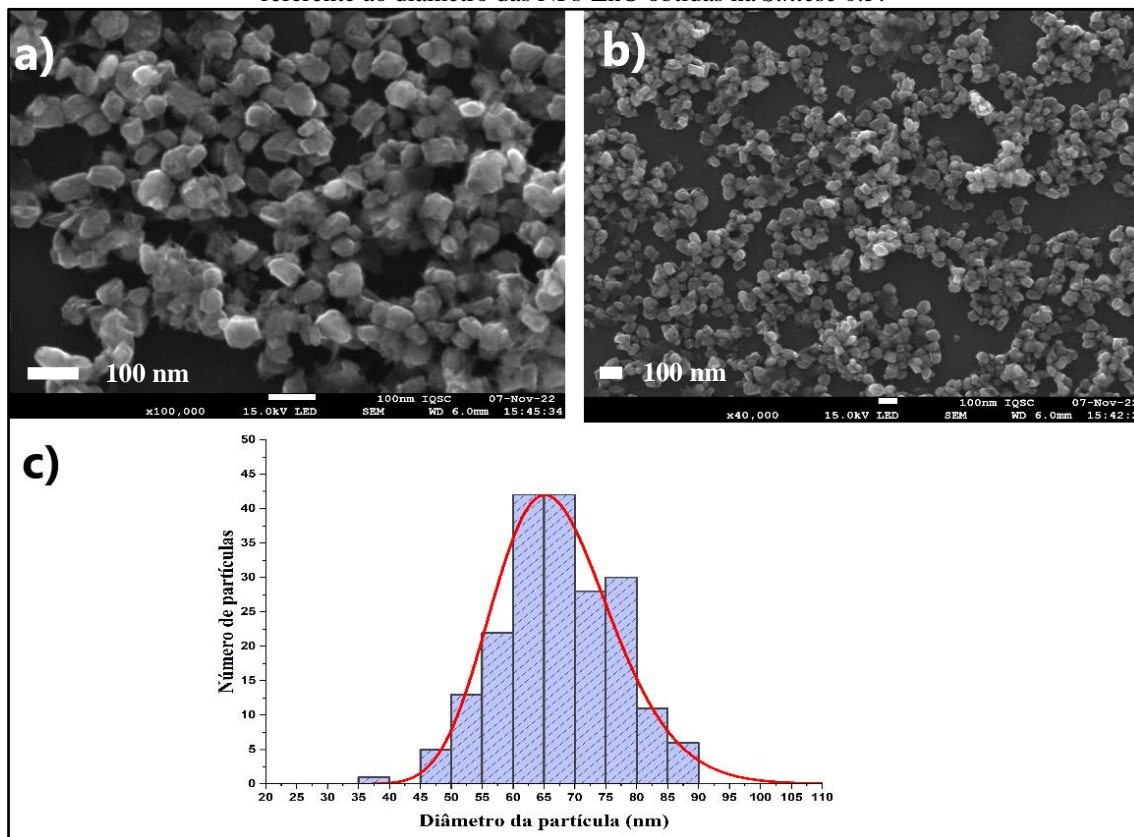
Figura 87- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.4* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.4*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.4*.



Fonte: Autoria própria.

Nas Figuras 87a. e b. tem-se as NPs-ZnO da *Síntese 6.4* (0,32 M), observou-se a obtenção de morfologias diversas, mas em sua maioria cúbica, com tamanho médio de 60 ± 13 nm. E nas Figuras 88a. e b. tem-se as NPs-ZnO da *Síntese 6.5* (0,48 M), nas quais também foi observado a obtenção de morfologias diversas, em sua maioria cúbica, com tamanho médio de 67 ± 10 nm.

Figura 88 - Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.5* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,48 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (b) MEV, com aumento de 40.000X das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.5*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 6.5*.



Fonte: Autoria própria.

A Tabela 29 mostra o tamanho médio dos grãos obtidos nas *Sínteses 6.4* e *6.5*. Observou-se que na *Síntese 6.5* o coeficiente de variação foi de 14%, ou seja, em relação à *Síntese 6.4*, foi possível obter uma menor dispersão entre os tamanhos das NPs-ZnO nas condições de síntese realizadas. Isto também pôde ser constatado pelos dados dos histogramas das Figuras 87c. e 88c.

Tabela 29- Tamanho médio dos grãos, desvio padrão e coeficiente de variação das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 6.4-6.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio dos grãos (nm)	Desvio padrão (nm)	Coefficiente de variação (%)
6.4 (0,32 M)	60	13	22
6.5 (0,48 M)	67	10	14

Fonte: Autoria própria.

Comparando o tamanho dos cristalitos com o tamanho dos grãos (Tabela 30) observou-se que os grãos obtidos nas *Sínteses 6.4* e *6.5* foram maiores do que os cristalitos, assim, foi possível inferir que os cristais foram policristais, ou seja, que houve

mais de um cristalito em cada grão. Contudo, para a confirmação desta possibilidade seria necessário a realização da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Tabela 30- Comparação do tamanho médio do cristalito com o tamanho do grão das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 6.4 e 6.5*.

Síntese	Tamanho médio do cristalito (nm)	Tamanho médio do grão (nm)
6.4	24 ± 3	60 ± 13
6.5	27 ± 1	67 ± 10

Fonte: Autoria própria.

É interessante observar que na *Síntese 6* (Seção 5.2.3) nas condições de pH, temperatura, agitação e quantidade de matéria orgânica, a obtenção das NPs-ZnO foi dependente da concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Neste estudo, observou-se que a obtenção das NPs-ZnO ficou restrita entre as concentrações $>0,032$ M e $<0,64$ M. Dado que, nestas concentrações, mínima (0,032 M) e máxima (0,64 M), estudadas houve poucos picos, e bastante discretos, característicos de cristais de ZnO de estrutura hexagonal. Em concentrações menores de sal precursor, normalmente, a formação de cristais menores pode ser favorecida (YUSOF et al, 2019). Assim, possivelmente em concentrações menores do sal precursor, os cristais não atingiram o tamanho crítico do núcleo para crescerem no pH 8 e/ou a matéria orgânica presente, atuando como estabilizante, dificultou o crescimento dos grãos.

Logo, na *Síntese 6* onde a concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ foi estudada, observou-se que o aumento da concentração do sal favoreceu a obtenção de cristalitos maiores de NPs-ZnO.

6.4.4 Síntese 7 – Estudo da variação do tempo da síntese

Com a finalidade de estudar em qual tempo de síntese as NPs-ZnO foram obtidas e estudar seu envelhecimento, foi realizada a *Síntese 7*. As NPs-ZnO foram sintetizadas variando o tempo de reação em 1 h, 6h, 12 h, 24 h e 72 h.

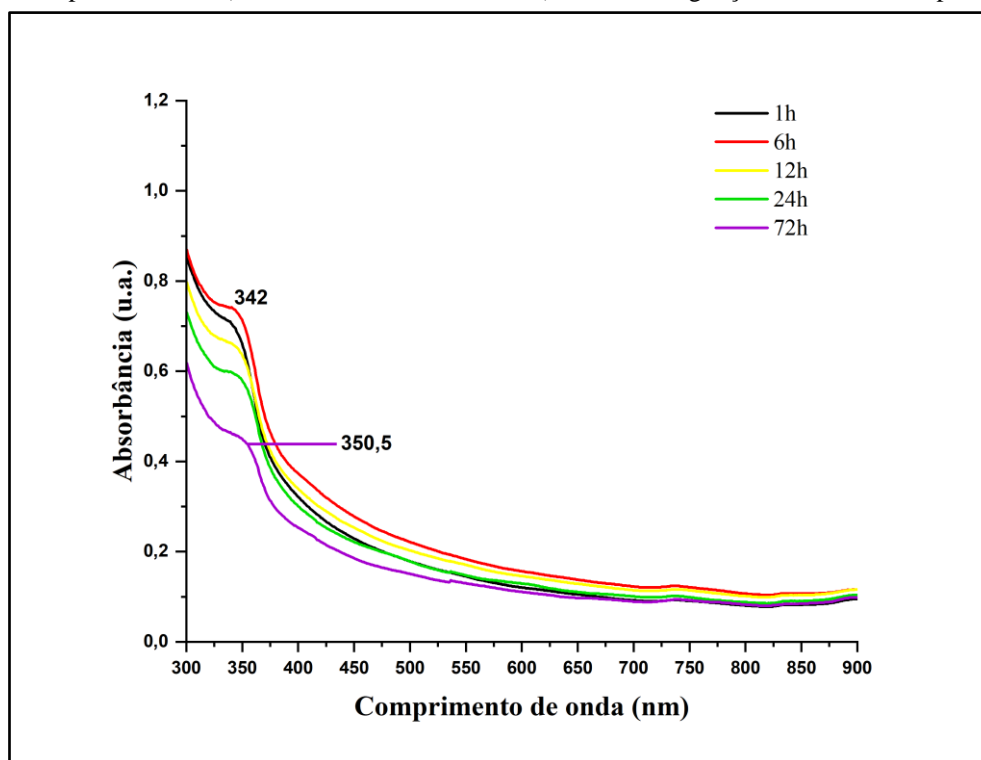
6.4.4.1 Aspecto visual

As NPs-ZnO foram obtidas usando 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, solução do sal de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ na concentração de 0,32 M, em pH 8,0 em agitação de 150 rpm no shaker a 32°C. O aspecto visual das NPs-ZnO obtidas após centrifugação foi de um sólido branco, O material obtido nas *Sínteses 8.1-8.6*, após 24 h de síntese, apresentaram aspecto visual de um sólido branco, sendo a Figura 68 representativa dos sólidos obtidos (Seção 6.4.1.1, p 134).

6.4.4.2 UV-vis

Na Figura 89 os espectros de absorção na região UV-vis apresentaram uma banda com o máximo de absorção em 342 nm para as sínteses realizadas em 1 h, 6 h, 12 h e 24 h e em 350,5 para a síntese feita em 72 h, o que está de acordo com a formação das NPs-ZnO e em concordância com as observações das sínteses anteriores (*Sínteses 4, 5 e 6*).

Figura 89- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 7* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0 e em diferentes tempos de síntese (1h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 72 h) à 32°C em agitação orbital de 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

Nas análises de UV-vis nos espectros obtidos observou-se absorção de radiação já na primeira hora de síntese. Como esta análise foi preliminar, pois no estudo de WANG et al. (2015) foi verificada absorção nesta região pelo ϵ -Zn(OH)₂, foi feita análise de DRX para confirmar a presença de cristas de ZnO nos tempos de síntese em que foram estudadas.

KUNDU et al. (2014) em seus estudos onde obtiveram as NPs-ZnO pela via extracelular usando *caldo de síntese* da bactéria *Rhodococcus pyridinivorans*, observaram que houve formação, relativamente lenta, das nanopartículas nas primeiras 24 h de síntese, que foi verificada através dos baixos valores de absorbância. No entanto, nos intervalos de tempo posteriores (48 h, 60 h e 72 h) os autores observaram um aumento significativo na magnitude da absorbância, o que poderia indicar uma maior formação de

NPs-ZnO. Os autores usaram como precursor o sal de sulfato de zinco hidratado a 0,1 M, mas não relataram se durante a síntese das NPs-ZnO houve o ajuste de pH. Em seus estudos a síntese foi mantida em agitação a 120 rpm por 72 h e 32°C.

Pela observação dos espectros de absorção na região do UV-vis da Figura 89, em 72 h de síntese houve um pequeno deslocamento do comprimento de onda absorvido para a direita, ou seja, para a região de maior comprimento de onda e de menor energia. Em 72 h a absorção ocorreu em 350,5 nm, provavelmente neste tempo as NPs-ZnO estavam maiores, devido ao processo de envelhecimento de Ostwald. Conforme discutido na Seção 6.4.2.2 (p. 142), o aumento do comprimento de onda tem a possibilidade de estar relacionado com fatores físicos como o aumento do tamanho das NPs-ZnO. O tamanho dos grãos de ZnO obtidos nas *Sínteses 7* foram estudados através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura exposta na Seção 6.4.4.4 (p. 164).

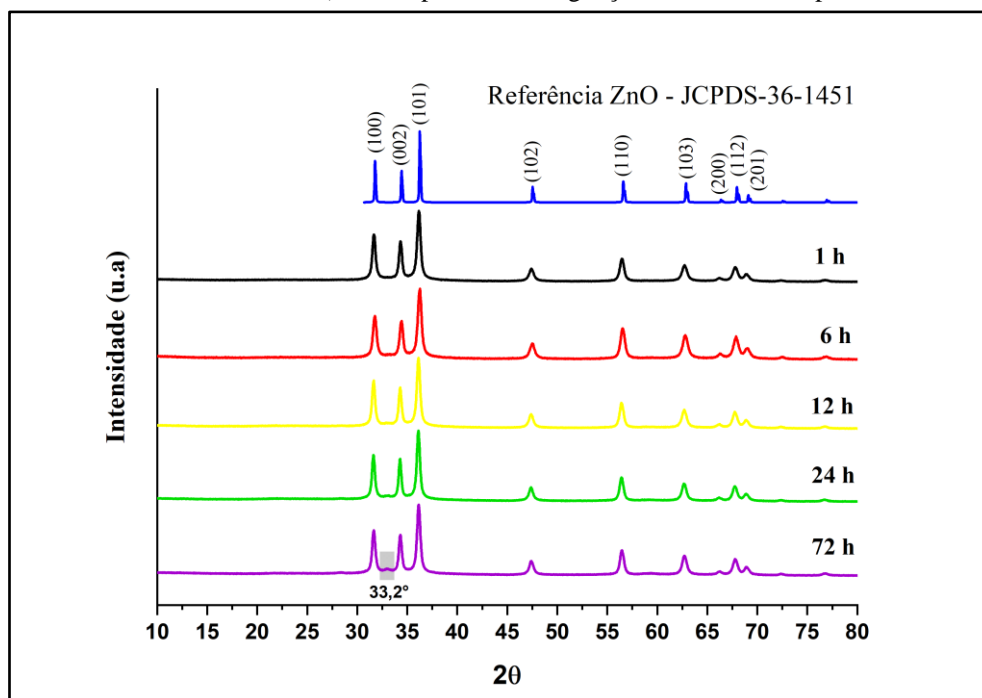
6.4.4.3 Difração de raios-X

Os difratogramas (Figura 90) mostram a formação de estrutura cristalina wurtzita do ZnO logo após a primeira hora de síntese até 72 h, o que está em conformidade com o difratograma de referência JCPDS-36-1451. A difração observada nos picos 31,7°, 34,4°, 36,2°, 47,7°, 56,8°, 62,9°, 66,4°, 68,2° e 69,3° corresponderam aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina hexagonal wurtzita do ZnO.

Nesta *Síntese 7*, conforme mostrado na Figura 90, os difratogramas estavam bastante cristalinos. Foi observado pico característico do ϵ -Zn(OH)₂ apenas após 72 h em 33,2°. Assim, nas 24 h primeiras horas, foram obtidas NPs-ZnO mais puras, sem a presença de outra fase cristalina no meio. Logo, pôde-se inferir que a absorção no comprimento de onda em 342 nm na análise de UV-vis (Seção 6.4.4.2, p. 161) na primeira hora de síntese, foi devido a presença de NPs-ZnO.

Com base na confirmação da presença de cristais de ZnO na primeira hora de síntese, foi possível sugerir que as condições de reação da *Síntese 7*, favoreceram a obtenção das NPs-ZnO em menor tempo do que a síntese proposta por KUNDU et al. (2014) que foi de 72 h.

Figura 90- Difratomogramas da *Síntese 7* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0 e em diferentes tempos de síntese (1h, 6 h, 12 h, 24 h e 72 h) à 32°C por 24 h em agitação orbital de 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

Os tamanhos médios dos cristallitos de ZnO foram calculados usando a equação de Debye-Scherrer com base na largura-a-meia-altura dos picos fornecidos pelos difratogramas da Figura 90. Os picos usados bem como os cálculos realizados estão no **Apêndice A**. Os tamanhos médios dos cristallitos de ZnO foram 20 ± 3 nm, 18 ± 3 nm, 21 ± 3 nm, 22 ± 4 nm e 21 ± 3 nm para os tempos de síntese 1 h, 6 h, 12 h, 24 h e 72 h, respectivamente (Tabela 31).

Tabela 31- Tamanho médio e desvio padrão dos cristallitos das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 7.1-7.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristallito (nm)	Desvio padrão (nm)
7.1 (1 h)	20	3
7.2 (6 h)	18	3
7.3 (12 h)	21	3
7.4 (24 h)	22	4
7.5 (72 h)	21	3

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado na Tabela 32, houve uma uniformidade no tamanho médio dos cristallitos de ZnO independentemente do tempo de síntese. O coeficiente de variação do tamanho de cristallito entre as sínteses foi de 7%, mostrando uma baixa dispersão dos resultados obtidos entre 1 h e 72 h de síntese.

Tabela 32- Comparação do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 7.1-7.5*.

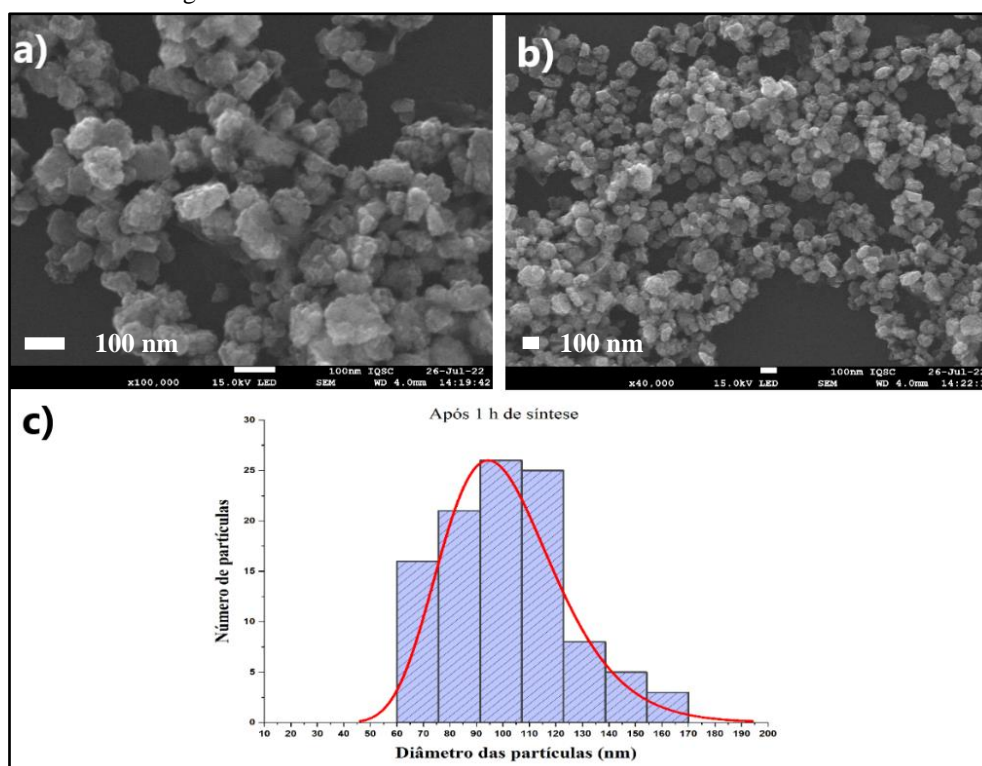
<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito de cada síntese (nm)	Tamanho médio do cristalito das <i>Sínteses 7.1-7.5</i> (nm)	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
7.1 (1 h)	20	20	1	7
7.2 (6 h)	18			
7.3 (12 h)	21			
7.4 (24 h)	22			
7.5 (72 h)	21			

Fonte: Autoria própria.

6.4.4.4 MEV

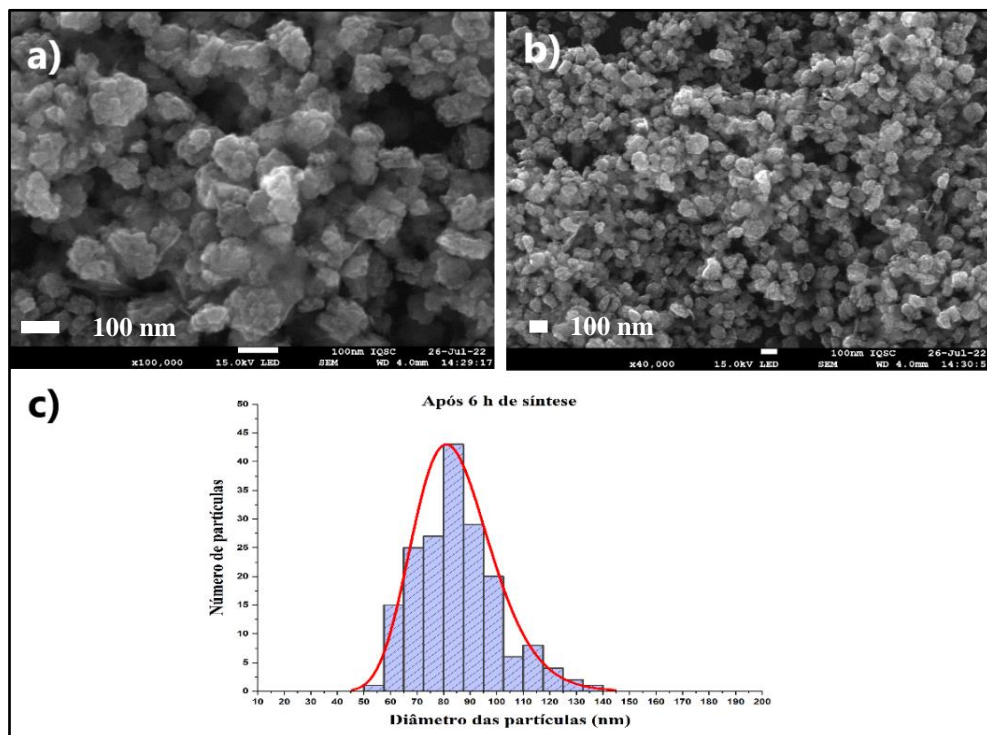
As Figuras 91 – 95 apresentam as micrografias de MEV, com os histogramas, da *Síntese 7* após 1 h, 6 h, 12 h, 24 h e 72 h, respectivamente.

Figura 91- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.1* após 1 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.1*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.1*.



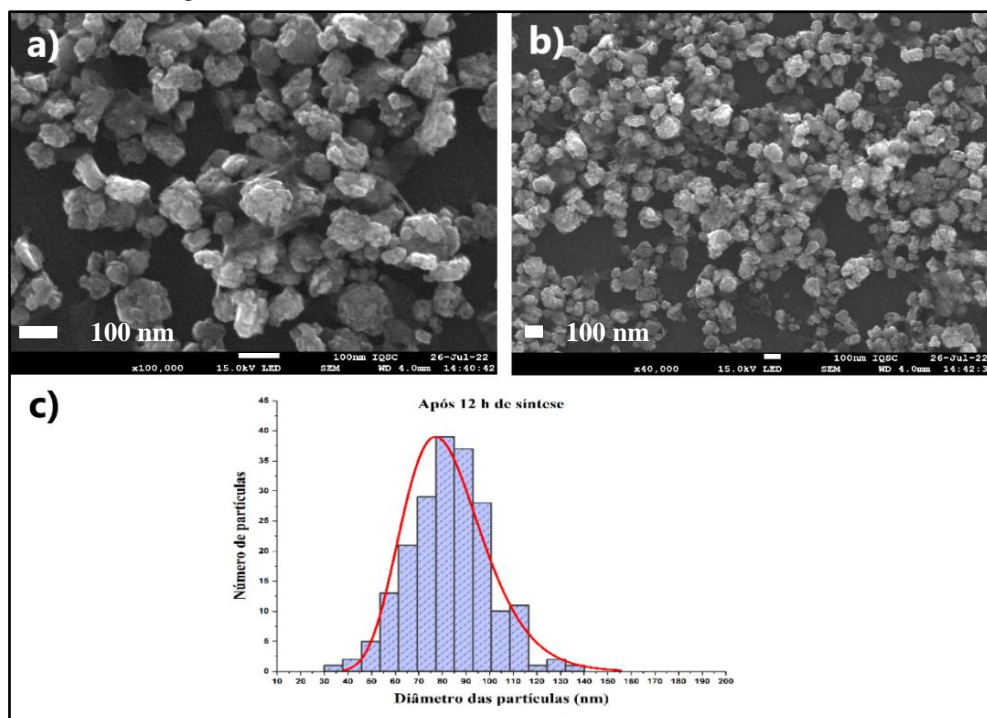
Fonte: Autoria própria.

Figura 92- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.2* após 6 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.2*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.2*.



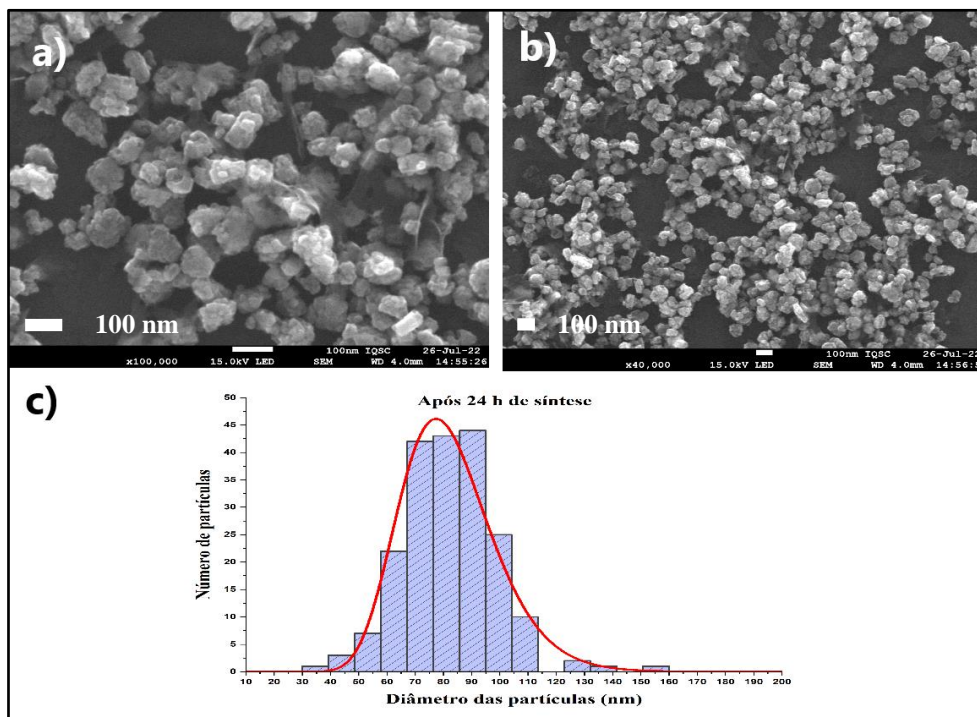
Fonte: Autoria própria.

Figura 93- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.3* após 12 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.3*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.3*.



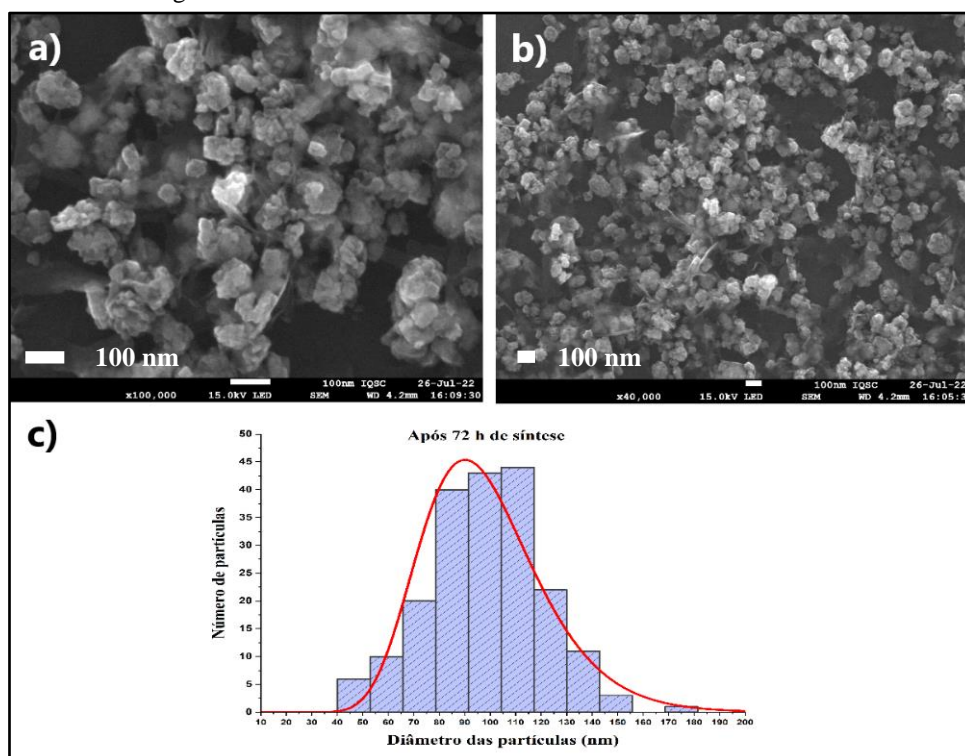
Fonte: Autoria própria.

Figura 94- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.4* após 24 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.4*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.4*.



Fonte: Autoria própria.

Figura 95- Microscopia Eletrônica de Varredura das NPs-ZnO. (a) MEV, com aumento de 100.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.5* após 72 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker. (b)) MEV, com aumento de 40.000X, das NPs-ZnO obtidas da *Síntese 7.5*. (c) Histograma referente ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 7.5*.



Fonte: Autoria própria.

Observou-se que as nanopartículas de ZnO obtidas na *Síntese 7* não diferiram em suas morfologias, apresentaram formas diversas, sendo em sua maioria, aproximadamente, cúbicas. As NPs-ZnO, em todas as sínteses (7.1-7.5) apresentaram superfície bastante irregular. Nos histogramas (Figuras 91.c e 95.c) observou-se a presença de partículas maiores (>170 nm) após 1 h e 72 h. Após 72 h de síntese o aparecimento de grãos pôde ser atribuído ao envelhecimento de Ostwald. Os grãos com os menores tamanhos em média foi de 85 ± 15 nm; 83 ± 17 nm e 82 ± 17 nm obtidas após 6 h, 12 h e 24 h, respectivamente (Tabela 33).

Tabela 33- Tamanho médio dos grãos, desvio padrão e coeficiente de variação das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 7.1-7.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio dos grãos (nm)	Desvio padrão (nm)	Coeficiente de variação (%)
7.1 (1 h)	102	23	23
7.2 (6 h)	85	15	18
7.3 (12 h)	83	17	20
7.4 (24 h)	82	17	20
7.5 (72 h)	98	24	24

Fonte: Autoria própria.

Comparando os valores dos tamanhos médios dos grãos (Tabela 34), obtidos em cada uma das sínteses, observou-se que a variação de tamanho do grão de ZnO entre as *Sínteses 7.1-7.5* foi baixa (10%) ou seja, a variação do tempo de síntese não promoveu alterações significativas no tamanho dos grãos. Contudo, foi possível verificar que os grãos maiores foram obtidos em 72 h, conforme esperado.

Tabela 34- Comparação do tamanho médio dos grãos de ZnO obtidos nas *Sínteses 7.1-7.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio dos grãos de cada uma das sínteses (nm)	Tamanho médio dos grãos das <i>Sínteses 5.1-5.5</i> (nm)	Desvio padrão (nm)	Coeficiente de variação (%)
7.1 (1 h)	102			
7.2 (6 h)	85			
7.3 (12 h)	83	90	9	10
7.4 (24 h)	82			
7.5 (72 h)	98			

Fonte: Autoria própria.

Comparando o tamanho dos cristalitos com o tamanho dos grãos (Tabela 35) observou-se que os grãos obtidos nas *Sínteses 7.1 - 7.5* foram maiores do que os cristalitos. Assim, foi possível sugerir que houve formação de policristais, ou seja, cristais contendo mais de um cristalito em cada grão. Contudo, para a confirmação desta possibilidade seria necessário a realização da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Tabela 35- Comparação do tamanho médio do cristalito com o tamanho do grão obtidos nas *Sínteses 7.1-7.5*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito (nm)	Tamanho médio do grão (nm)
7.1 (1 h)	20 ± 3	102 ± 23
7.2 (6 h)	18 ± 3	85 ± 15
7.3 (12 h)	21 ± 3	83 ± 17
7.4 (24 h)	22 ± 4	82 ± 17
7.5 (72 h)	21 ± 3	98 ± 24

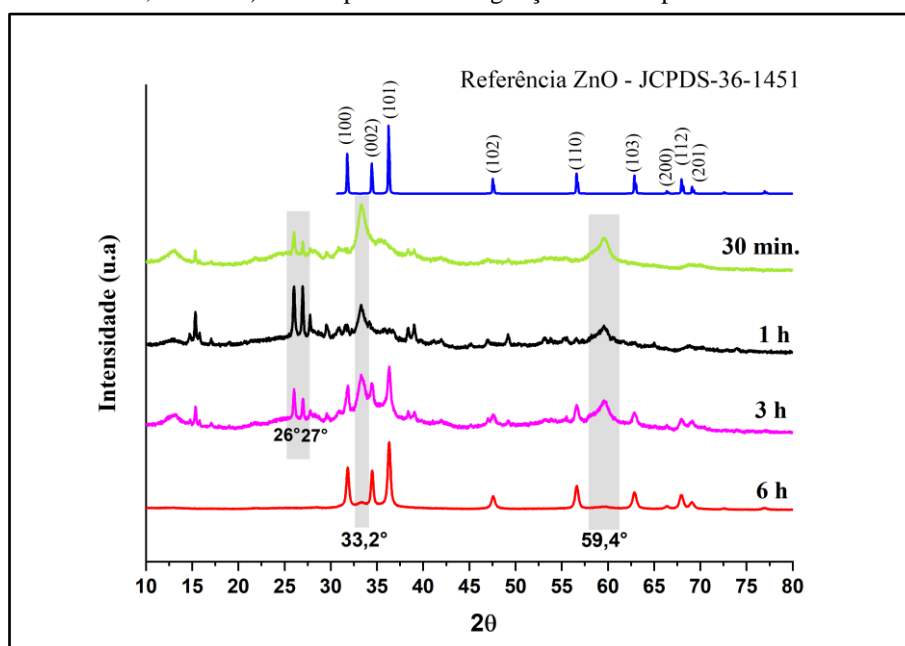
Fonte: Autoria própria.

Em resumo, observou-se que as NPs-ZnO foram obtidas com 1 h de síntese. Também foi verificado o processo de envelhecimento de Ostwald das NPs-ZnO no tempo de 72 h. O tempo ótimo de síntese das NPs-ZnO deste estudo foram entre 6 e 24 h. Nestes tempos obteve-se NPs-ZnO mais puras, com grãos menores e com menor variação de tamanho.

6.4.4.5 Repetibilidade

A fim de verificar a repetibilidade dos resultados e de avaliar a formação das NPs-ZnO em um tempo menor que 1 h, foi feita uma *Segunda Síntese 7* nos tempos de síntese de 30 minutos, 1 h, 3 h e 6 h. A Figura 96 mostra os difratogramas obtidos.

Figura 96- Difratogramas da *Síntese 7* realizada com 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0 em tempos diferentes de síntese (30 minutos, 1h, 3 h e 6 h) à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker.



Fonte: Autoria própria.

Analisando os difratogramas obtidos na Figura 96, observou-se que os resultados foram bastante diferentes dos obtidos na síntese anterior (Seção 6.4.4.3, p. 162) e (Figura

90, p. 163). Na *Primeira Síntese 7*, em 1 h, já foram obtidas as NPs-ZnO com um difratograma apresentando boa cristalinidade do material (Figura 90).

Na *Segunda Síntese 7*, todos os picos dos planos característicos do ZnO foram aparecer no difratograma, já bem formados, em 6 h de síntese.

Em 30 minutos e em 1 h de síntese houve a predominância dos picos característicos do ϵ -Zn(OH)₂ em 26°, 27°, 33,2° e 59,4°. Em 30 minutos começaram a aparecer os picos dos planos (100) e (101) dos cristais de ZnO em 31,02° e 35,6°, respectivamente.

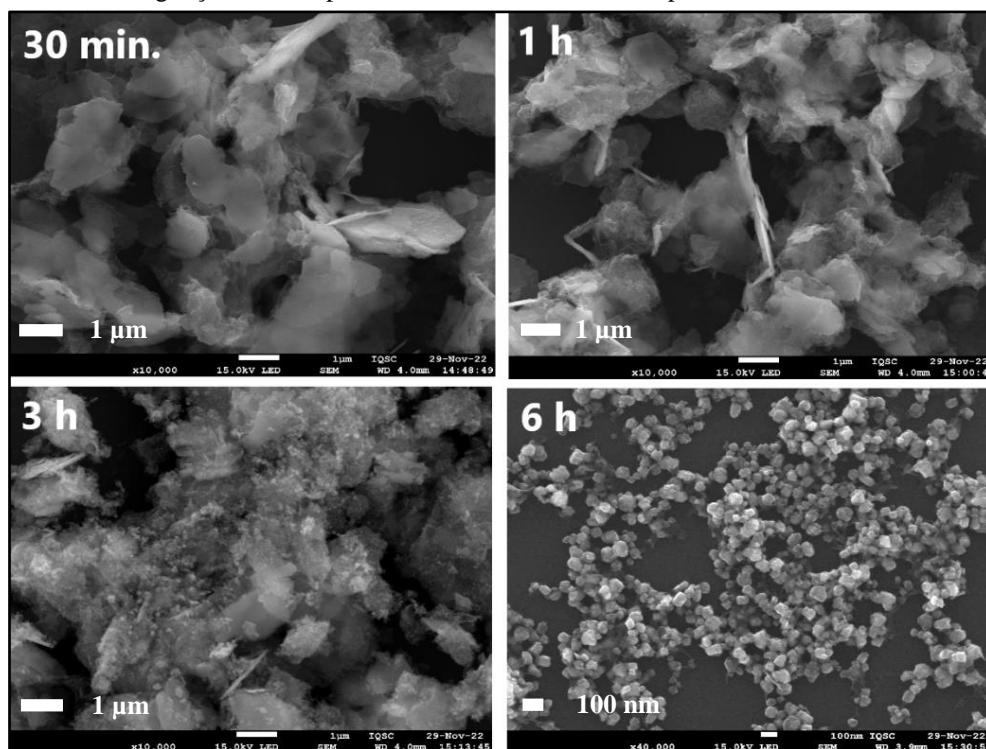
Na *Segunda Síntese 7* em 1 h além dos picos, característicos do ZnO, que aparecem em 30 minutos, começam a aparecer no difratograma os picos dos planos (110) e (102) em 56,8° e 47,4°, respectivamente.

Em 3 h de síntese, todos os outros planos característicos do ZnO, (002) (103) (200) (112) (201), começaram a ser observados no difratograma, mas ainda havia a presença dos picos do ϵ -Zn(OH)₂ bastante acentuados.

Em 6 h o difratograma mostrou a formação de estrutura cristalina do ZnO em conformidade com o difratograma de referência JCPDS-36-1451. A difração observada nos picos 31,69°, 34,36°, 36,22°, 47,69°, 56,76°, 62,9°, 66,37°, 68,24° e 69,30° corresponderam aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina hexagonal wurtzita do ZnO. Ainda foram observados os picos característicos dos planos cristalinos do ϵ -Zn(OH)₂ em 33,2° e 59,4°, no entanto, de forma pouco acentuada. O difratograma com 6 h de síntese apresentou boa cristalinidade.

A Figura 97 mostra as imagens obtidas na microscopia eletrônica de varredura. Foi interessante observar que as imagens estão em acordo com os difratogramas da Figura 96, em 30 minutos e em 1 h observou-se a presença de um material lamelar típico do hidróxido de zinco. Em 3 h foi possível perceber a formação das NPs-ZnO, onde pequenas partículas foram se estruturando e já em 6 h de síntese houve a presença dos grãos de ZnO.

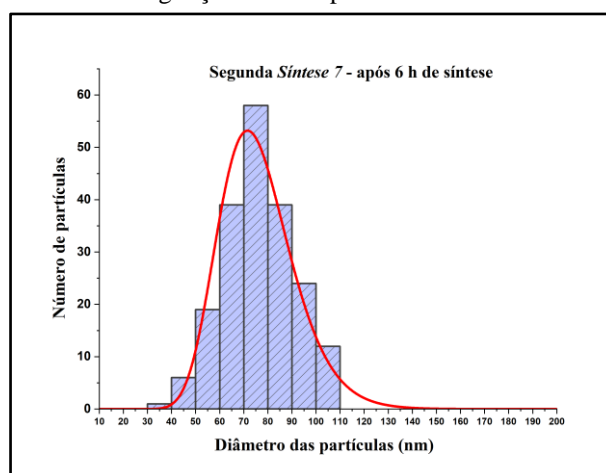
Figura 97- Microscopia Eletrônica de Varredura da *Segunda Síntese 7* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker em diferentes tempos: 30 min.; 1 h; 3 h e 6 h.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 98 mostra o histograma obtido com a distribuição de tamanho dos grãos obtidos na *Segunda Síntese 7*, após 6 h de síntese.

Figura 98- Histograma da *Segunda Síntese 7*, após 6 h de síntese realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C em agitação de 150 rpm no shaker.



Fonte: Autoria própria.

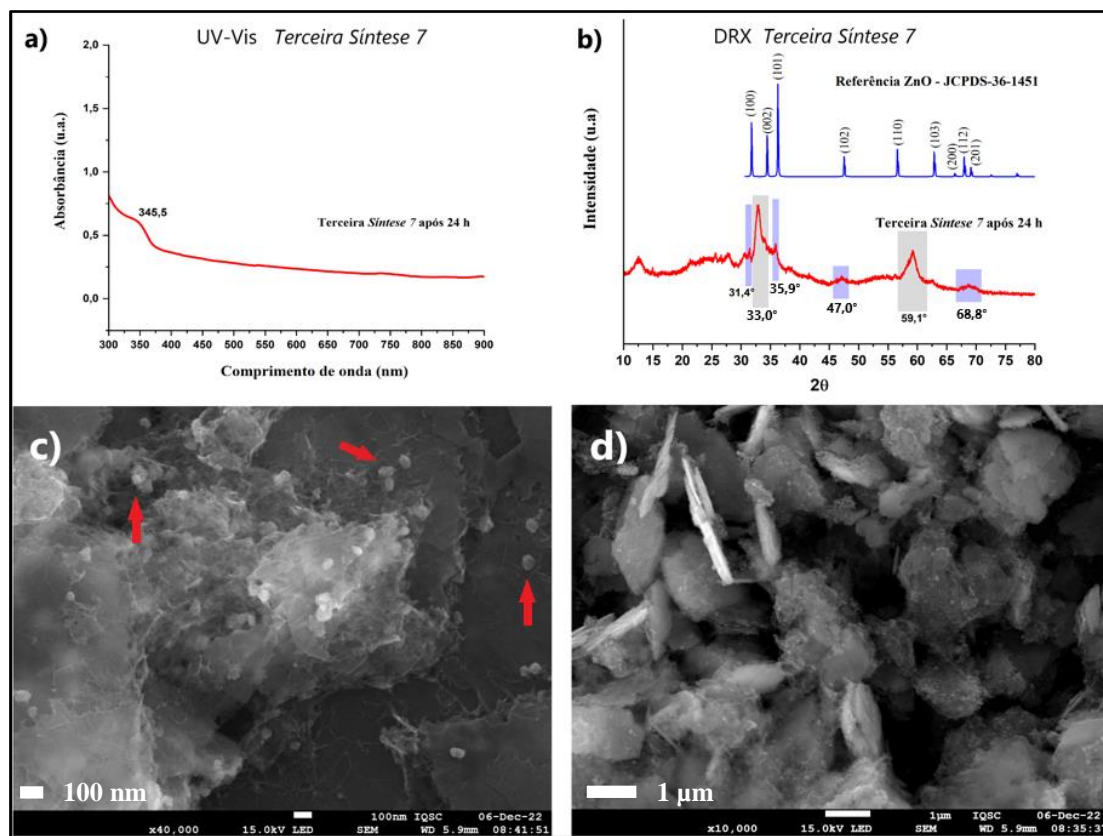
O tamanho médio das NPs-ZnO foi de 76 ± 15 nm e o coeficiente de variação foi de 19%. Estes valores foram similares aos obtidos na *Primeira Síntese 7*, após 6 h de síntese (tamanho médio do grão 85 ± 15 nm e coeficiente de variação de 18%).

Em resumo, com base nos dados obtidos no estudo de repetibilidade da *Segunda Síntese 7*, nos tempos de 1 h, 3 h e 6 h, notou-se que o tempo de síntese para a obtenção das NPs-ZnO possui uma dependência da constituição do *caldo de síntese*. Tanto a *Primeira* quanto a *Segunda Síntese 7* foram realizadas nas mesmas condições (pH, temperatura, agitação, quantidade do *caldo de síntese*, concentração do sal precursor), utilizando o mesmo estoque de cultura da bactéria *B. megaterium* RF1C, sendo apenas feitas em dias distintos.

A principal diferença observada entre a *Primeira* e a *Segunda Síntese 7* foi o tempo de formação das NPs-ZnO. Assim, a obtenção das NPs-ZnO fica vulnerável às substâncias secretadas e excretadas pela bactéria, que pode sofrer alterações em seu metabolismo, ou ainda fica dependente das concentrações destas substâncias no *caldo de síntese*. Contudo, houve repetibilidade tanto na morfologia quanto no tamanho das NPs-ZnO após 6 horas de síntese na *Primeira* e na *Segunda Síntese 7*.

Diante dos resultados obtidos, realizou-se uma *Terceira Síntese 7*. A Figura 99 mostra sua caracterização.

Figura 99- Caracterização da *Terceira Síntese 7* realizada com a bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, com 4 mL de *caldo de síntese* à 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. (a) Espectro da análise de UV-vis. (b) Difratoograma. (c) Microscopia eletrônica de varredura, MEV, com aumento de 40.000X. (d) Microscopia eletrônica de varredura, MEV, com aumento de 100.000X



Fonte: Autoria própria.

Na *Terceira Síntese 7*, no espectro de absorção na região do UV-vis foi obtida uma banda em 345,5 nm (Figura 99a.). No entanto, na análise de difração de raios-X (Figura 99b.), observou-se a presença de forma mais acentuada dos picos característicos dos planos cristalinos do ϵ -Zn(OH)₂ em 33° e 59,1°. Em 31,4°; 35,86°; 47° e 68°, notou-se picos largos e bastante discretos característicos dos planos cristalinos (100) (101) (102) e (112) do ZnO. Na imagem obtida da microscopia eletrônica de varredura (Figuras 99c. e d.), observou-se a presença predominante de morfologia lamelar e algumas pequenas partículas que podem ser de ZnO (indicadas pelas setas vermelhas na figura). Estas imagens estão em acordo com os resultados obtidos no difratograma. A absorção no comprimento de onda de 345,5 nm pode ser devido tanto a presença de pequenas partículas de ZnO quanto do ϵ -Zn(OH)₂ (WANG et al., 2015).

Conforme exposto no parágrafo acima, foi possível inferir que na *Terceira Síntese 7* não se obteve as NPs-ZnO com as mesmas características em que se obteve na *Primeira* e na *Segunda Síntese 7*. Nas três sínteses realizadas foram utilizadas as mesmas condições de pH, temperatura, quantidade do *caldo de síntese*, concentração do sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O e velocidade de agitação.

Conforme visto tanto nos **Controles** quanto nos resultados da *Síntese 5*, onde foi variada a quantidade do *caldo de síntese*, a constituição do *caldo de síntese* teve grande importância para a obtenção das NPs-ZnO. Sendo assim, foi possível sugerir que na *Terceira Síntese 7* pôde ter ocorrido alguma mudança no metabolismo da bactéria *B. megaterium* RF1C fazendo com que ela não liberasse para o *caldo de síntese*, ou liberasse em quantidade diferente, o(s) composto(s) envolvido(s) na obtenção das NPs-ZnO.

Estudando ainda a repetibilidade das sínteses, tem-se que as *Sínteses 5.2, 6.4 e 7.4* foram realizadas sob as mesmas condições de síntese: 4 mL do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, o sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O na concentração de 0,32 M em pH 8, à temperatura de 32°C por 24 h em agitação de 150 rpm no shaker. A Tabela 36 mostra o tamanho médio dos cristalitos e dos grãos obtidos nas *Sínteses 5.2; 6.4 e 7.4*.

Tabela 36- Comparação do tamanho médio dos cristalitos, e dos grãos de ZnO obtidos nas *Sínteses 5.2; 6.4 e 7.4* que foram realizadas nas mesmas condições e o coeficiente de variação dos grãos.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito (nm)	Tamanho médio do grão (nm)	Coefficiente de variação dos grãos (%)
5.2	25 ± 2	68 ± 14	20
6.4	24 ± 3	60 ± 13	22
7.4	22 ± 4	82 ± 17	20

Fonte: Autoria própria.

Analisando os dados da Tabela 36, notou-se que houve uma proximidade no tamanho dos cristallitos obtidos nas *Sínteses* 5.2; 6.4 e 7.4, 25 ± 2 nm; 24 ± 3 nm e 22 ± 4 nm, respectivamente. No entanto, em relação do tamanho dos grãos de ZnO, observou-se que houve similaridade apenas no tamanho médio dos grãos entre as *Sínteses* 5.2 e 6.4, sendo 68 ± 14 nm e 60 ± 13 nm, respectivamente. O tamanho médio dos grãos obtidos na *Síntese* 7.4 foi maior, 82 ± 17 nm. Os valores do coeficiente de variação de cada uma das três *Sínteses*, 5.2, 6.4 e 7.4, foram próximos, 20%; 22% e 20% respectivamente, mostrando que nas três sínteses, a distribuição do tamanho dos grãos de ZnO foi parecida, possuem uma média dispersividade.

6.4.5 Síntese 8 – Estudo da variação do tipo de matéria orgânica

Como visto na Seção 1.4.3 (p. 48), a adsorção da matéria orgânica nas faces do ZnO limita o crescimento do cristal na direção da face onde ela foi adsorvida. Assim, a *Síntese* 8 teve como finalidade estudar a morfologia das NPs-ZnO variando o tipo de matéria orgânica e mantendo os outros parâmetros da síntese. Ou seja, o volume de 20 mL da solução do sal precursor a 0,32M, pH em 8,0 e a velocidade de agitação orbital em 150 rpm no shaker à 32°C por 24 h.

Visando estudar o impacto que o teor total de biomoléculas presentes no caldo de cultivo teria na síntese das NPs-ZnO, mais um tempo de cultivo da bactéria (12 h) foi estudado. Desta forma, provavelmente a composição das biomoléculas do *caldo de síntese* obtido com 12 h de cultivo seria diferente da composição do *caldo de síntese* obtido com 24 h de cultivo. Assim, a *Síntese* 8.1 foi feita com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C com 12 h de cultivo.

As *Sínteses* 8.2, 8.3, 8.4, 8.5 e 8.6 foram feitas com *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C com 24 h de cultivo, biossurfactante Ramnolípídeo comercial 440 mg.mL^{-1} , ácido cítrico 0,1 M, *L-cysteine hydrochloride monohydrate* 0,1M e 1,3-diaminopropano 0,1 M, respectivamente.

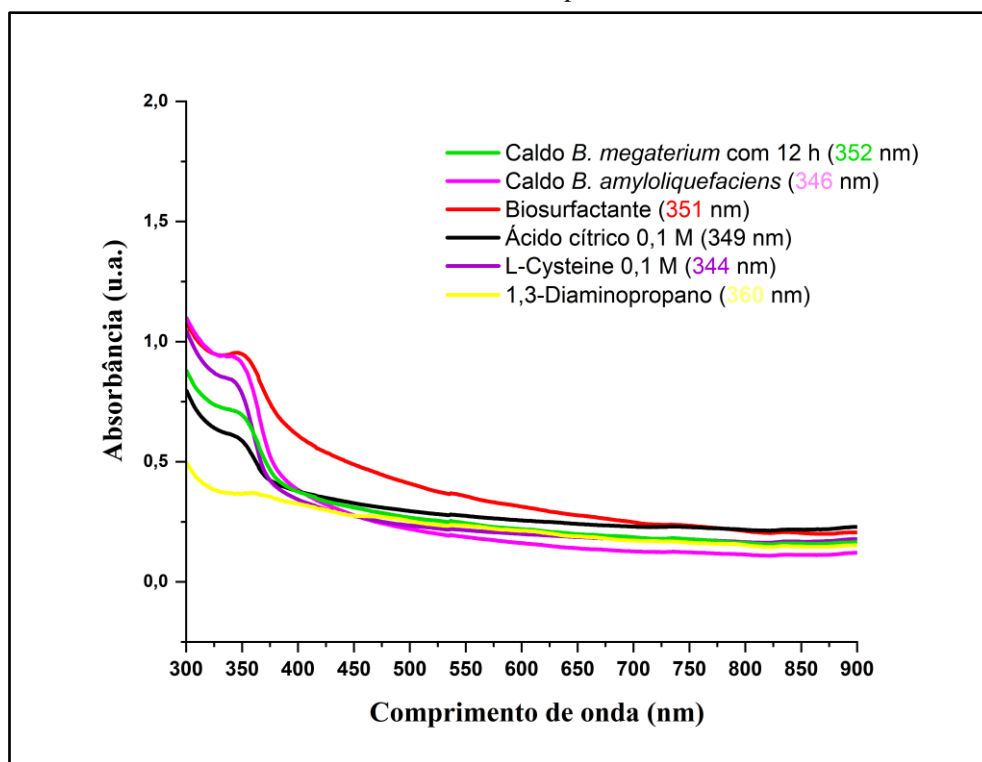
6.4.5.1 Aspecto visual

O material obtido nas *Sínteses* 8.1-8.6, após 24 h de síntese, apresentaram aspecto visual de um sólido branco, sendo a Figura 68 representativa dos sólidos obtidos (Seção 6.4.1.1, p. 134).

6.4.5.2 UV-vis

Na Figura 100 são mostradas bandas com máximo de absorção entre 344 e 360 nm. Estas bandas largas foram tentativamente atribuídas a absorção de radiação pelo ZnO. No intuito de verificar esta atribuição, ou seja, se houve formação de ZnO nas *Sínteses 8* foram obtidos difratogramas de raios X.

Figura 100- Espectros de absorção na região UV-vis da *Síntese 8* realizada com 4 mL de diferentes fontes de matérias orgânicas e o sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,32 M), pH 8,0 à 32°C, 24 h e agitação orbital de 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

6.4.5.3 Difração de raios - X

Na Figura 101, os difratogramas das *Sínteses 8.1*, *8.2*, *8.3* e *8.6* referentes às sínteses realizadas com *caldo de síntese* de 12 h da bactéria *B. megaterium* RF1C, *caldo de síntese* de 24 h da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C, biosurfactante Ramnolípídeo e 1,3-diaminopropano, respectivamente, mostraram difração nos picos 31,7°, 34,4°, 36,2°, 47,7°, 56,8°, 62,9°, 66,4°, 68,2° e 69,3° que foram atribuídos aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201) da estrutura cristalina hexagonal wurtzita do ZnO (w-ZnO), conforme o difratograma de referência JCPDS-36-1451 do w-ZnO.

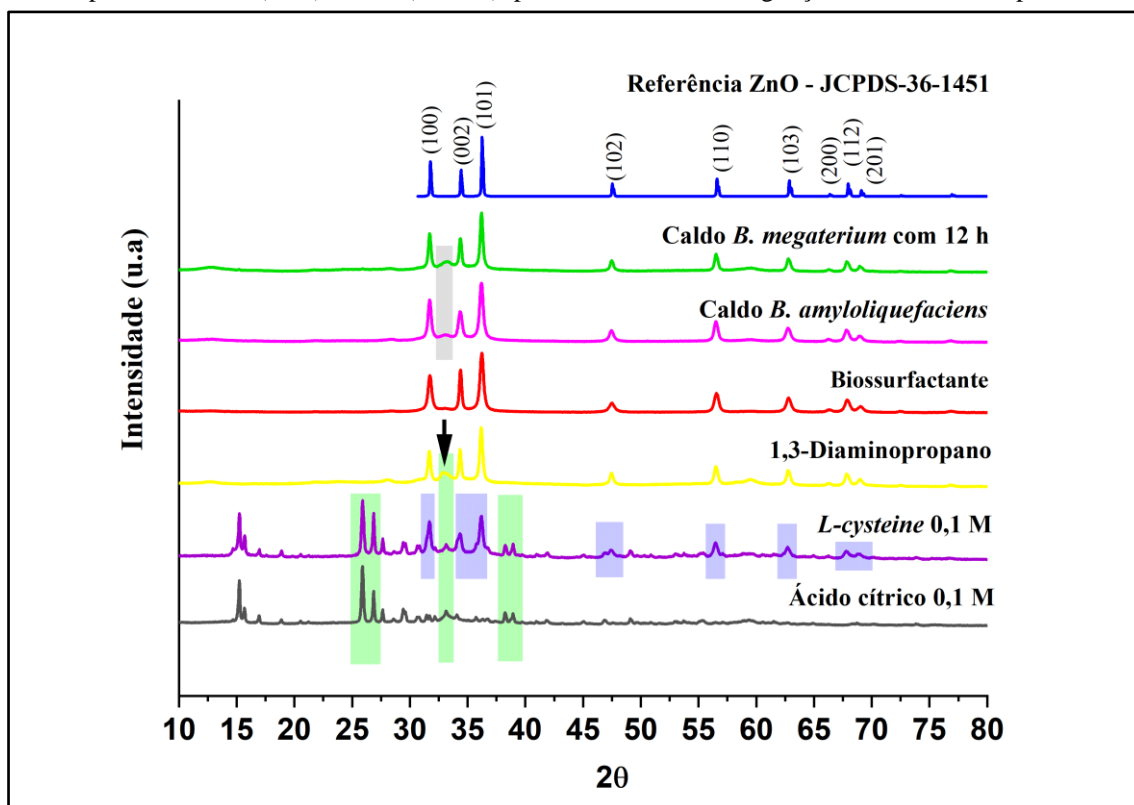
Observou-se ainda que a intensidade dos picos, entre as diferentes sínteses, foi ligeiramente desigual, o que pode conferir cristalitos com formas distintas. Por exemplo,

o plano (002) na síntese feita com o biossurfactante Ramnolípídeo foi mais acentuado (intensidade relativa de 0,65 u.a.) do que este mesmo plano nos cristalitos obtidos na síntese feita com o caldo da bactéria *B. amyloliquefaciens* (intensidade relativa de 0,41 u.a.) sob as mesmas condições de síntese, mas feitas com diferentes fontes de matéria orgânica.

Foi possível notar também a presença de um pico discreto em $33,2^\circ$ (indicado pela seta preta na Figura 101) nos difratogramas das sínteses feitas com o *caldo de síntese* de 12 h da bactéria *B. megaterium* RF1C, o *caldo de síntese* de 24 h da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C e o 1,3-diaminopropano. Conforme discutido nas seções anteriores, este pico, provavelmente, foi devido a presença de ϵ -Zn(OH)₂ (ICSD#50447).

No difratograma da *Sínteses 8. 5*, feita com *L-cysteine* 0,1 M, tem-se a presença tanto de picos característicos dos planos cristalinos do w-ZnO (destacados na Figura 101 pelos retângulos azuis) quanto de picos característicos do ϵ -Zn(OH)₂ (destacados na Figura 101 pelos retângulos verdes) além de outros picos que não foram identificados. Desta forma, nesta síntese a reação de policondensação, onde há saída de água que favorece a transformação do ϵ -Zn(OH)₂ em w-ZnO, foi menos favorecida do que nas *Sínteses 8.1 – 8.4*.

Figura 101- Difratogramas da *Síntese 8* realizada com 4 mL de diferentes matérias orgânicas e o sal precursor de Zn(NO₃)₂.6H₂O (0,32 M), pH 8,0 à 32°C, 24 h e agitação orbital em 150 rpm.



Fonte: Autoria própria.

No difratograma da *Síntese 8.4* feita com ácido cítrico 0,1 M, não foram notados os picos característicos do w-ZnO. Houve a presença de alguns picos (33,2°, 25,9° e 26,8°) que podem ser devido a presença de ϵ -Zn(OH)₂. Nas condições de síntese realizadas com o ácido cítrico, portanto, a formação das NPs-ZnO não foi favorecida.

Provavelmente houve a formação de um quelato muito estável entre o cátion metálico, Zn²⁺ e o ácido cítrico (3 grupos carboxilas) em solução aquosa (CHILITI et al., 2017). Assim, a formação deste quelato estável pode não ter favorecido a reação de policondensação para a obtenção do ZnO.

Dos experimentos com o ácido cítrico ou com a *L-cysteine* foi possível concluir que ambos não atuam como um agente de controle de seletividade e/ou rendimento da síntese do ZnO, indicando que há a necessidade de uma maior diversidade de biomoléculas e/ou presença de proteínas para se ter maior controle de seletividade na síntese, justificando assim, o uso dos caldos de cultura após a proliferação bacteriana.

Os tamanhos médios dos cristalitos de ZnO foram calculados a partir da equação de Debye-Scherrer, com base na largura-a-meia-altura dos picos fornecidos pelos difratogramas. Os valores obtidos foram de 25 ± 4 nm, 22 ± 2 nm, 20 ± 2 nm, 28 ± 3 nm para as *Sínteses 8.1, 8.2, 8.3 e 8.6*, respectivamente (Tabela 37).

Tabela 37- Tamanho médio e desvio padrão dos cristalitos de ZnO obtidos nas *Sínteses 8.1-8.3 e 8.6*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito (nm)	Desvio padrão (nm)
8.1 (Caldo de 12 h <i>B. megaterium</i> RF1C)	25	4
8.2 (Caldo de 24 h <i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C)	22	2
8.3 (Biossurfactante - Ramnolipídeo)	20	2
8.6 (1,3-Diaminopropano)	28	3

Fonte: Autoria própria.

Apesar das *Sínteses 8.1, 8.2, 8.3 e 8.6* terem sido feitas com diferentes composições de matérias orgânicas, observou-se que não houve uma variação estatisticamente significativa no tamanho dos cristalitos, como mostrado na Tabela 38. A variação dos tamanhos dos cristalitos entre as sínteses foi de 15%.

Tabela 38- Comparação do tamanho médio dos cristalitos das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 8.1-8.3 e 8.6*.

<i>Síntese</i>	Tamanho médio do cristalito de cada síntese (nm)	Tamanho médio do cristalito das <i>Sínteses 8.1-8.3 e 8.6</i> (nm)	Desvio padrão (nm)	Coefficiente de variação (%)
8.1	25			
8.2	22			
8.3	20	24	4	15
8.6	28			

Fonte: Autoria própria.

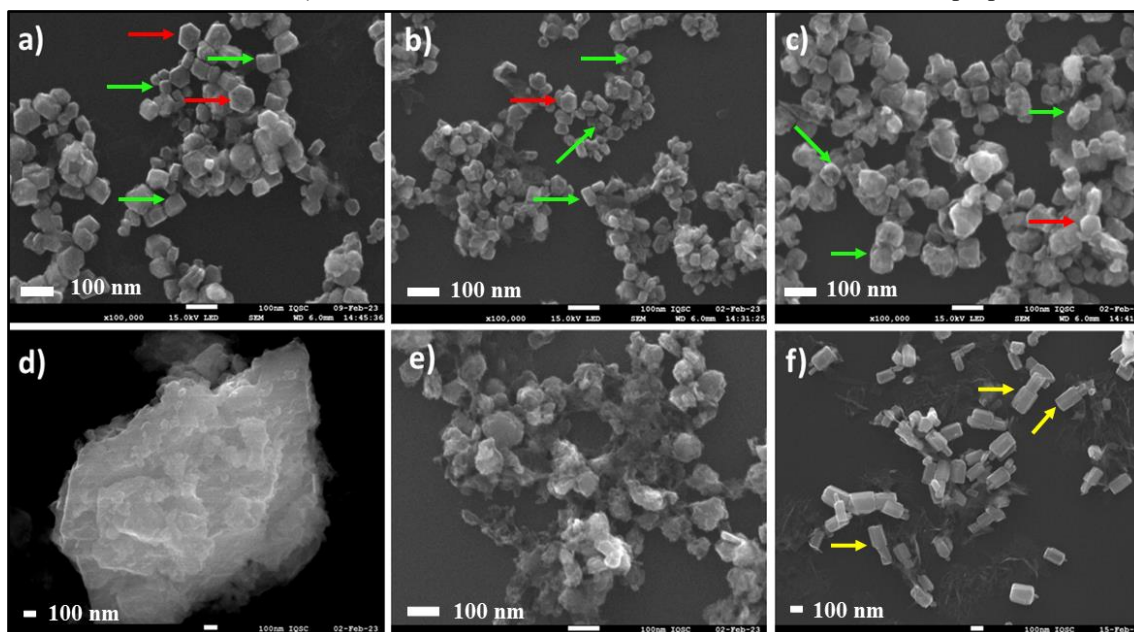
6.4.5.4 MEV

A Figura 102 ilustra as micrografias obtidas nas análises de MEV das *Sínteses* 8.1-8.6.

Foi interessante observar que as NPs-ZnO das Figuras 102a., 102b. e 102c., obtidas nas *Sínteses* 8.1-8.3, feitas com o *caldo de síntese* de 12 h de cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C, o *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C e o biossurfactante Ramnolipídeo, respectivamente, apesar de terem sido sintetizadas com matéria orgânica distintas, apresentaram grãos com morfologia (hábito cristalino) heterogênea, destacou-se alguns grãos com forma hexagonal (indicados pelas setas vermelhas na Figura 102). Contudo, a maioria apresentou hábito cúbico (indicados pelas setas verdes na Figura 102). A presença de heterogeneidade de morfologia em todas as três sínteses indica que a matéria orgânica presente nos meios de síntese age de forma semelhante no direcionamento do crescimento dos cristalitos. A presença da fase cúbica indica que houve uma maior homogeneidade nas velocidades de crescimento das faces cristalinas do que no caso do crescimento dos cristais hexagonais.

Morfologia semelhante às obtidas nas *Sínteses* 8.1-8.3 foram encontradas no trabalho de BIRON (2020) onde foi usado o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ para obtenção de NPs-ZnO via método Poliol à temperatura de 140°C em sistema de refluxo.

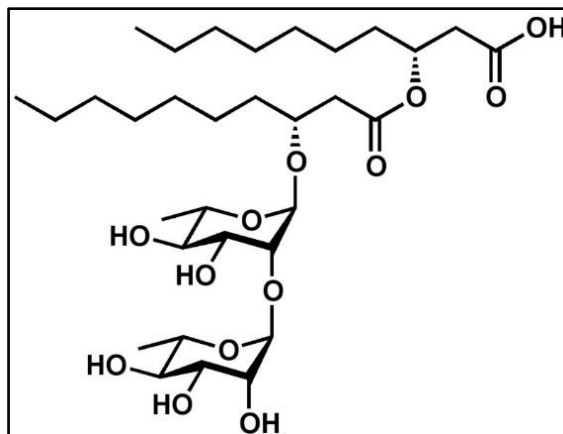
Figura 102- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses* 8 realizada com o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8,0, 32°C, 24 h, 150 rpm no shaker. (a) *Síntese* 8.1 feita com 4 mL de *caldo de síntese* de 12 h de cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C. (b) *Síntese* 8.2 feita com 4 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C. (c) *Síntese* 8.3 feita com 4 mL de biossurfactante Ramnolipídeo. (d) *Síntese* 8.4 feita com 4 mL de ácido cítrico 0,1 M. (e) *Síntese* 8.5 feita com 4 mL de *L-cysteine* 0,1 M. (f) *Síntese* 8.6 feita com 4 mL de 1,3-diaminopropano 0,1 M.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 103 ilustra a estrutura química do biossurfactante Ramnolípídeo comercial usado na *Síntese* 8.3. Nele há presença de grupos hidroxílicos livres na parte glicosídica e de um grupo carboxila livre que possui alta afinidade com o zinco. Assim, foi possível sugerir a ancoragem do biossurfactante Ramnolípídeo junto ao átomo de zinco, que possui ligação pendente no plano (001), do cristal de ZnO.

Figura 103- Estrutura química do biossurfactante Ramnolípídeo comercial.



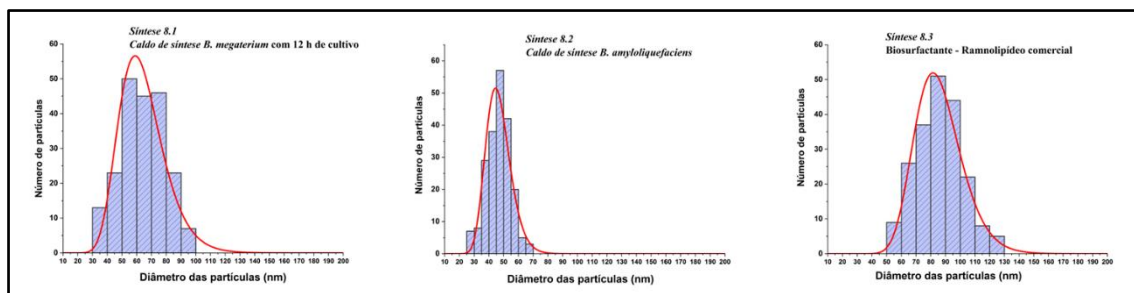
Fonte: Disponível em: Rhamnolipid - Rhamnolipid - Wikipedia /Acesso: 28 de abr. 2023.

A Figura 102d. se refere à *Síntese* 8.4 onde a matéria orgânica usada foi o ácido cítrico 0,1 M. Nesta micrografia pôde-se observar a formação de partículas micrométricas, em oposição, ao que foi observado nas *Sínteses* 8.1 – 8.3 relatadas anteriormente.

Na *Síntese* 8.5 (Figura 102e.) onde a matéria orgânica usada foi o aminoácido *L-cysteine* 0,1 M, observou-se uma morfologia um pouco indefinida em relação às Figuras 102a.-c. Com base no difratograma desta síntese (Figura 101), foi possível inferir que há presença tanto de NPs-ZnO quanto de ϵ -Zn(OH)₂. No entanto, na Figura 102e. não foi observado nenhum aspecto lamelar característico de hidróxido, além de ocorrer a presença de um material com feitiço similar a uma teia envolvendo as partículas.

Por fim, na Figura 102f. referente à *Síntese* 8.6 que foi sintetizada com 1,3-diaminopropano 0,1 M, observou-se uma morfologia mais distinta em relação às demais sínteses. Os grãos obtidos se assemelharam a prismas (retangulares ou hexagonais). Foi sugerido por NICHOLAS (2011) que o 1,3-diaminopropano ancora no plano (10 $\bar{1}$ 0) favorecendo o crescimento na direção do plano (001) conferindo uma morfologia tubular.

A Figura 104 mostra os histogramas obtidos a partir da contagem de tamanho das NPs-ZnO das *Sínteses* 8.1-8.3 (*caldo de síntese* de 12 h de cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C, *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C e biossurfactante Ramnolípídeo, respectivamente).

Figura 104- Histogramas referentes ao diâmetro das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 8.1-8.3*.

Fonte: Autoria própria.

Observou-se, pela visualização da Figura 104, que todas as três *Sínteses* (*Síntese 8.1 – 8.3*) levaram a uma distribuição monomodal de tamanho de partículas. Além disso, a *Síntese 8.2*, feita com o *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C, favoreceu a obtenção de NPs-ZnO com uma menor distribuição de tamanho, de 20 a 70 nm. Enquanto a *Síntese 8.3*, feita com o biossurfactante Ramnolipídeo, favoreceu a obtenção de NPs-ZnO com uma maior distribuição de tamanho, de 50 a 130 nm. É importante ressaltar que a contagem foi feita com todas as partículas, considerando todas as morfologias.

Na Tabela 39, tem-se os tamanhos médios dos grãos de ZnO obtidos nas *Sínteses 8.1-8.3*. NPs-ZnO com tamanhos menores foram favorecidas na *Síntese 8.2* e NPs-ZnO maiores foram favorecidas na *Síntese 8.3*. No entanto, a maior heterogeneidade na distribuição de tamanho em relação ao tamanho médio do grão de ZnO, ocorreu na *Síntese 8.1*, com 23%.

Tabela 39 - Tamanho médio dos grãos, desvio padrão e coeficiente de variação das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 8.1-8.3*.

<i>Sínteses</i>	Tamanho médio dos grãos (nm)	Desvio padrão (nm)	Coefficiente de variação (%)
8.1 (<i>B. megaterium</i> RF1C 12 h)	64	15	23
8.2 (<i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C 24 h)	47	8	17
8.3 (Biossurfactante - Ramnolipídeo)	86	16	18

Fonte: Autoria própria.

Comparando o tamanho dos cristalitos com o tamanho dos grãos de ZnO (Tabela 40) notou-se que os grãos obtidos nas *Sínteses 8.1 – 8.3* foram maiores do que os cristalitos. Isso levou a sugerir que as partículas observadas nas imagens podem ser policristalinas, ou seja, contêm mais de um cristalito em cada grão. Contudo, para a confirmação desta possibilidade seria necessário a realização da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Tabela 40- Comparação do tamanho médio dos cristalitos obtidos por difração de raios-X com o tamanho dos grãos de ZnO obtidos por MEV para as *Sínteses 8.1-8.3*.

<i>Sínteses</i>	Tamanho médio do cristalito (nm)	Tamanho médio do grão (nm)
8.1 (<i>B. megaterium</i> RF1C 12 h)	25 ± 4	64 ± 15
8.2 (<i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C 24 h)	22 ± 2	47 ± 8
8.3 (Biossurfactante - Ramnolípídeo)	20 ± 2	86 ± 16

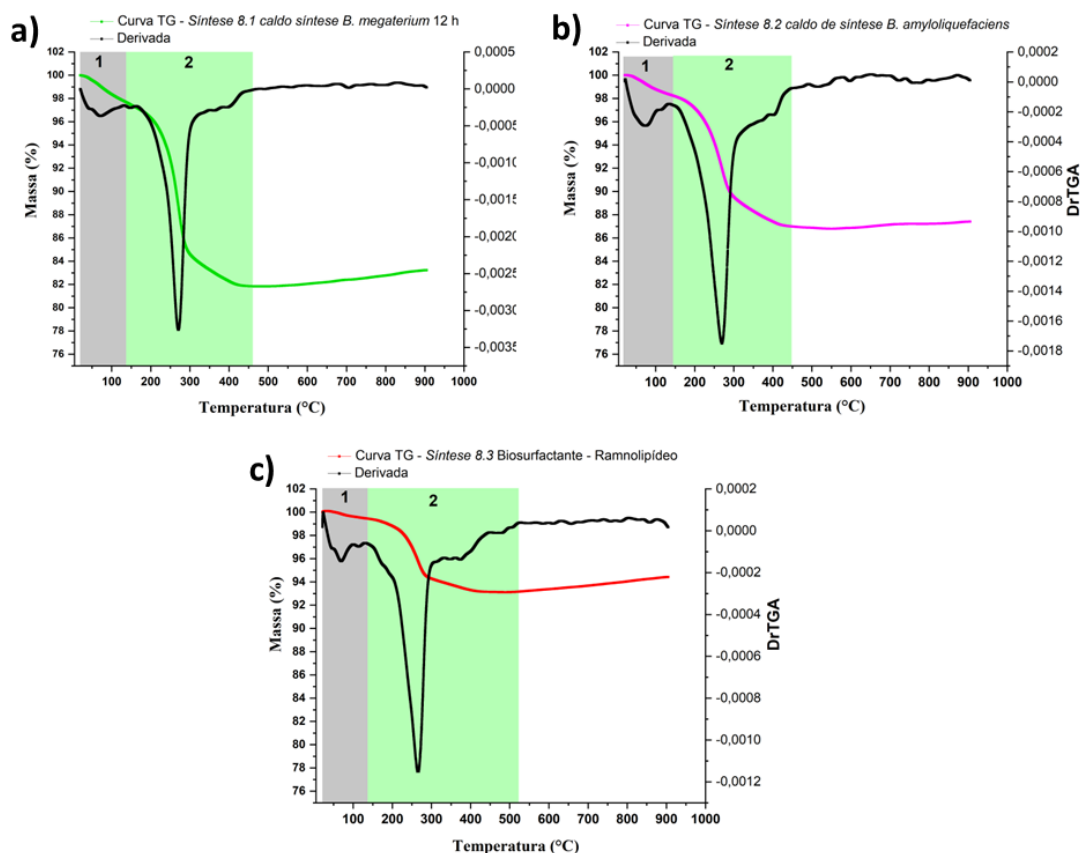
Fonte: Autoria própria.

6.4.5.5 Análise Termogravimétrica – TG

A fim de verificar a porcentagem de matéria orgânica nas *Sínteses 8.1-8.3* foi feita a análise termogravimétrica das NPs-ZnO obtidas nestas sínteses (Figura 105).

Pela visualização das curvas termogravimétricas ilustradas nas Figuras 105a-105c. foi possível observar que as NPs-ZnO obtidas na *Síntese 8.1* (Figura 105.a), feita com o *caldo de síntese* com 12 h de cultivo da bactéria *B. megaterium* RF1C, possuíram maior teor de matéria orgânica (16,1%) e que as NPs-ZnO obtidas na *Síntese 8.3* (Figura 105c.), feita com o biossurfactante comercial Ramnolípídeo, possuíram menor teor de matéria orgânica (6,3%). As NPs-ZnO da *Síntese 8.2* (Figura 105b.), feita com o *caldo de síntese* com 24 h de cultivo da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C, apresentaram teor de matéria orgânica intermediário (11,3%). A Tabela 41 mostra os percentuais de perda de água e de massa decomposta nos intervalos de temperatura.

Figura 105 - Curva de TG das *Sínteses 8.1-8.3* realizadas com o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, 24 h à 32°C e 150 rpm no shaker, variando o tipo da matéria orgânica. (a) *Caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C com 12 h de cultivo. (b) *Caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C com 24 h de cultivo. (c) Biossurfactante Ramnolipídeo comercial.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 41 - Porcentagem de massa decomposta das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 8.1-8.3* nos respectivos intervalos de temperatura (°C) e a porcentagem de massa do resíduo a 900°C.

Evento	Amostra	Intervalo de temperatura (°C)	Massa (%)
1	<i>Síntese 8.1</i>	20 – 135	2,3
	<i>Síntese 8.2</i>	22 – 143	1,7
	<i>Síntese 8.3</i>	21 – 134	0,5
2	<i>Síntese 8.1</i>	135 – 460	16,1
	<i>Síntese 8.2</i>	143 – 446	11,3
	<i>Síntese 8.3</i>	134 – 520	6,3
Resíduo (ZnO)	<i>Síntese 8.1</i>		81,6
	<i>Síntese 8.2</i>	900°C	87,0
	<i>Síntese 8.3</i>		93,2

Fonte: Autoria própria.

O comportamento térmico das curvas termogravimétricas pode ser devido as perdas de moléculas de água, evento 1, e devido a decomposição de matéria orgânica, evento 2. Tal como ocorrido nas curvas termogravimétricas da Seção 6.4.2.5 (p. 149), foi observado nas curvas TGs das Figuras 105a.-105c. que após a decomposição da matéria

orgânica, nas temperaturas acima de 500-600°C, as curvas apresentaram um pequeno crescimento. Conforme discutido na Seção 6.4.2.5 (p. 149) isto, pôde ser devido a oxidação de compostos inorgânicos oriundos de possíveis contaminações, tais como, do próprio sal de zinco utilizado nas sínteses, dos meios de cultura utilizados no cultivo das bactérias e da água utilizada nas lavagens das nanopartículas. Ou ainda, como houve acréscimo de massa, foi pertinente inferir que pôde ter havido absorção de oxigênio para suprir as vacâncias deste elemento na estrutura cristalina do ZnO, no entanto, para uma completa elucidação seriam necessários aprofundar os estudos.

6.4.6 Resumo das Sínteses 4-8 de NPs-ZnO

A Tabela 42 apresenta um resumo das *Sínteses 4-8* feitas com o ajuste de pH, assim como os **Controles 1 e 2**.

Tabela 42 – Resumo das *Sínteses 4 – 8* de NPs-ZnO com os seus respectivos **Controles**.

Índice	pH	Quantidade do sal de zinco (mg)	Concentração do sal precursor Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (M)	Tempo de síntese (h)	Tipo de matriz orgânica usada na síntese	Tamanho médio dos cristaltos (nm)	Tamanho máximo dos cristaltos dos cristaltos (nm)	Densidade média dos cristaltos (g/cm ³)	Coeficiente de absorção (%)	Tamanho médio dos grãos (nm)	Tamanho máximo dos grãos das sínteses (nm)	Densidade média dos grãos (g/cm ³)	Coeficiente de absorção (%)
Controle 1	8	0	0,32	24	-	27				136			
Controle 2		0				19		250					
Síntese 4.3	8					25				23 e 64			
Síntese 4.4	9	20	0,32	24	solução de síntese autogerada K11C	19							
Síntese 4.5	10					17							
Síntese 5.1		20				25				46			
Síntese 5.2		4				25				68			
Síntese 5.3	8	2	0,32	24	solução de síntese autogerada K11C	31							
Síntese 5.4		1				29				134			
Síntese 5.5		0,5				25				128			
Síntese 6.2			0,064			19							
Síntese 6.3	8	4	0,16	24	solução de síntese autogerada K11C	20	23	4	17		81	32	39
Síntese 6.4			0,32			24			60				
Síntese 6.5			0,48			27			67				
Síntese 7.1				1		20				102			
Síntese 7.2				6		18				85			
Síntese 7.3	8	4	0,32	12	solução de síntese autogerada K11C	21				83			
Síntese 7.4				24		22				82			
Síntese 7.5				72		21				98			
Síntese 8.1					solução de síntese autogerada K11C 1:2 h	25				64			
Síntese 8.2	8	4	0,32	24	solução de síntese autogerada K11C	22				47			
Síntese 8.3					solução de síntese autogerada K11C	20				86			

Fonte: Autoria própria.

Analisando os resultados dos tamanhos dos cristaltos do ZnO obtidos nas *Sínteses 4-8*, e nos **Controles**, observou-se que mesmo diante da variação de alguns parâmetros

como pH, quantidade de *caldo de síntese* adicionado, concentração do sal precursor, tempo de síntese e o tipo de matéria orgânica, não houve grandes variações no tamanho do cristalito. Como pode ser visto na décima coluna da Tabela 42, dentro do retângulo em verde, o coeficiente de variação dos tamanhos médios dos cristalitos obtidos em cada síntese foi de 17%. Este resultado mostrou que não houve variações significativas na cinética de formação dos núcleos. Para isso, seria necessário avaliar por exemplo, a variação de temperatura e agitação, parâmetros que não foram avaliados neste trabalho.

O menor cristalito (17 ± 2 nm) foi obtido na *Síntese 4.5* com 20 mL do *caldo de síntese* de 24 h da bactéria *B. megaterium* RF1C e 20 mL da solução do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ com o pH ajustado para 10, em agitação orbital a 150 rpm por 24 h a $32^\circ C$. E o maior cristalito, 31 ± 5 nm, foi obtido na *Síntese 5.3* onde foram usados 2 mL do *caldo de síntese* de 24 h da bactéria *B. megaterium* RF1C e 20 mL da solução do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, pH 8 e 24 h em agitação orbital a 150 rpm e $32^\circ C$ (Tabela 42).

No entanto, observou-se que houve uma variação considerável quanto ao tamanho dos grãos de ZnO obtidos nas sínteses, como mostrado na última coluna da Tabela 42 dentro do retângulo vermelho. O coeficiente de variação dos tamanhos médios dos grãos de ZnO das sínteses foi de 56%, mostrando que estatisticamente ocorreu uma significativa variabilidade dos resultados. Este resultado mostrou que as variações nos parâmetros das sínteses possibilitaram a obtenção de ZnO com diferentes tamanhos de grãos.

O maior tamanho de grão de ZnO (134 ± 25 nm) foi obtido na *Síntese 5.4* e o menor tamanho de grão (46 ± 10 nm) foi obtido na *Síntese 5.1*. A diferença entre estas duas sínteses foi a quantidade de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C adicionado. Na *Síntese 5.4* foi usado apenas 1 mL do *caldo* e na *Síntese 5.1* 20 mL. As demais condições foram as mesmas, 20 mL da solução do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ com o pH ajustado para 8, agitação orbital a 150 rpm por 24 h a $32^\circ C$. Com base neste resultado foi possível inferir que a quantidade do *caldo de síntese* usada nas sínteses para a obtenção das NPs-ZnO teve influência sobre o tamanho dos grãos de ZnO.

Ao comparar o tamanho dos grãos de ZnO obtidos na *Síntese 5.2* (68 ± 14 nm) e na *Síntese 8.2* (47 ± 8 nm) observou-se que grãos menores foram formados na *Síntese 8.2*. A diferença entre estas duas sínteses foi o tipo de *caldo de síntese* utilizado. Na *Síntese 5.2*, o *caldo de síntese* foi proveniente do cultivo de 24 h da bactéria *B. megaterium* RF1C e na *Síntese 8.2*, o *caldo de síntese* foi obtido através do cultivo de 24 h da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C. Os demais parâmetros de síntese foram os mesmos, 20 mL da

solução do sal precursor de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ com o pH ajustado para 8, agitação orbital a 150 rpm por 24 h a 32°C .

6.4.7 Espectroscopia Raman

A interação entre um material sólido, neste caso, as NPs-ZnO, com a radiação incidida sobre a amostra durante a análise de Espectroscopia Raman, provoca vibrações em toda a rede cristalina do material. Os modos de vibrações, que podem ser longitudinais ou transversais, em relação à direção de propagação da radiação incidida, se propagam em todo o material constituindo muitas vibrações de energias similares que ocupam uma banda de energia do material. Cada material possui uma largura de banda característica o que permite identificar e analisar sua estrutura (SMITH; DENT, 2005).

Vale ressaltar que as técnicas de Espectroscopia no Infravermelho e de Raman são complementares, auxiliam na compreensão sobre a constituição do material. A principal diferença entre elas é que a Espectroscopia no Infravermelho fornece informações sobre as mudanças no momento de dipolo das moléculas, enquanto a espectroscopia Raman depende das mudanças na polarização das moléculas. Os espectros de infravermelho são obtidos através da absorção de luz e os espectros de Raman através da dispersão de luz (MELO, 2012).

A espectroscopia Raman foi realizada a fim de detectar as vibrações que constituem a amostra. Nesta técnica foi analisada apenas as NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*. A Tabela 43 mostra a comparação dos modos ativos de Raman obtidos na análise para as NPs-ZnO da *Síntese 5.2* com os valores de referência obtidos no estudo de AURANGZEB (2010). A Figura 106 mostra o espectro obtido.

Tabela 43- Comparação dos modos ativos Raman obtidos das NPs-ZnO da *Síntese 5.2* com os valores de referência obtidos no estudo de AURANGZEB (2010).

Pico	Valores de referência (cm^{-1})	<i>Síntese 5.2</i> (cm^{-1})
E2 (LOW)	101	-
A1 (TO)	380	379,7
E1 (TO)	407	-
E2 (High)	437	435,5
A1 (LO)	574	572,5
E1 (LO)	583	584,7

Fonte: Autoria própria.

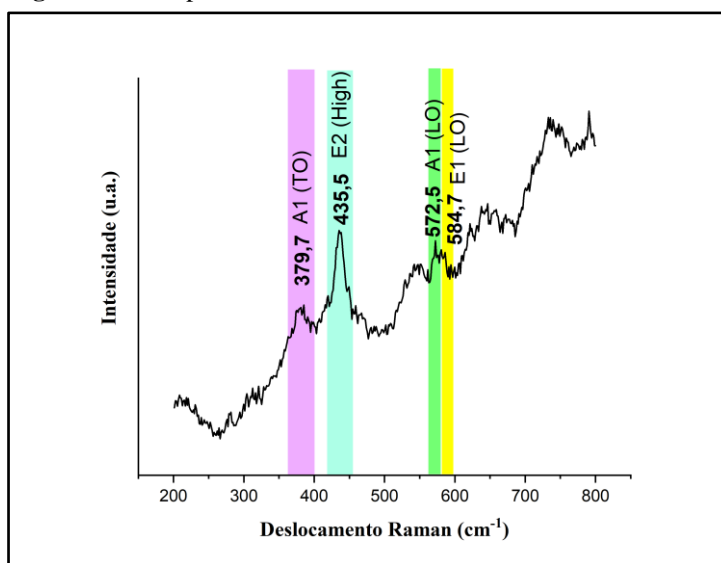
Os picos observados em $379,7 \text{ cm}^{-1}$, $435,5 \text{ cm}^{-1}$, $572,5 \text{ cm}^{-1}$ e $584,7 \text{ cm}^{-1}$ (Tabela 43 e Figura 106) foram atribuídos aos modos ativos Raman do ZnO com estrutura cristalina hexagonal do tipo wurtzita. Este resultado corroborou com o obtido na análise

de DRX. Observou-se que os valores obtidos na análise de Raman estão próximos aos valores de referência.

Na Figura 106 notou-se um pico em $435,5 \text{ cm}^{-1}$ que foi atribuído ao modo ativo E_2 (High) do Raman, que é um modo característico do ZnO e está associado aos ânions de oxigênio. A alta intensidade deste pico sugeriu que as NPs-ZnO possuem boa cristalinidade (AURANGZEB, 2010; MUÑOZ, 2018).

O pico em $379,7 \text{ cm}^{-1}$ foi atribuído ao modo óptico transversal $A_1(\text{TO})$ e os picos em $572,5 \text{ cm}^{-1}$ e $584,7 \text{ cm}^{-1}$ aos modos $A_1(\text{LO})$ e $E_1(\text{LO})$, respectivamente.

Figura 106 – Espectro Raman das NPs-ZnO obtidas na Síntese 5.2.



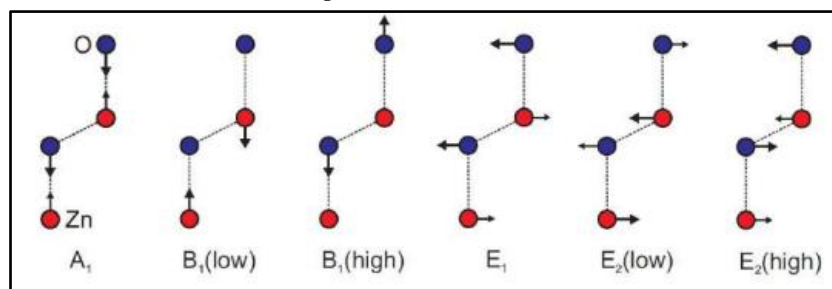
Fonte: Autoria própria.

A estrutura cristalina wurtzita pertence ao grupo espacial $C4_6v$ com duas unidades de fórmula por célula primitiva. Assim, de acordo com a teoria de grupos, a estrutura possui oito conjuntos de fônons ópticos: $1A_1(\text{TO}) + 1A_1(\text{LO}) + 2B_1 + 1E_1(\text{TO}) + 1E_1(\text{LO}) + 2E_2$. Os modos B_1 não são ativos no Raman (ÖZGÜR et al., 2005). Na análise das NPs-ZnO foram observados os picos referentes aos fônons E_2 (High), $A_1(\text{TO})$, $A_1(\text{LO})$ e $E_1(\text{LO})$ (Figura 106).

Os modos A_1 e E_1 representam modos ativos e possuem vibrações que se formam tanto ao longo da direção de propagação da radiação (longitudinais - LO) quanto formando um ângulo reto com a direção de propagação (transversais - TO) (SMITH; DENT, 2005). Os modos $E_1(\text{TO})$ e $A_1(\text{TO})$ refletem as ligações polares da rede cristalina. O modo E_2 reflete as ligações não polares e possui duas frequências, uma alta (E_2 High) associada ao oxigênio e uma baixa (E_2 Low) associada ao zinco na rede cristalina (SMITH; DENT, 2005; MUÑOZ, 2018).

A Figura 107 ilustra os tipos de vibrações associadas a cada modo Raman.

Figura 107 - Representação dos modos de vibrações dos fônons no ZnO. As setas maiores representam o deslocamento dominante. A₁, E₁, B₁(high) e E₂(high) são associados aos deslocamentos do oxigênio e B₁(low) e E₂(high) são associados aos deslocamentos de zinco. A₂ e E₁ são modos polares, B₁ e E₂ são não – polares (MUÑOZ, 2018).

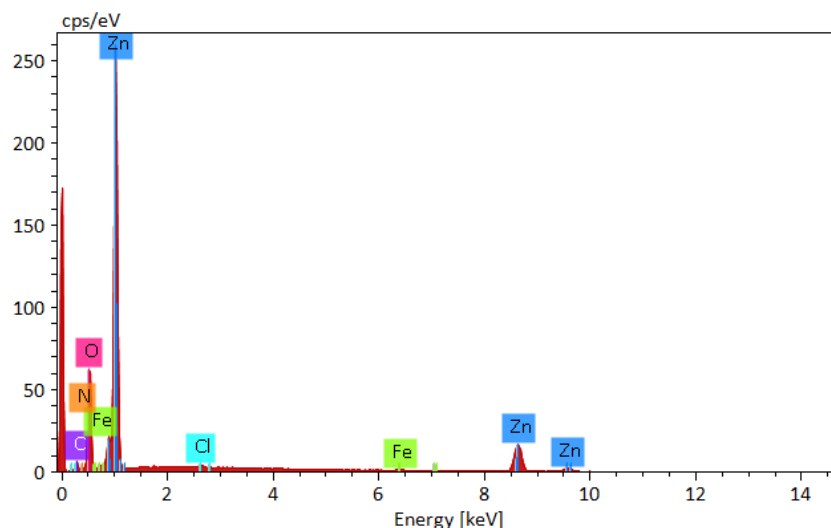


Fonte: MUÑOZ (2018).

6.4.8 Composição Elementar das NPs-ZnO

A fim de caracterizar a composição elementar das NPs-ZnO foram feitas as análises de EDS (Figura 108) e Análise Elementar (CHNS). Para a realização destas análises as NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2* foram selecionadas. A análise foi feita em três regiões distintas da amostra, a Figura 108 mostra o espectro obtida em uma região. Os espectros das outras duas regiões estão no **Apêndice E**.

Figura 108 - Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2* realizada com 4 mL de *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C e o sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (0,32 M), pH 8, 32°C, 24 h a 150 rpm no shake.



Fonte: Autoria própria.

O espectro de EDS indicou a presença de um pico acentuado de Zn em aproximadamente 1 keV e outros dois picos menos acentuados em aproximadamente 8,5 e 9,5 keV. Estes picos são característicos das transições eletrônicas do Zn. O segundo pico mais acentuado em ~0,5 keV é característico da presença de O.

Além do aparecimento dos elementos Zn e O, também foram detectadas em porcentagens menores, os elementos Fe (0,23%), N (1,81%) e Cl (0,3%) e em uma

porcentagem considerável o C (15,58%). O carbono, o ferro e o nitrogênio, provavelmente, provêm de compostos orgânicos, como cofatores e proteínas, do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, da água e do meio de cultura usados nas sínteses das NPs-ZnO.

A Tabela 44 mostra a porcentagem atômica dos elementos presentes nas NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*. Constatou-se que o coeficiente de variação para os elementos Zn, O e C apresentou baixa dispersão, indicando que a amostra analisada tinha boa homogeneidade. Foi possível notar que a proporção atômica de Zn e O não foi 1:1, o que era esperado, pois além do ZnO não ter uma proporção estequiométrica de 1:1, o O também constitui a matéria orgânica.

Tabela 44- EDS, % atômica dos elementos nas NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*.

Elemento	Região 1		Região 2		Região 3		% Atômica média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
	% Atômica	Erro (%)	% Atômica	Erro (%)	% Atômica	Erro (%)			
Zn	38,34	9,42	35,76	9,37	33,46	8,59	35,85	2,44	6,81
O	46,94	2,78	48,91	3,01	46,4	2,87	47,42	1,08	2,27
C	14,27	0,89	15,12	0,97	17,66	1,08	15,68	1,76	11,25
Cl	0,29	0,09	0,22	0,08	0,38	0,09	0,3	0,08	26,74
Fe	0,16	0,14	-	-	0,29	0,18	0,23	-	-
N	-	-	-	-	1,81	0,24	1,81	-	-

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 45 mostra a porcentagem de C, H e N, obtidas na análise elementar, presentes nas NPs-ZnO da *Síntese 5.2*. O teor de S foi zero e por isso não consta na tabela.

Tabela 45 - Análise Elementar das NPs-ZnO da *Síntese 5.2*, porcentagem dos elementos N, C e H.

Elemento	NPs-ZnO da <i>Síntese 5.2</i>					
	Análise 1 (% m/m)	Análise 2 (% m/m)	Análise 3 (% m/m)	Média (% m/m)	Desvio padrão (%m/m)	Coeficiente de variação (%)
N	0,391636	0,394774	0,40936	0,398590	0,009458	2,3729
C	1,723481	1,747104	1,717004	1,729196	0,015843	0,9162
H	1,146015	1,188317	1,300777	1,211703	0,079987	6,6012

Fonte: Autoria própria.

A análise elementar está em acordo com a análise de EDS indicando a presença de C e N na amostra, além da presença de H que pôde ser detectada nesta técnica. Estes resultados juntamente com os resultados de TG (Seção 6.4.2.5 p.149) e de FT-IR (Seção 6.4.9 p. 188) sugerem a presença de matéria orgânica nas NPs-ZnO.

A Tabela 46 traz a porcentagem m/m obtidas na análise de EDS. Foi possível observar que tanto a porcentagem de C (5,70 % m/m) quanto a porcentagem de N (0,79 % m/m) apresentaram valores superiores aos obtidos na análise elementar 1,72 % m/m e cerca de 0,40 % m/m de C e N, respectivamente.

Tabela 46 - EDS, %m/m de C e N presente nas NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*.

Elemento	Região 1 % m/m	Região 2 % m/m	Região 3 % m/m	% m/m média	Desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
C	4,97	5,49	6,63	5,70	0,85	14,90
N	-	-	0,79	0,79	-	-

Fonte: Autoria própria.

Devido ao *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C usado na síntese das NPs-ZnO ser rico em proteínas e devido ao teor considerável de matéria orgânica presente nas NPs-ZnO (14,2%). Considerando as proteínas como fonte de N, a porcentagem m/m de N (0,79%) encontrada na análise de EDS, e (~0,40%) na análise elementar considerando os erros, estava abaixo do valor calculado (2,27%)⁶.

6.4.9 FT-IR

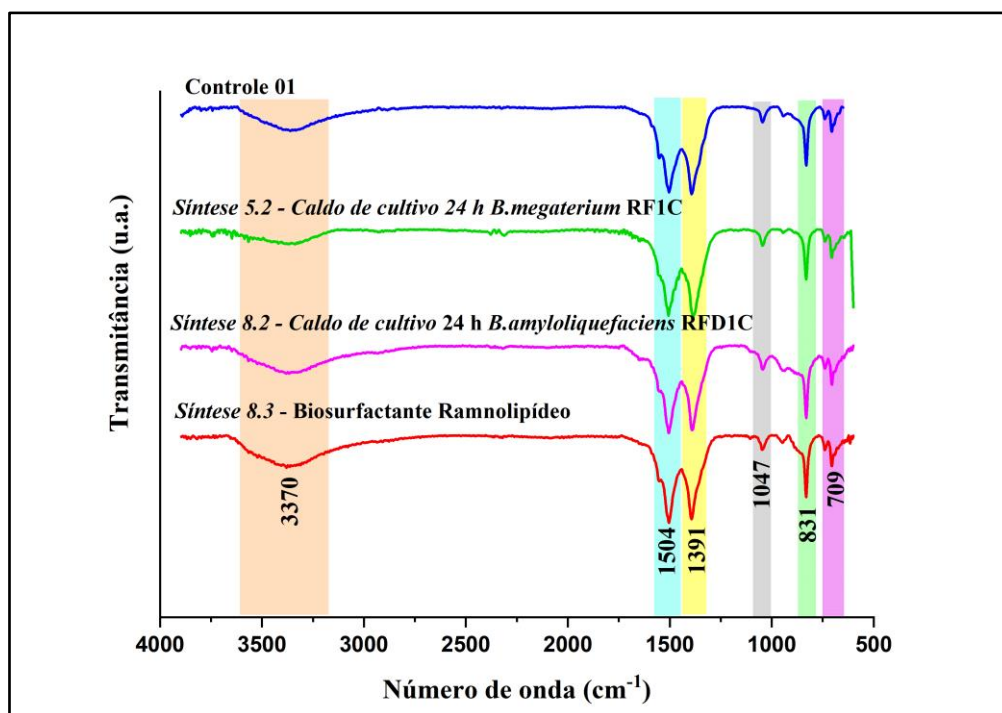
A fim de estudar os grupos funcionais presentes nas NPs-ZnO foram realizadas as análises de FT-IR das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3* e do ZnO obtido no **Controle 1**. Como pode ser observado na Figura 109, os espectros obtidos foram bastante parecidos, podendo sugerir que a ligação entre os grupos funcionais e a superfície das NPs-ZnO foi bastante similar.

A partir dos espectros obtidos (Figura 109) foi possível sugerir tanto a presença de carboxilato quanto de hidrogeno carbonato de zinco na superfície do material.

Para a possível presença de carboxilatos, as bandas de absorção em 3370 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao estiramento da ligação (O-H). Em 1047 cm⁻¹ pode ser atribuído à vibração angular das ligações (CCH) e (CH₃, CH₂) podendo ainda ser devido a vibração angular (N-H) nas *Sínteses 5.2 e 8.2* ou ao estiramento da ligação (C-O-C) (KUMAR; SAHARE, 2012). Em 831 cm⁻¹ à vibração angular (C-H) de aromáticos e à vibração angular das ligações (CH₃, CH₂). E ainda, a banda de absorção em 709 cm⁻¹ pode ser atribuída à vibração angular da ligação (COO⁻) (ZELENÁK et al., 2007).

⁶ Considerando que as proteínas apresentam uma porcentagem de nitrogênio quase constante, cerca de 16% (CECCHI, 2013) e como o teor de matéria orgânica presente na *Síntese 5.2* foi de 14,2%, assumindo esta porcentagem oriunda de proteínas, foi feita uma regra de três simples para encontrar o valor de 2,27%. Regra de três: (14,2%*16%)/100.

Figura 109 – Espectros de FT-IR das NPs-ZnO obtidas nas Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3 e do ZnO obtido no **Controle 1**.

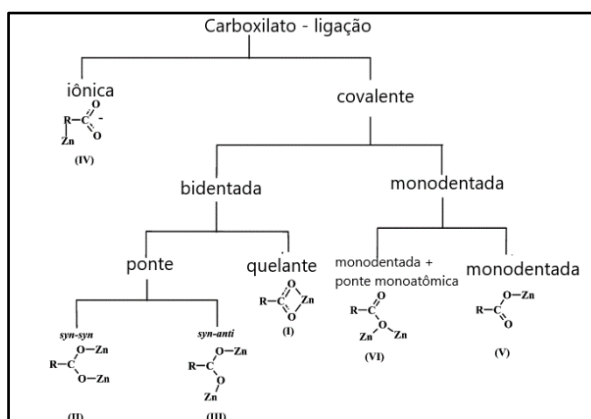


Fonte: Autoria própria.

As bandas em 1504 e 1391 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico da ligação (COO^-), respectivamente (KUMAR; SAHARE, 2012). Estas bandas sugerem a presença de carboxilatos ligados na superfície das NPs-ZnO.

Os carboxilatos possuem um comportamento de coordenação versátil, podem se ligar de diferentes modos ao zinco (Figura 110). A análise de infravermelho pode elucidar o modo de ligação do carboxilato através da diferença entre o estiramento assimétrico e o simétrico obtidos no espectro, $\Delta = \nu_{\text{as}}(\text{COO}^-) - \nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$. Este critério foi aplicado para atribuir o tipo de coordenação do carboxilato presente nas NPs-ZnO (ZELENÁK et al., 2007; NAKAMOTO, 1986).

Figura 110- Representação dos diferentes tipos de coordenação do carboxilato com o zinco.



Fonte: Modificado de ZELENÁK et al. (2007).

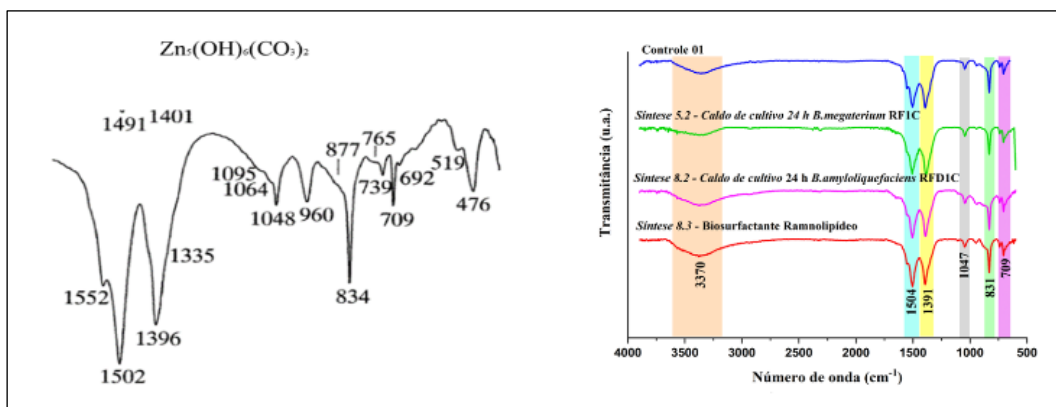
A diferença entre a vibração do estiramento assimétrico (1504 cm^{-1}) e a vibração do estiramento simétrico (1391 cm^{-1}), $\Delta = 113$, indicou a coordenação quelante (Figura 110) do carboxilato com a superfície das NPs-ZnO (ZELENÁK et al., 2007).

A presença de carboxilatos nas NPs-ZnO da *Sínteses 5.2* é bastante pertinente, pois conforme já foi abordado, há uma alta estabilidade na ligação entre os íons carboxilatos e o zinco e como foi visto na análise por CG-EM há presença de grupos carboxilas no *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C. Possivelmente, há presença destes grupos no *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C usado na *Síntese 8.2*. Também pode ser visto a presença de carboxilas na estrutura do biossurfactante Ramnolipídeo usado na *Síntese 8.3*. É possível inferir, que devido à alta afinidade do zinco com o carboxilato, a coordenação do tipo quelante ocorre no plano (001) do cristal de ZnO, onde o zinco possui ligações pendentes.

No entanto, no espectro de FT-IR do **Controle 1** (Figura 109) não era esperada a presença de carboxilatos. Contudo, conforme mostrado na Seção 6.2.1 (p. 115) há uma porcentagem de carbono e de hidrogênio nas partículas de ZnO do **Controle 1** e como discutido na análise de CG-EM do *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, foi verificada a presença de ftalatos que possivelmente são provenientes de contaminação por contato com material plástico com o *caldo*. Ora, a água deionizada usada na síntese do **Controle 1** fica armazenada em um tambor plástico. Apesar da baixa solubilidade do ftalato em água, como a afinidade dos carboxilatos com o zinco é alta e como a técnica de FT-IR também é bastante sensível, é provável a formação de carboxilatos, oriundos de ftalatos, na superfície das partículas de ZnO conforme visto no espectro da Figura 109. No entanto, para elucidar esta possibilidade seria necessário mais estudo.

Devido a presença de CO_2 dissolvido na água, a outra possibilidade é a presença de hidrogeno carbonato de zinco na superfície das nanopartículas de ZnO. Na Figura 111 é possível perceber a semelhança das bandas obtidas no espectro do hidrogeno carbonato de zinco, à esquerda, com as bandas obtidas nos espectros das NPs-ZnO, à direita.

Figura 111- Espectros de FT-IR do hidrogeno carbonato de zinco, $Zn_5(OH)_6(CO_3)_2$, à esquerda e das NPs-ZnO obtidas nas Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3 e do ZnO obtido no **Controle 1**, à direita.



Fonte: Modificado de STOILOVA et. al. (2001).

Para a possível presença de hidrogeno carbonato, é plausível atribuir as bandas de absorção em 1504 e 1391 cm^{-1} às vibrações de estiramento do carbonato (CO_3^{2-}) e em 831 e 709 cm^{-1} às suas vibrações angulares, fora do plano e no plano, respectivamente (STOILOVA et. al., 2001).

6.4.10 RMN sólido

Para ajudar a elucidar a matéria orgânica presente nas NPs-ZnO foram realizadas as análises de RMN sólido de ^{13}C das NPs-ZnO. A Figura 112 mostra os espectros de RMN de ^{13}C das NPs-ZnO obtidas nas Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3 e das partículas de ZnO do **Controle 1**.

Nos espectros foram observados sinais na região entre $164,02$ e $169,02\text{ ppm}$ nas quatro sínteses (Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3 e **Controle 1**). Esta região é característica de sinais mais desblindados, de carbonos ligados a átomos eletronegativos como o oxigênio dos carbonos carbonílicos ($C=O$) e carboxílicos (RCO_2R'). Este resultado está em concordância com os espectros de FT-IR discutidos na seção anterior (Seção 6.4.9 p. 188), onde há possibilidade da presença de carboxilatos fazendo coordenação do tipo quelante com a superfície das NPs-ZnO.

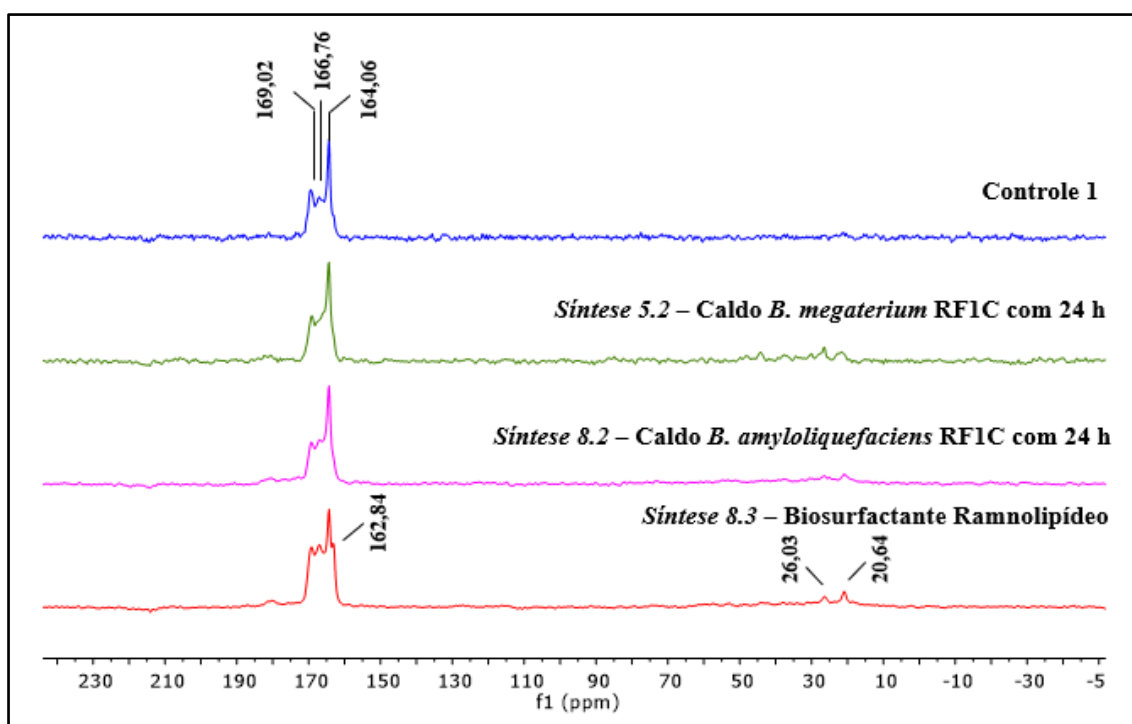
Com exceção do espectro do **Controle 1**, também foi possível observar sinais em $20,64$ e $26,03$ nos espectros das Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3. Estes sinais são característicos de carbonos de grupos $R-CH_3$, $R-CH_2-$, $RR'-CH-$, etc. que não estão ligados diretamente a átomos eletronegativos.

Na Seção 6.4.9 (p. 188) foi sugerida a presença de carboxilatos (provenientes de alguma contaminação com ftalatos, por exemplo), e não de carbonatos, na superfície das partículas e ZnO do **Controle 1**. Na região entre $164,02$ e $169,02\text{ ppm}$ também é possível

a presença de carbonos aromáticos. No entanto, não foi observada a presença de sinais nas regiões de menor energia no espectro. Seriam necessários mais estudos para elucidar a superfície das partículas de ZnO do **Controle 1**.

Vale ressaltar, conforme foi mencionado na Seção 6.4.9 (p.188), que há a possibilidade de ter formado hidrogeno carbonato de zinco na superfície das NPs-ZnO. Contudo, para aprofundar o estudo seria pertinente realizar análise de RMN sólido do hidrogeno carbonato de zinco para comparar com os espectros obtidos das NPs-ZnO (Figura 112).

Figura 112 – Espectros de RMN ^{13}C das NPs-ZnO obtidas nas Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3 e das partículas e ZnO do **Controle 1**.



Fonte: Autoria própria.

6.4.11 Rendimento da Síntese de NPs-ZnO

Para calcular o rendimento da *Síntese 5.2*, feita em triplicata, foi usada a equação 7, apresentada na Seção 4.2.7 (p. 67). A Tabela 47 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 47 – Rendimento da *Síntese 5.2* de NPs-ZnO.

<i>Síntese</i> 5.2	Massa de ZnO obtida no final da síntese (g)	Rendimento (%)	Rendimento médio (%)	Desvio padrão (%)	Coefficiente de variação (%)
1	0,584	95,8			
2	0,549	89,1	93,3	3,6	3,9
3	0,579	94,9			

Fonte: Autoria própria.

Os rendimentos das NPs-ZnO obtidos pelas *Sínteses 5.2* foram altos (Tabela 47). O coeficiente de variação entre as três sínteses (3,9%) indicou que houve pouca variabilidade entre os rendimentos obtidos.

A síntese proposta neste trabalho proporcionou um rendimento superior ao obtido no estudo de KRÓL et al. (2018), onde foi obtido um rendimento de 85% de NPs-ZnO pela via intracelular. Os autores usaram a bactéria *Lactobacilo paracasei*, isolada de produtos lácteos e o sal nitrato de zinco a 3 mM como precursor na síntese das NPs-ZnO que foi realizada à temperatura ambiente (26 °C) em agitação magnética por 10 dias.

6.4.12 Teste Antimicrobiano

Conforme visto na Seção 1.3.2 (p. 41) devido a atividade antimicrobiana do óxido de zinco, as NPs-ZnO têm sido estudadas nas áreas de farmácia, medicina, dentre outras. Assim, a fim de verificar a atividade antimicrobiana das NPs-ZnO sintetizadas neste estudo foi feito o teste do poço com as NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.2, 5.5, 8.2, 8.3* e com o **Controle 1** para verificar a concentração inibitória de NPs-ZnO capaz de inibir o crescimento das cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Nas *Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3* as NPs-ZnO apresentaram morfologia e tamanhos similares, diferiram no tipo e no teor de matéria orgânica presente nas NPs-ZnO. Na *Síntese 5.5* as NPs-ZnO apresentaram tamanho maior.

A Tabela 48 mostra um resumo das condições de síntese usadas no **Controle 1** e nas *Sínteses 5.2, 5.5, 8.2, 8.3* com os respectivos tamanhos de NPs-ZnO obtidos, assim como o teor de matéria orgânica.

Tabela 48- Condições de síntese do **Controle 1** e das *Sínteses 5.2, 5.5, 8.2 e 8.3* com os respectivos tamanhos de NPs-ZnO obtidos e o teor de matéria orgânica.

NPs-ZnO	Condições de síntese	Tamanho do grão das NPs-ZnO (nm)	Teor de matéria orgânica (%)
Controle 1	4 mL de água deionizada esterilizada com 20 mL de solução do sal Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O a 0,32 M, pH 8,0 e 24 h em agitação de 150 rpm no shaker a 32°C.	136 ± 26	-
<i>Síntese 5.2</i>	4 mL do caldo de síntese <i>B. megaterium</i> RF1C e 20 mL de solução do Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O a 0,32 M, pH 8,0 e 24 h em agitação de 150 rpm no shaker a 32°C.	68 ± 14	14,2
<i>Síntese 5.5</i>	0,5 mL do caldo de síntese <i>B. megaterium</i> RF1C e 20 mL de solução do Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O a 0,32 M, pH 8,0 e 24 h em agitação de 150 rpm no shaker a 32°C.	128 ± 27	5,1
<i>Síntese 8.2</i>	4 mL do caldo de síntese <i>B. amyloliquefaciens</i> RFD1C e 20 mL de solução do Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O a 0,32 M, pH 8,0 e 24 h em agitação de 150 rpm no shaker a 32°C.	47 ± 8	11,3
<i>Síntese 8.3</i>	4 mL de biossurfactante Ramnolípídeo a 440 mg/mL e 20 mL de solução do Zn(NO ₃) ₂ .6H ₂ O a 0,32 M, pH 8,0 e 24 h em agitação de 150 rpm no shaker a 32°C.	86 ± 16	6,3

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 49 apresenta os resultados obtidos do teste antimicrobiano. As placas contendo os 96 poços, onde os testes foram feitos, estão no **Apêndice B**.

Tabela 49 – Valores de concentração mínima inibitória (MIC) das NPs-ZnO obtidas no **Controle 1** e nas *Sínteses 5.2, 5.5, 8.2, 8.3* para as cepas de *E. coli* e *S. aureus*.

NPs-ZnO	Concentração mínima inibitória (µg mL ⁻¹)	
	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>S. aureus</i> ATCC25923
Controle 1	600	150
<i>Síntese 5.2</i>	600	150
<i>Síntese 5.5</i>	600	75
<i>Síntese 8.2</i>	600	150
<i>Síntese 8.3</i>	300	75

Fonte: Autoria própria.

Para a inibição do crescimento da bactéria *E. coli* ATCC25922 foram necessários 600 µg mL⁻¹ das NPs-ZnO obtidas no **Controle 1** e nas *Sínteses 5.2, 5.5, 8.2* e de 300 µg mL⁻¹ das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 8.3*. Sem levar em consideração o teor e o tipo de matéria orgânica presente nas NPs-ZnO, os resultados dos ensaios mostraram que os diferentes tamanhos de grãos das NPs-ZnO não tiveram influência sobre a atividade antimicrobiana contra a bactéria *E. coli* neste estudo.

Como mostrado na Tabela 49, tanto o menor quanto o maior tamanho das NP-ZnO testados, *Síntese 8.2* (47 ± 8 nm) e **Controle 1** (136 ± 26 nm) respectivamente,

tiveram o mesmo resultado para a cepa de *E. coli*, ou seja, para as NPs-ZnO com tamanhos diferentes foi necessária a mesma concentração de NP para promover a inibição do crescimento das bactérias.

As partículas de ZnO do **Controle 1** não tinham matéria orgânica na sua superfície. Assim, apesar de terem um tamanho maior, as partículas de ZnO não possuem uma barreira difusional que poderia dificultar a ação antimicrobiana do ZnO que, de acordo com a literatura, pode se dar por meio da geração de íons Zn^{2+} e de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008; BRAYNER et al., 2006; RAGO et al., 2014 e COTTON et al., 2019).

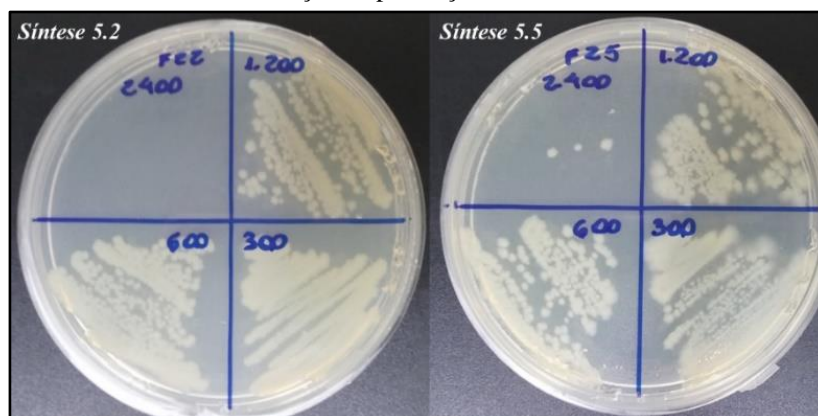
Na *Síntese 8.2*, apesar de ser a síntese onde os menores tamanhos de NPs-ZnO foram obtidos, o que poderia favorecer a entrada das NPs-ZnO na membrana celular induzindo um aumento das EROs e conseqüentemente provocando reações oxidativas que levam a morte das células, ela possui um teor de 11,3% de matéria orgânica na superfície. A matéria orgânica na superfície das NPs-ZnO poderia dificultar a difusão dos íons Zn^{2+} e das EROs diminuindo sua ação antimicrobiana. No entanto, para maior elucidação da ação antimicrobiana outros estudos seriam necessários para se chegar a uma conclusão mais certa. Por exemplo, seria pertinente calcinar a 500°C as NPs-ZnO, para decompor toda a matéria orgânica e realizar novamente o teste antimicrobiano.

Neste estudo, a *Síntese 8.3*, feita com o biossurfactante Ramnolípídeo, apresentou o melhor resultado antimicrobiano contra a bactéria *E. coli* ATCC25922 (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em comparação com a *Síntese 8.2*, a *Síntese 8.3* forneceu NPs-ZnO com tamanhos um pouco maiores (86 ± 16 nm), mas com um menor teor de matéria orgânica (6,3%), o que poderia facilitar a difusão dos íons Zn^{2+} e das EROs favorecendo o desempenho da ação antimicrobiana das NPs-ZnO obtidas nesta síntese. Em relação ao **Controle 1**, que não possui barreira difusional, a *Síntese 8.3* teria como vantagem o menor tamanho que facilitaria a entrada das NPs-ZnO nas células.

Além das vantagens das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 8.3*, expostas no parágrafo anterior, estudos na literatura vêm destacando a atividade antimicrobiana do biossurfactante Ramnolípídeo usado nesta síntese (ITOH et al., 1971; SOTIROVA et al., 2008; SABARINATHAN et al., 2021). Estruturalmente, os Ramnolípídeos são glicolípídeos constituídos por uma parte hidrofílica, moléculas de ramnose, e por uma parte hidrofóbica ligada a cadeias de ácido β -hidroxi-decanoico. (BERTUSO, 2022). Sendo assim, esta propriedade dos Ramnolípídeos também pode ter contribuído para a obtenção de um melhor resultado na ação antimicrobiana das NPs-ZnO obtidas na *Síntese 8.3*.

Também foi feito um teste para avaliar a propriedade bactericida das NPs-ZnO. Passadas as 24 h de incubação da *E. coli* ATCC25922 foram inoculados em placas contendo o meio de cultura sólido, Agar Nutriente, o conteúdo dos poços das fileiras onde, visualmente, não houve crescimento microbiano. As NPs-ZnO sintetizadas na *Síntese 5.2* foram as únicas a matar as bactérias *E. coli* na concentração de $2.400 \mu\text{g mL}^{-1}$. As NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.5* na concentração de $2.400 \mu\text{g mL}^{-1}$ quase eliminaram as bactérias *E. coli* ATCC25922 houve o crescimento de apenas 3 colônias na placa (Figura 113).

Figura 113 - Crescimento da cepa de *E. coli* ATCC25922 em placa contendo Agar Nutriente após 24 de inoculação na presença de NPs-ZnO.



Fonte: Autoria própria.

Para a inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* ATCC25923 (Gram-positiva) foram necessários $150 \mu\text{g mL}^{-1}$ das NPs-ZnO obtidas no **Controle 1** e nas *Sínteses 5.2*, *8.2* e $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.5* e *8.3*, ou seja, uma quantidade bastante inferior do que a necessária para inibir o crescimento da cepa de *E. coli* ATCC25922 (Gram-negativa). Este resultado permitiu sugerir que as células Gram-negativas da bactéria *E. coli* ATCC25922, possuem maior resistência às NPs-ZnO, obtidas neste estudo, do que as células Gram-positivas da bactéria *S. aureus* ATCC25923. Possivelmente, esta resistência pode ser atribuída às diferenças entre as paredes celulares das duas bactérias e as suas interações com as NPs-ZnO.

YUSOF et al. (2020) sintetizaram NPs-ZnO pela via biológica usando cepa de *Lactobacillus plantarum* e obtiveram NPs-ZnO com tamanho de 192 nm para partículas com morfologia irregular (MI) e 291 nm para partículas com forma semelhante a flor (MF). A fim de avaliar da atividade antimicrobiana das NPs-ZnO, os autores usaram o método de difusão de disco.

Para a atividade bacteriostática contra *E. coli* foi necessária uma concentração de $625 \mu\text{g mL}^{-1}$ das NPs-ZnO MI e $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ das NPs-ZnO MF. E para a atividade bacteriostática contra cepa de *S. aureus* foi necessária uma concentração de $312,5 \mu\text{g mL}^{-1}$

¹ das NPs-ZnO MI e 1250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ das NPs-ZnO MF. Apesar da diferença de tamanho das NPs-ZnO obtidas neste trabalho para as obtidas no estudo de YUSOF e seus colaboradores, a concentração de NPs-ZnO necessária para inibir o crescimento de células de *E. coli* foi bastante similar, 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já a concentração de NPs-ZnO, obtidas neste trabalho, necessárias para inibir o crescimento das células de *S. aureus*, foram menores em relação às NPs-ZnO sintetizadas no estudo de Yusof et al. (2020).

No presente trabalho, houve a tentativa de realizar o teste antimicrobiano usando o método de difusão de disco, no entanto, as NPs-ZnO ficaram impregnadas no papel. Como não houve a difusão das NPs-ZnO para o meio este método não se mostrou adequado para a avaliação da ação antimicrobiana em nosso estudo. Na literatura a maioria dos estudos encontrados usaram o método de difusão (MOGHADDAM et al., 2017; BALRAJ et al., 2017) o que dificulta a comparação.

Nenhuma das NPs-ZnO estudadas apresentaram atividade bactericida contra a cepa de *S. aureus* ATCC25923.

6.4.13 Estabilidade das NPs-ZnO

As NPs-ZnO em água formam um sistema coloidal sol, onde a fase sólida dispersa são as NPs-ZnO e a fase de dispersão líquida é a água. Um dos pontos críticos da estabilidade neste sistema coloidal são as diferentes interações entre as fases dispersa e a de dispersão. Com o passar do tempo, o sistema coloidal, pode permanecer estável devido à afinidade entre a superfície da partícula e do solvente, ou desestabilizar resultando na agregação das partículas com formação de unidades maiores que podem se separar da fase de dispersão e sedimentarem (JUNIOR; VARANDA, 1999).

As interações entre as partículas dependem da quantidade de partículas dispersas no sistema coloidal e da distância de separação entre elas. As partículas coloidais adquirem cargas elétricas na superfície, quando expostas ao contato com um solvente polar, devido a dissociação de grupos da superfície e adsorção, ou dissolução, de íons da superfície (JUNIOR; VARANDA, 1999).

Em nosso estudo, onde pode haver presença de matéria orgânica na superfície das NPs-ZnO, as cargas na superfície das NPs-ZnO possivelmente podem ser atribuídas à protonação/desprotonação das moléculas que interagem com os planos cristalográficos do ZnO.

O valor de pH influencia muito o comportamento coloidal, pois afeta a carga superficial das interfaces. Assim, a fim de verificar a estabilidade das Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3, as curvas de potencial zeta foram construídas em função do pH.

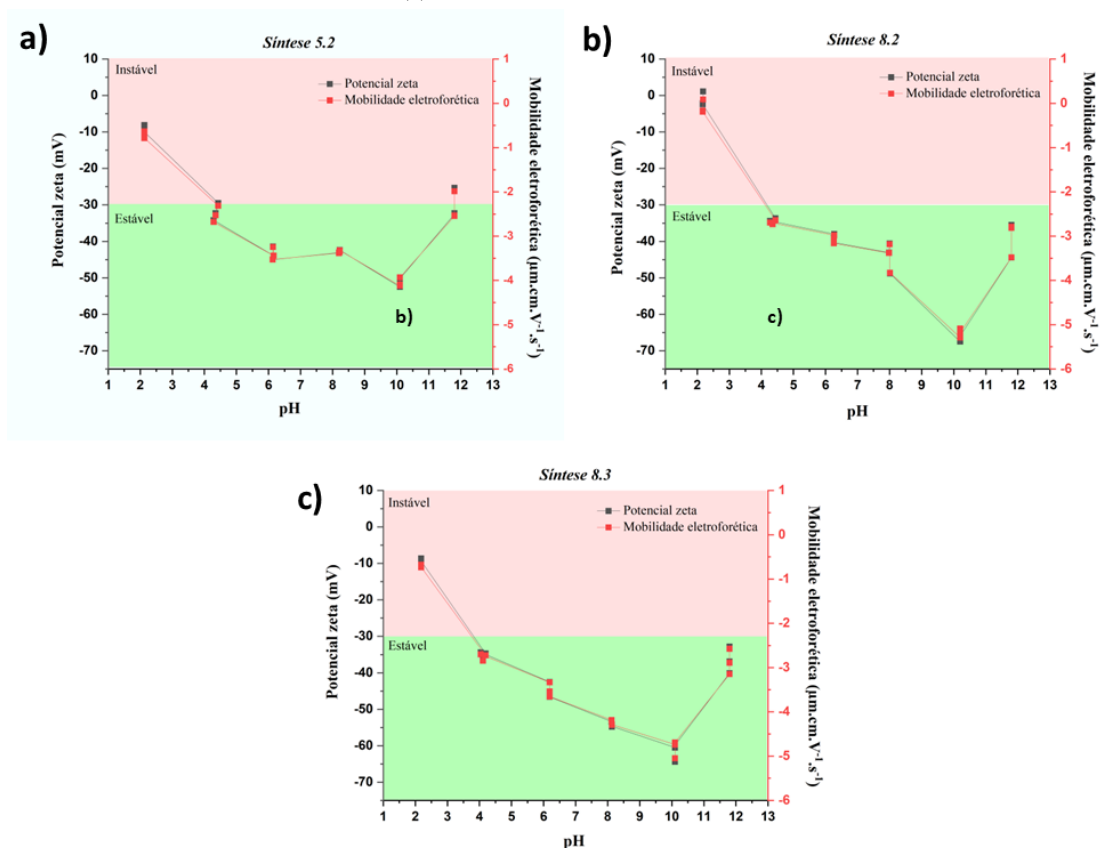
As duas principais forças que devem ser consideradas quando existe interação entre partícula-partícula são a de van der Waals e a de repulsão eletrostática. Assim, com base nestas interações, o potencial zeta é calculado, de forma indireta, em função da mobilidade eletroforética (EM) (SANTOS, 2021).

A EM é a razão entre a velocidade com que as partículas carregadas se movem no sistema coloidal e o campo elétrico aplicado para provocar a movimentação das partículas através da diferença de potencial. Quanto maior a magnitude do valor do potencial zeta, maior será a repulsão eletrostática entre as partículas que tenderão a ficar dispersas no sistema coloidal. Ao contrário, quanto menor a magnitude do valor do potencial zeta, menor a repulsão entre as partículas que tenderão a se aglomerarem (SANTOS, 2021).

De acordo com a literatura, o sistema coloidal possui boa estabilidade quando os valores de potencial zeta estão acima de 30 mV ou abaixo de -30 mV, sendo considerado um sistema de excelente estabilidade quando os valores estão acima de 60 mV e abaixo de -60 mV. É considerado instável, as partículas se agregam rapidamente, quando os valores estão entre -5 mV e 5 mV. Quando os valores de potencial zeta estão por volta de ± 20 mV a estabilidade é considerada de curto prazo (AL-ALAWY et al., 2018; HONARY et al., 2013).

A Figura 114 mostra a curva de potencial zeta e a mobilidade eletroforética em função do pH para as *Sínteses* 5.2, 8.2 e 8.3.

Figura 114- Potencial zeta e mobilidade eletroforética das NPs-ZnO dispersas em meio aquoso na presença do eletrólito NaCl 10^{-3} M. (a) NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2*. (b) NPs-ZnO obtidas na *Síntese 8.2*. (c) NPs-ZnO obtidas na *Síntese 8.3*.



Fonte: Autoria própria.

Em geral as três sínteses apresentarem boa estabilidade. Lembrando que a diferença entre as *Sínteses 5.2*, *8.2* e *8.3* foi a matéria orgânica utilizada. A *Síntese 5.2* foi feita com o *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, a *Síntese 8.2* com o *caldo de síntese* da bactéria *B. amyloliquefaciens* RFD1C e a *Síntese 8.3* com o biossurfactante Ramnolípídeo comercial. A Tabela 50 mostra os potenciais zeta, nos respectivos valores de pH, das *Sínteses 5.2*, *8.2* e *8.3*.

Tabela 50- Potencial zeta (mV) nos respectivos valores de pH das *Sínteses 5.2*, *8.2* e *8.3*.

<i>Síntese 5.2</i>		<i>Síntese 8.2</i>		<i>Síntese 8.3</i>	
pH	Potencial zeta (mV)	pH	Potencial zeta (mV)	pH	Potencial zeta (mV)
11,8	-30,03	11,8	-38,60	11,8	-36,60
10,1	-51,63	10,2	-66,13	10,1	-61,57
8,2	-42,77	8,0	-44,16	8,1	-54,30
6,1	-43,43	6,3	-39,13	6,2	-44,77
4,4	-32,00	4,3	-34,30	4,1	-35,13
2,1	-9,30	2,2	-1,89	2,2	-8,91

Fonte: Autoria própria.

Para as NPs-ZnO obtidas na *Síntese 5.2* o potencial zeta foi de aproximadamente -30 mV em pH ~4 e pH ~12 (Tabela 50). A estabilidade aumentou no pH 8 e 6 onde os valores foram próximos de -40 mV. O pH em que as NPs-ZnO tiveram maior estabilidade foi o pH 10, com potencial zeta em torno de -52 mV. Estes resultados indicaram que as NPs-ZnO estão fortemente carregadas e sugerem que a matéria orgânica presente na superfície das NPs-ZnO proporcionou sistemas coloidais estáveis em uma ampla faixa de pH (4 – 12). As NPs-ZnO apresentaram baixa estabilidade no pH 2 (potencial zeta -10 mV), sugerindo uma superfície, com pouca carga, que favoreceu a aglomeração das NPs-ZnO. Os íons Zn^{2+} são solúveis em pH ácido, isso possivelmente contribuiu para a instabilidade das NPs-ZnO neste pH (POURBAIX, 1974).

Na *Síntese 8.2* os resultados foram melhores, entre os pH 4 – 8 e no pH 12 onde os valores de potencial zeta ficaram entre -35 mV e -45 mV indicando que nestes pH o sistema coloidal apresentou uma estabilidade muito boa. A estabilidade aumenta no pH 10, onde o valor do potencial zeta foi de -66 mV. O sistema coloidal constituído com as NPs-ZnO também apresentou instabilidade no pH 2 (aproximadamente -2 mV) (Tabela 50).

Na *Síntese 8.3* os resultados foram semelhantes aos obtidos na *Síntese 8.2*. O sistema coloidal das NPs-ZnO apresentou estabilidade muito boa na faixa de pH 4 – 8 e pH 12 onde o potencial zeta variou de -35 mV a -54 mV. Também no pH 10 o sistema atingiu um potencial zeta de -62 mV indicando que a estabilidade neste pH foi excelente. No entanto, tal como ocorreu nas *Sínteses 5.2* e *8.2*, no pH 2 o sistema apresentou instabilidade (Tabela 50).

É interessante notar que nas três sínteses o sistema coloidal apresentou estabilidade excelente no pH 10 indicando que neste pH a superfície das NPs-ZnO estão mais fortemente carregadas o que impede a sua sedimentação.

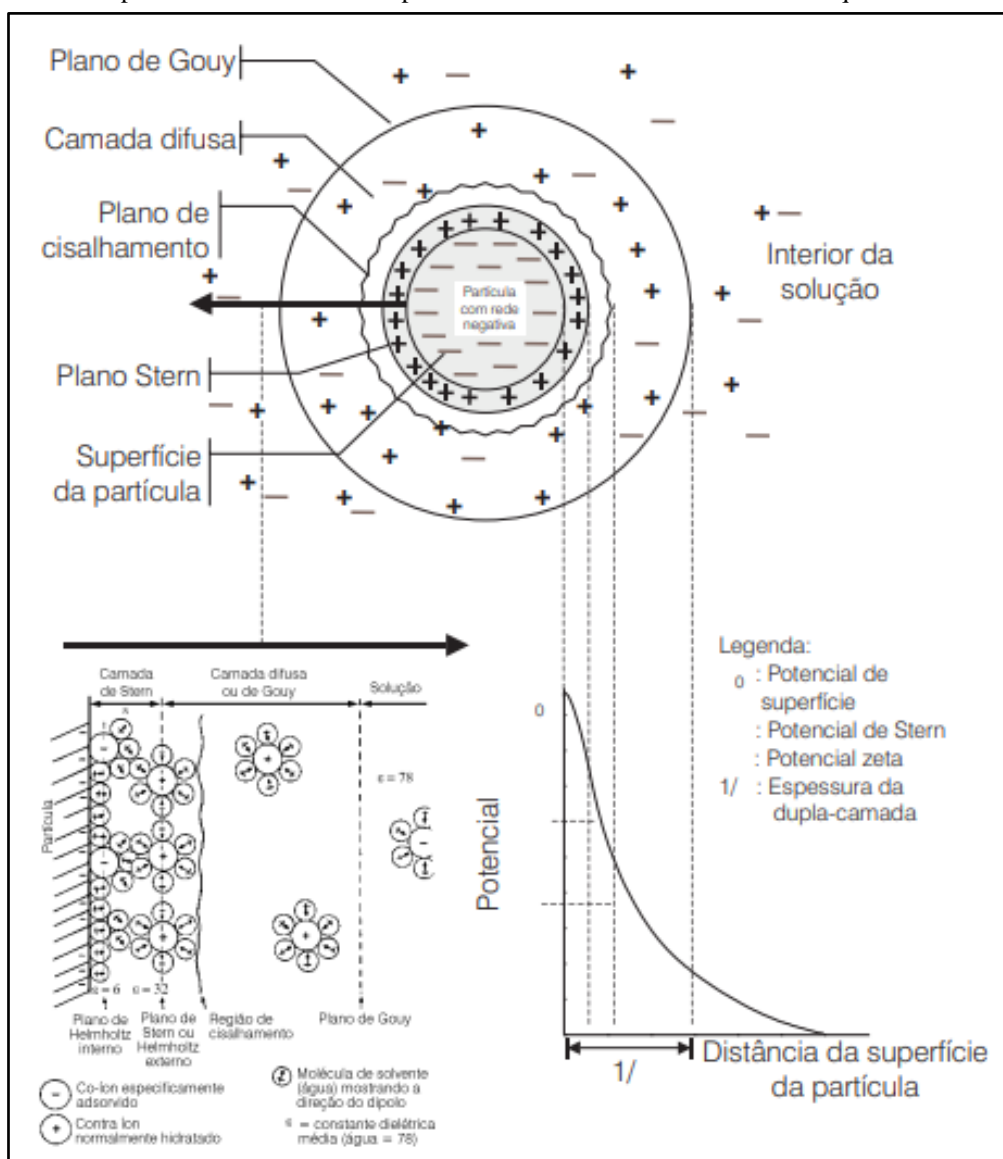
É plausível inferir que a presença da matéria orgânica na superfície das NPs-ZnO tenha atribuído a alta estabilidade das NPs-ZnO nos valores de pH mais alcalinos (10 e 12), pois em valores de pH acima de 10 a corrosão/deterioração do ZnO é favorecida (PORBAIX, 1974).

Em nenhum sistema coloidal, formado pelas NPs-ZnO das três sínteses distintamente, foi possível observar o ponto isoelétrico (P_{IE}), pois em nenhuma delas a medida do potencial zeta chegou a zero. O P_{IE} equivale ao potencial eletrocinético no plano de cisalhamento e é obtido quando o potencial zeta se iguala a zero, neste ponto a suspensão, ou o coloide, atinge sua instabilidade máxima (SANTOS, 2021). Pelo comportamento das curvas, foi possível sugerir que o P_{IE} poderia ser encontrado em

sistemas com pH abaixo de 2, sendo mais provável de ser atingido na *Síntese 8.2*, por ser a curva que mais se aproximou de zero.

Para melhor compreensão da discussão, a Figura 115 mostra o esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido (JUNIOR; VARANDA, 1999).

Figura 115- Esquema da distribuição de cargas na vizinhança de uma partícula carregada e os respectivos potenciais associados à dupla camada elétrica na interface sólido-líquido.



Fonte: JUNIOR; VARANDA (1999).

Além do potencial zeta também foram feitas as medidas, em pH neutro, do diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*) e do índice de polidispersividade (PDI) das NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.2*, *8.2* e *8.3* (Tabela 51).

Tabela 51- Valores de diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*) e índice de polidispersividade (PDI) para as NPs-ZnO obtidas nas *Sínteses 5.2, 8.2 e 8.3*.

<i>Síntese 5.2</i>		<i>Síntese 8.2</i>		<i>Síntese 8.3</i>	
<i>Z-Average</i> (nm)	PDI	<i>Z-Average</i> (nm)	PDI	<i>Z-Average</i> (nm)	PDI
5194	1,000	951,0	0,872	5441	1,000
4972	0,732	640,9	0,631	2222	1,000
2152	1,000	655,8	0,600	4911	1,000

Fonte: Autoria própria.

O índice de polidispersividade (PDI) mede a heterogeneidade de uma amostra com base no seu tamanho. Um valor de PDI alto pode indicar que a dispersão contém grandes partículas ou aglomerados. Pela literatura, uma dispersão é considerada monodispersa quando o PDI é menor do que 0,05 e polidispersa quando o PDI está acima de 0,7 (MUDALIGE et al., 2019).

Como pôde ser observado na Tabela 51, para as três sínteses analisadas (5.2, 8.2 e 8.3) os PDIs foram altos, podendo considerar que as dispersões em meio aquoso nas três sínteses são polidispersas. Assim, em água as NPs-ZnO possuem alta heterogeneidade de tamanho.

Pôde ser observado que as NPs-ZnO ao se dispersarem em água passavam a ter um comportamento um pouco gelatinoso. O gel é um coloide onde a interação das partículas muito finas com o solvente aumenta a viscosidade do sistema tornando-se uma massa com partículas organizadas no meio de dispersão (JUNIOR; VARANDA, 1999). Pode ser que esta característica das dispersões de NPs-ZnO obtidas neste estudo tenha contribuído para a obtenção dos altos valores de PDI e da grande variação no diâmetro hidrodinâmico (*Z-Average*) das NPs-ZnO em meio aquoso.

7. CONCLUSÃO

Através do *caldo de síntese* da bactéria, *Bacillus megaterium* RF1C foi possível obter as NPs-ZnO pela via extracelular usando condições de síntese sustentáveis em relação à temperatura (32°C) e ao pH (8,0).

O *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C apresentou composição rica em proteínas.

As variações dos parâmetros de síntese como pH, quantidade de *caldo de síntese*, concentração do sal precursor de $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, tempo de síntese e tipo de matéria orgânica, não provocou variação significativa no tamanho dos cristalitos. No entanto, a quantidade de *caldo de síntese* influencia no tamanho de grão do ZnO.

Em pH acima de 8, a morfologia das NPs-ZnO teve perda da definição.

O tempo de síntese dependeu da composição da matéria orgânica. Após 6 h de síntese as NPs-ZnO já estavam formadas.

O estudo do tempo sugeriu que o mecanismo de síntese das NPs-ZnO passa pela formação intermediária do ϵ -Zn(OH)₂.

A variação do tipo de matéria orgânica na síntese também não favoreceu grandes diferenças na morfologia que foi predominantemente cúbica, com exceção da síntese feita com o 1,3-diaminopropano que forneceu as NPs-ZnO com morfologia semelhante a um prisma.

A síntese feita com 4 mL do *caldo de síntese* usando 20 mL da solução do sal precursor $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ a 0,32 M apresentou um ótimo rendimento (93,3%). Além disso, as NPs-ZnO apresentaram excelente estabilidade em dispersão aquosa.

As NPs-ZnO sintetizadas apresentaram atividade antimicrobiana, bacteriostática, contra as cepas Gram-positivas (*S. aureus* - ATCC25923) e Gram-negativas (*E. coli* - ATCC25922). A síntese feita com o biossurfactante Ramnolipídeo apresentou melhor resultado de atividade biológica contra *E. coli* (ATCC25922).

A repetibilidade das sínteses, assim como o tempo de obtenção das NPs-ZnO, dependeu da composição do *caldo de síntese*, a qual ficou vulnerável ao metabolismo das bactérias.

A análise de FT-IR indicou que a presença de carboxilatos na superfície das NPs-ZnO com coordenação do tipo quelante.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar a obtenção das NPs-ZnO em larga escala através da rota proposta neste trabalho – *caldo de síntese* da bactéria *B. megaterium* RF1C, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ a 0,32 M, pH 8,0, a 32°C por 24 h em agitação orbital com velocidade de 150 rpm no shaker.
- Aprofundar o estudo da atividade antimicrobiana, verificando também a influência da matéria orgânica. Realizando, por exemplo, a calcinação das NPs-ZnO para fazer um estudo sobre a influência da barreira difusional que a matéria orgânica causa.
- Calcinar as sínteses que não tiveram ajuste de pH para verificar se haverá a formação dos planos cristalinos de ZnO.
- Fazer uma extração das NPs-ZnO a fim de remover a matéria orgânica e realizar análise de CG-EM do material extraído para ajudar na elucidação da matéria orgânica envolvida na síntese das NPs-ZnO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEYEMI, J.O.; ELEMIKE, E.E.; ONWUDIWE, D.C. ZnO nanoparticles mediated by aqueous extracts of *Dovyalis caffra* fruits and the photocatalytic evaluations. **Materials Research Express**, Bristol, v. 6, 2019.
- AL-ALAWY, A. F.; AL-ABODI, E. E.; KADHIM, R., M. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles by co-precipitation method at diferente conditions. **Journal of Engineering**, Baghdad, v. 24, n. 10, p. 60-72, 2018.
- AL-ZAHRANI, H. A.; EL-WASEIF, A. A.; EL-GHWAS, D.E. Biosynthesis and evaluation of TiO₂ and ZnO nanoparticles from in vitro stimulation of *Lactobacillus johnsonii*. **Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences**, Aurangabad, v. 5 (1), p. 16-20, 2018.
- AMBIKA, S.; SUNDRARAJAN, M. Antibacterial behaviour of *Vitex negundo* extract assisted ZnO nanoparticles against pathogenic bacteria. **Journal of Photochemistry Photobiology. B: Biology**, Amsterdam, v. 146, p. 52-57, 2015.
- AMENTA, V.; ASCHBERGER, K.; ARENA, M.; BOUWMEESTER, H.; BOTELHO MONIZ, F.; BRANDHOFF, P.; PETERS, R.J. Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Maryland Heights, v. 73, n. 1, p. 463–476, 2015.
- ANJOS, C. S. **Biodegradação dos pesticidas esfenvalerato, espiroclifeno, tiametoxam e imidacloprido por linhagens bacterianas isoladas do cerrado reflorestado e citricultura da laranja**. Orientador: André Luiz Meleiro Porto. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2018.
- APPLEROT, G.; LIPOVSKY, A.; DROR, R.; PERKAS, N.; NITZAN, Y.; LUBART, R.; GEDANKEN, A. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury. **Advanced Functional Materials**, Weinheim, v. 19, p. 842-852, 2009.
- ATKINS, P. W.; SHRIVER, D. F.; OVERTON, T.L.; ROURKE, J. P.; WELLER, M. T.; ARMSTRONG, F. A. Nanomateriais, Nanociência e Nanotecnologia. **Química Inorgânica**. 4.ed., Porto Alegre: Bookman, p. 665-701, 2008.
- AURANGZEB, K. Raman Spectroscopic Study of the ZnO Nanostructures. **Journal of Pakistan Materials Society**, Lahore, v. 4, 2010.
- BALRAJ, B.; SENTHILKUMAR, N.; SIVA, C.; KRITHIKADEVI, R.; JULIE, A.; POTHEHER, I. V.; ARULMOZHI, M. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using marine *Streptomyces* sp. with its investigations on anticancer and antibacterial activity. **Research on Chemical Intermediates**, Dordrecht, v. 43, n. 4, p. 2367–2376, 2017.
- BASKAR, G; CHANDHURU, J; FAHAD, KS; PRAVEEN, A. Mycological Synthesis, characterization and antifungal activity of zinc oxide nanoparticles. **Asian Journal Pharmacology and Technology**, Fremont, v. 3, p. 142–146, 2013.

BAYDA, S.; ADEEL, M.; TUCCINARD, T.; CORDANI, M.; RIZZOLIO, F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. **Molecules**, Basel, v. 25, p.1-15, 2020.

BERGEY, S. **Manual of Determinative Bacteriology**, 8.ed. Williams & Wilkins. Baltimore. USA, 1974.

BERTUSO, P. D. C. **Ramnolipídeos como alternativas no controle de *Bacillus cereus* e *Leishmania infantum chagasi***. Orientador: Márcia Nitschke. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2022.

BIRON, D. S. **Síntese de óxido de zinco nanoestruturado via método poliol, sua caracterização microestrutural e avaliação de sua ação antimicrobiana em membranas cerâmicas**. Orientador: Carlos Pérez Bergmann. Tese (Doutor em Engenharia) - m Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais (PPGE3M), UFRGS, Porto Alegre, 2020.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, N.; DJEDIAT, S.; BENEDETTI, M. F.; FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal médium. **Nano Letters**, Columbus, v. 6, p. 866-870, 2006.

BRECEVIC, L.; KRALJ, D., Kinetics and mechanisms of crystal growth in aqueous solutions. **Interfacial Dynamics**. Kallay, N., ed. Marcel Dekker, New York. USA; v. 88, pp 435 – 474, 2000.

BROCK, T.D; MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; BENDER, K.; BUCKLEY, D.; STAHL, D. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre. Artmed, 2016.

BUNK, B.; ARNE SCHULZ, A.; STAMMEN, S.; MUENCH, R.; WARREN, M.; ROHDE, M.; JAHN, D.; BIEDENDIECK, R. A short story about a big magic bug. **Bioengineered Bugs**, Philadelphia, p. 85–91, 2010.

BUNN, C. **Cristais – seu papel na natureza e na ciência**. São Paulo: USP, 1972.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2 ed. UNICAMP, p. 68, 2013.

CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.; BASNET, M. Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 46, p. 186-195, 2006.

CHILITI, T.; ALVES, B.; SCIENA, C. R.; PARIS, E. C. Síntese de óxido de zinco pelo método dos precursores poliméricos e avaliação de parâmetros de síntese no controle de formação de fase. **Embrapa Instrumentação**, Brasília, p. 551-554, 2017.

CLARO, P. B. O.; CLARO, D. P.; AMÂNCIO, R. Entendendo o conceito de sustentabilidade nas organizações. **Revista de Administração - RAUSP**, Ribeirão Preto, v. 43, n. 4, p. 289-300, 2008.

COCKERILL, F. R.; WIKLER, M. A.; ALDER, J.; DUDLEY, M. N.; ELIOPOULOS, G. M.; FERRARO, M. J.; HARDY, D. J.; HECHT, D. W.; HINDLER, J. A.; PATEL, J. B.; POWELL, M.; SWENSON, J. M.; THOMSON, R. B.; TRACZEWSKI, M. M.; TURNIDGE, J. D.; WEINSTEIN, M. P.; ZIMMER, B. L. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard**. 9 ed. Wayne: CLSI, v. 32, n. 2, 2012.

COTTON, G. C.; LAGESSE, N. R.; PARKE, L. S.; MELEDANDRI, C. J. 3.04 - Antibacterial Nanoparticles. **Comprehensive Nanoscience and Nanotechnology**, Dunedin, v. 3, p. 65-82, 2019.

DU, L.; , TIAN, H.; WANG, W.; DING, J.; WEI, X.; SONG, M. Thermal stability of the eutectic composition in NaCl-CaCl₂-MgCl₂ ternary system used for thermal energy storage applications. **Energy Procedia**, Amsterdam, v. 105, p. 4185-4191, 2017.

DUKE, C. B.; LUBINSKY, A. R., Calculations of low-energy electron-diffraction intensities from polar faces of ZnO. **Surface Science**, Amsterdam, v. 50, n. 2, p. 605-614, 1975.

DULUB, O.; BATZILL, M.; DIEBOLD, U. Growth of copper on single crystalline ZnO: surface study of a model catalyst. **Topics in Catalysis**, New York, v. 36, n. 1-4, 2005

DURÁN, N.; MARCATO, P.D.; ALVES, O.L.; DE SOUZA, G.I.; ESPOSITO. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 3, n. 8, 2005.

ESWARI, J. S.; DHAGAT, S.; MISHRA, P. Biosurfactant assisted silver nanoparticle synthesis: a critical analysis of its drug design aspects. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, Bristol, v. 9, p. 1-8, 2018.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros ciência e tecnologia**, São Carlos, v. 25, p. 1-9, 2015.

FROST, R. L.; MARTENS, W. N.; WAIN, D. L., HALES, M. C. Infrared and infrared emission spectroscopy of the zinc carbonate mineral smithsonite. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 70, n. 5, p. 1120-1126, 2008.

GALERIANI, T. M.; COSMO, B. M. N. Métodos de determinação de extrato etéreo, proteína bruta e fibra em detergente neutro. **Revista Agronomia Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 4, 2020.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the proprieties of nano-drug delivery systems – a review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 12, p. 255-264, 2013.

HÜPKES, J.; OWEN, J.; PUST, S. E.; BUNTE, E. Chemical etching of zinc oxide for thin-film silicon solar cells. **ChemPhysChem**, Weinheim, v. 13, p. 66-73, 2012.

ITOH, S.; HONDA, H.; TOMITA, F.; SUZUKU, T. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin (mixture of c12, c13 and c14 fractions). **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 24, n. 12, p. 855-859, 1971.

JACINTO, M. J.; SILVA, V. C.; VALLADÃO D.M.S.; SOUTO, R.S. Biosynthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: a review. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 43, p. 1–12, 2021.

JAYASEELAN, C.; RAHUMAN, A.A.; KIRTHI, A.V.; MARIMUTHU, S.; SANTHOSHKUMAR, T.; BAGAVAN, A.; et al. Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 90, p. 78–84, 2012.

JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. **Química Nova**. São Paulo, nº 9, p. 9-13, 1999.

KARNAN, T.; SELVAKUMAR, S.A.S. Biosynthesis of ZnO nanoparticles using rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel extract and their photocatalytic activity on methyl orange dye. **Journal of Molecular Structure**, Amsterdam, v. 1125, p. 358-365, 2016.

KAWANO, T.; IMAI, H. Nanoscale morphological design of ZnO crystals grown in aqueous solutions. **The Ceramic Society of Japan**; Tokyo, v. 118, p. 969-976, 2010.

KOLAHALAM, L. A.; VISWANATH, K. I. V.; DIWAKAR, B. S.; GOVINDH, B.; REDDY, V.; MURTHY, Y.L.N. Review on nanomaterials: synthesis and applications. **Materialstoday Proceedings**, Amsterdam, v. 18, p. 2182-2190, 2019.

KRÓL, A.; RAILEAN-PLUGARU, V.; POMASTOWSKI, P.; ZŁOCH, M.; BUSZEWSKI, B. Mechanism study of intracellular zinc oxide nanocomposites formation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 553, p. 349–358, 2018.

KUNAT, M.; GIROL, S. G.; BECKER, T.; BURGHAUS, U.; WOLL, C., Stability of the polar surfaces of ZnO: a reinvestigation using He-atom scattering. **Physical Review B**, College Park, v. 66, n. 8, p. 081402 (1-3), 2002.

KUMAR, S.; SAHARE, P. D. Effects of annealing on the surface defects of zinc oxide nanoparticles. **Nano**, Singapore, v. 7, n. 3, p.1 250022 (1-29), 2012.

KUNDU, D.; HAZRAA, C.; CHATTERJEEB, A.; CHAUDHARIA, A.; MISHRAB, S. Extracellular biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: multifunctional textile finishing, biosafety evaluation and in vitro drug delivery in colon carcinoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 140, p. 194-204, 2014.

LLOYD, A. L. Anderson. Discovery of the 'porosome' the universal secretory machinery in cells. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Istanbul, v. 10, p. 126-131, 2006.

MARTINS, C. R. F.; FERREIRA, J.; A. P. S.; SIQUEIRA, L. F. G.; FERREIRA, L. A. P.; BAZZO, M. L.; OSCAR, M. F.; VALLE, J. B. S. **Técnica de Coloração de Gram**. Brasília: Ministério da Saúde, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 1997.

MELO, C. C. **Síntese e investigações estruturais de arranjos supramoleculares formados por metaloporfirinas e metaloftalocianinas**. Orientador: Wania da Conceição Moreira. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, UFSCar, São Carlos, 2012.

MELO, C.P.; PIMENTA, M. Nanociências e nanotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, Santa Maria: Ciência e Natura, v. 29, 2007.

MERKUS, H. G. **Particle size measurements: fundamentals, practice, quality**. Dordrecht: Springer Dordrecht, 2009.

MILES, A. A.; MISRA, S. S.; IRWIN, J. O. The Estimation of the bactericidal power of the blood. **The Journal of Hygiene**, Cambridge, v. 38, n. 36, p. 732-749, 1938.

MOGHADDAM, A.B.; MONIRI, M.; AZIZI, S., RAHIM, R.A.; ARIFF, A.B.; SAAD, W.Z.; NAMYAR, F.; NAVADERI, M. Biosynthesis of ZnO Nanoparticles by a new *Pichia kudriavzevii* yeast strain and evaluation of their antimicrobial and antioxidant activities. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 6, p. 872, 2017.

MROUÉ, K. H.; POWER, W. P. High-field solid-state Zn NMR spectroscopy of several zinc–amino acid complexes. **The Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 114, 1, p. 324–335, 2010.

MUDALIGE, T.; QU, H.; HAUTE, D. V.; ANSAR, S. M.; PAREDES, A.; INGLE, T. Chapter 11 - Characterization of nanomaterials: tools and challenges. **Micro and Nano Technologies**, Singapore, p. 313-353, 2019.

MUÑOZ, M. M. **Estudo dos mecanismos de formação de estruturas de ZnO com diferente morfologia e a sua influência na eficiência da atividade fotocatalítica sobre moléculas orgânicas**. Orientador: José A. H. Coaquira. Tese (Doutorado em Física) – Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2018.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**, 4 ed. New Jersey: Wiley – Interscience publication, 1986.

NARAYANAN J.; RAMJI, R.; SAHU, H.; GAUTAM, P. Synthesis, stabilization and characterization of rhamnolipid-capped ZnS nanoparticles in aqueous medium. **IET Nanobiotechnology**, Stevenage, v. 4(2), p. 29–34, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 143-144, 2014.

NGUYEN, N. T.; NGUYEN, V. A. Synthesis, characterization, and photocatalytic activity of ZnO nanomaterials prepared by a green, nonchemical route. **Journal of Nanomaterials**, London, 2020.

- NICHOLAS, N. J. **Control of ZnO crystal morphology through face specific adsorption**. Supervisors: William Ducker and Professor George Franks. Tese (Doctor of Philosophy) - University of Melbourne Victoria, Australia, 2011.
- NUNES, R. S. **Estudo do comportamento térmico de alguns aditivos alimentares por TG/DTG, DTA e DSC**. Orientador: Éder Tadeu Gomes Cavalheiro. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2009.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista brasileira de farmacognosia**, Heidelberg, v. 18, p. 301-307, 2008.
- ÖZGÜR, Ü; ALIVOV, Y. L.; LIU, C.; TEKE, A.; RESHCHIKOV, M. A.; DOĞAN, S.; AVRUTIN, V.; CHO, S. J.; MORKOÇ, H. A comprehensive review of ZnO materials and devices. **Journal of Applied Physics**, New York, v. 98, p. 1-103, 2005.
- PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles – an antimicrobial study. **Science Technologies Advanced Materials**, Boca Raton, v. 9, p. 035004, 2008.
- PAPINI, C. J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. Orientador: Ricardo Mendes Leal Neto. Dissertação de Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares – IPEN, São Paulo, 2003.
- PASQUET, J.; CHEVALIER, Y.; PELLETIER, J.; COUVAL, E.; BOUVIER, D.; BOLZINGER, M. A. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 457, p. 263-274, 2014.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.
- PICCINNO, F.; GOTTSCHALK, F.; SEEGER, S.; NOWACK, B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 14, n. 1109, 2012.
- POURBAIX, M. **Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions**. 2 ed. Houston: Houston National Association of Corrosion Engineers, 1974.
- PRASAD, K.; JHA, A. K. ZnO Nanoparticles: synthesis and adsorption study. **Natural Science**, Irvine, v. 1, n. 2, p. 129-135, 2009.
- RAGO, I.; CHANDRAIAHGAR, C. R.; BRACCIALE, M. O.; BELLIS, G. D.; ZANNI, E.; GUIDI, M. C.; SALI, D.; BROGGI, A.; PALLESCHI, C.; SARTO, M. S.; UCCELLETTI, D. Zinc oxide microrods and nanorods: Different antibacterial activity and their mode of action against Gram-positive bacteria. **RSC Advances**, Cambridge, v. 4, p. 56031-56040, 2014.

RAJABAIRAVI, N.; RAJU, C. S.; KARTHIKEYAN, C.; VARUTHARAJU, K.; NETHAJI, S.; HAMEED, A. S. H.; SHAJAHAN, A. Biosynthesis of novel zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using endophytic bacteria *Sphingobacterium thalpophilum*. **Recent trends in materials science and applications**, Hong Kong, chapter 23, p. 245 – 254, v. 189, 2017.

RAO, C. N. R. Transition Metal Oxides. **Annual Physical Chemistry Review**, Palo Alto, v. 40, p. 291–326, 1989.

RAUF, M. A.; OWAIS, M.; RAJPOOT, R.; AHMAD, F.; KHAN, N.; & ZUBAIR, S. Biomimetically synthesized ZnO nanoparticles attain potent antibacterial activity against less susceptible *S. aureus* skin infection in experimental animals. **RSC Advances**, Cambridge, v. 7, n. 58, 2017

REDDY, A. S.; CHEN, C-Y.; CHEN, C-C.; JEAN, J-S.; FAN, C-W.; CHEN, H-R.; WANG, J-C.; NIMJE, V. R. Synthesis of gold nanoparticles via an environmentally benign route using a biosurfactant. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Valencia, v. 9, n. 11, p. 6693–6699, 2009.

SABARINATHAN, D.; VANARAJ, S.; S SATHISKUMAR, S.; CHANDRIKA, S. P.; SIVARASAN, G.; ARUMUGAM, S. S.; PREETHI, K.; LI, H.; CHEN, Q. Characterization and application of rhamnolipid from *Pseudomonas plecoglossicida* BP03. **Letters in Applied Microbiology**, Chichester, v. 72, n. 3, p. 251 – 262, 2021.

SÁNCHEZ, M. C.; González, M. C.; MORALES, J. C. R.; PLACERES, J. C. R. Polarographic study of the coordinated system Zn(II) - glycine - glycinate ion. **Talanta**, Amsterdam, v. 43, p. 1081-1089, 1996.

SANTOS, N. M. **Nanopartículas magnéticas biocompatíveis e funcionalizadas com ácido fólico como potencial agente teranóstico no tratamento de câncer via magnetohipertermia**. Orientador: Laudemir Carlos Varanda. Dissertação (Mestre em Química) – Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2021.

SARAVANAN, M.; GOPINATHC, B.V.; CHAURASIAB, M.K.; SYEDD, A.; AMEEND, F.; PURUSHOTHAMANE, N. Green synthesis of anisotropic zinc oxide nanoparticles with antibacterial and cytofriendly properties. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 115, p. 57–63, 2018.

SCHIEK, M.; AL-SHAMERY, K.; KUNAT, M.; TRAEGER, F.; WÖLL, C., Water adsorption on the hydroxylated H-(1 X 1) O-ZnO(0001) surface. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 8, p. 1505-1512, 2006.

SELVARAJAN, E.; MOHANASRINIVASAN, V. Biosynthesis and characterization of ZnO nanoparticles using *Lactobacillus plantarum* VITES07. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 112, p. 180-182, 2013.

SHABAANI, M.; RAHAIEE, S; ZARE, M; JAFARI, S.M. Green synthesis of ZnO nanoparticles using loquat seed extract; biological functions and photocatalytic degradation properties. **LWT**, London, v. 134, p. 110133, 2020.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos Colóides e Superfícies** (Tradução de J. H. Maar). Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 185, 1975.

SHIMIZU, K., NAKAMURA, H.; ASHIUCHI, M. Salt-inducible bionylon polymer from *Bacillus megaterium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, p. 2378–2379, 2007.

SINGH, B. N.; , RAWAT, A. K. S.; KHAN, W.; NAQVI, A. H.; SINGH, B. R. Biosynthesis of stable antioxidant ZnO nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, 2014

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SMITH, E., DENT, G. **Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach**, Oxford: John Wiley & Sons, p. 210, 2005.

SOTIROVA, A. V.; SPASOVA, D. I.; GALABOVA, D. N.; KARPENKO, E.; SHULGA, A. Rhamnolipid – biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. **Current Microbiology**, New York, v. 56, p. 639 – 644, 2008.

SOUZA, V.R. **Diferentes meios de cultivo e condições operacionais na produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium***. Orientador: Raquel de Lima Camargo Giordano. Tese (Doutora em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2007.

STOILOVA, D.; KOLEVA, V.; VASSILEVA, V. Infrared study of some synthetic phases of malachite ($\text{Cu}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$)–hydrozincite ($\text{Zn}_5(\text{OH})_6(\text{CO}_3)_2$) series. **Spectrochimica Acta Part A**, Amsterdam, v. 58, p. 2051-2059, 2001.

SURESH, J.; PRADHEESH, G.; ALEXRAMANI, V; SUNDRARAJAN, M.; HONG, S. I. Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticle using insulin plant (*Costus pictus* D. Don) and investigation of its antimicrobial as well as anticancer activities, **Advances in Natural Sciences: Nanoscience Nanotechnology**, Bristol, v. 9, 2018.

TANG, C.; SPENCER, M. J. S.; BARNARD, A. S. Activity of ZnO polar surfaces: an insight from surface energies. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Cambridge, v. 16, n. 40, p. 22139-22144, 2014.

TIQUIA-ARASHIRO, S.; RODRIGUES, D. Nanoparticles synthesized by microorganisms. **Extremophiles: applications in nanotechnology**, Tokyo, v. 1, p. 1–51, 2016.

TRIPATHI, R. M.; BHADWAL, A. S.; GUPTA, R. K.; SINGH, S.; SHRIVASTAV, A.; SHRIVASTAV, B. R. ZnO nanoflowers: novel biogenic synthesis and enhanced photocatalytic activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Amsterdam, v. 141, p. 288-295, 2014

VEIGA, A. **Padronização e validação do método de microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima de compostos antimicrobianos.** Orientador: Fabio Seigi Murakami. Dissertação (Mestrado e Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

VIANA, J. G. **Biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por bactérias do gênero *Bacillus* isoladas da cultura da laranja.** Orientador: André Luiz Meleiro Porto. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química de São Carlos, USP, São Carlos, 2020.

VÍLCHEZ, J. I.; TANG, Q.; KAUSHAL, R.; WANG, W.; LV, S.; HE, D.; CHU, Z.; ZHANG, H.; LIU, R.; ZHANG, H. Complete genome sequence of *Bacillus megaterium* Strain TG1-E1, a plant drought tolerance-enhancing bacterium. **Microbiology Resource Announcements**, Washington, v. 7, n. 12, 2018.

WANDER, A.; SCHEDIN, F.; STEADMAN, P.; NORRIS, A.; MCGRATH, R.; TURNER, T. S.; THORNTON, G.; HARRISON, N. M., Stability of polar oxide surfaces. **Physical Review Letters**, College Park, v. 86, n. 17, p. 3811-3814, 2001.

WANG, M.; JIANG, L.; KIM, E. J.; HAHN, S. H. Electronic structure and optical properties of Zn(OH)₂: LDA+U calculations and intense yellow luminescence. **Chemistry Advances**, Cambridge, v. 5, p. 87496-87503, 2015.

WELDEGEBRIEAL, G. K. Synthesis method, antibacterial and photocatalytic activity of ZnO nanoparticles for azo dyes in wastewater treatment: A review. **Inorganic Chemistry Communications**, Amsterdam, v. 120, 108140, 2020.

WÖLL, C., The chemistry and physics of zinc oxide surfaces. **Progress in Surface Science**, Oxford, v. 82, n. 2-3, p. 55-120, 2007.

XIE, J.; LEE, J.Y.; WANG, D.I.C.; TING, Y.P. Silver nanoplates: from biological to biomimetic synthesis. **ACS Nano**, Washington, v. 1, n. 5, p. 429–439, 2007.

YAMAMOTO, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. **International Journal of Inorganic Materials**, Amsterdam, v. 3, p. 643-646, 2001.

YUSOF, H., M.; MOHAMAD, R.; ZAIDAN, U.H.; RAHMAN, N.A.A. Microbial synthesis of zinc oxide nanoparticles and their potential application as an antimicrobial agent and a feed supplement in animal industry: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 10, n. 1, p. 57, 2019.

YUSOF, M. H., RAHMAN, N. A.; MOHAMAD, R.; ZAIDAN, U. H.; SAMSUDIN, A. A. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles by cell-biomass and supernatant of *Lactobacillus plantarum* TA4 and its antibacterial and biocompatibility Properties. **Nature**, London, v. 10, 2020.

ZELENÁK, V.; VARGOVA, Z.; GYÖRYOVÁ, K. Correlation of infrared spectra of zinc(II) carboxylates with their Structures. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 262–272, 2007.

ZIKALALA, N.; MATSHETSHE, K.; PARANI, S.; OLUWAFEMI, O. S. Biosynthesis protocols for colloidal metal oxide nanoparticles. **Nano-Structures & Nano-Objects**, Amsterdam, v. 16, p. 288–299, 2018.

APÊNDICE A – Cálculos para determinar os tamanhos dos cristalitos

Cálculos do tamanho médio dos cristalitos, a partir dos picos obtidos nas análises de DRX, usando a equação de Debye-Scherrer.

D = diâmetro da partícula.

Controles 1 e 2

CONTROLE 1							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,8118	0,30102	28,966449	27,3	2,9
		0002	34,4513	0,26899	32,638507		
		101	36,3133	0,29909	29,506352		
		102	47,5875	0,339	27,034204		
		110	56,6109	0,36627	26,003921		
		103	62,8312	0,37774	26,012733		
		112	67,9056	0,40161	25,171917		
		201	69,0105	0,4373	23,269674		

CONTROLE 2							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,5458	0,38045	22,90377111	18,5	4,5
		0002	34,29785	0,35405	24,78688435		
		101	36,2417	0,39332	22,43274807		
		102	47,3931	0,57317	15,97738605		
		110	56,3765	0,5043	18,86574449		
		103	62,65725	0,61866	15,86810071		
		112	66,09475	0,84011	11,90808664		
		201	68,3762	0,65332	15,516761		

Síntese 4 – Estudo da variação do pH

pH 8,0							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,8862	0,31427	27,750329	25,3	2,1
		0002	34,5257	0,32195	27,275048		
		101	36,3468	0,32945	26,789805		
		102	47,621	0,36164	25,345031		
		110	56,6444	0,38468	24,763326		
		103	62,8851	0,40469	24,287416		
		112	67,9595	0,40054	25,24716		
		201	69,1258	0,47983	21,221842		

pH 9,0							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,7505	0,42166	20,675788	19,0	1,8
		101	36,2724	0,42961	20,539611		
		102	47,567	0,52753	17,371282		
		110	56,57	0,44933	21,192946		
		103	62,913	0,56941	17,264077		
		112	67,9874	0,55268	18,300205		
		201	69,0105	0,58361	17,436007		

pH 10,0							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,8453	0,47633	18,307071	17,3	1,7
		101	36,3263	0,48719	18,114869		
		102	47,5596	0,65168	14,061521		
		110	56,6444	0,4854	19,624962		
		103	62,8851	0,58042	16,934073		
		112	67,9595	0,59911	16,8792		
		201	69,0849	0,60401	16,854645		

Síntese 5 – Estudos da variação da quantidade de caldo de síntese da bactéria *B. megaterium* RF1C

20 mL de caldo de síntese da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,8862	0,31427	27,750329	25,3	2,1
		0002	34,5257	0,32195	27,275048		
		101	36,3468	0,32945	26,789805		
		102	47,621	0,36164	25,345031		
		110	56,6444	0,38468	24,763326		
		103	62,8851	0,40469	24,287416		
		112	67,9595	0,40054	25,24716		
		201	69,1258	0,47983	21,221842		

4 mL de caldo de síntese da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,7914	0,33471	26,04953	24,6	2,1
		0002	34,4513	0,31393	27,966209		
		101	36,2724	0,3355	26,30111		
		102	47,5466	0,39087	23,44297		
		110	56,5905	0,37406	25,459935		
		103	62,8516	0,43181	22,757969		
		112	67,8646	0,44964	22,47767		
		201	69,0514	0,4485	22,69415		

2 mL de caldo de síntese da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,73	0,25567	34,097505	31,1	5,1
		0002	34,39	0,21762	40,336262		
		101	36,211	0,25083	35,173126		
		102	47,5056	0,31356	29,218365		
		110	56,5086	0,31105	30,605635		
		103	62,7698	0,35078	28,002841		
		112	67,8237	0,38594	26,181359		
		201	68,9695	0,40435	25,159705		

1 mL de caldo de síntese da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,7914	0,27327	31,906313	29,1	5,6
		0002	34,4513	0,21502	40,83077		
		101	36,2724	0,27752	31,795987		
		102	47,5261	0,37985	24,121184		
		110	56,57	0,36009	26,445128		
		103	62,8107	0,38549	25,486981		
		112	67,9056	0,38336	26,370236		
		201	69,0514	0,39882	25,521103		

0,5 mL de caldo de síntese da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,7914	0,34325	25,401422	25,2	4,4
		0002	34,4718	0,25437	34,516331		
		101	36,3133	0,3326	26,533538		
		102	47,567	0,41491	22,08641		
		110	56,5905	0,40681	23,410298		
		103	62,8925	0,43055	22,82955		
		112	67,9874	0,46224	21,880749		
		201	69,1128	0,48865	20,837165		

Síntese 6 – Estudo da variação da concentração do sal precursor - $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Concentração do sal precursor - $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ - 0,064 M							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,5663	0,54168	16,087321	18,9	4,7
		0002	34,2467	0,7489	11,716636		
		101	36,0882	0,57341	15,380601		
		102	47,3624	0,43174	21,208788		
		110	56,3449	0,38288	24,844832		
		103	62,6879	0,49395	19,877636		
		112	67,7214	0,438	23,055656		

Concentração do sal precursor - $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ - 0,16 M							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,6891	0,35444	24,593233	20,4	3,4
		0002	34,349	0,3389	25,898513		
		101	36,1701	0,40245	21,91936		
		102	47,4443	0,49112	18,650341		
		110	56,4882	0,48523	19,617444		
		103	62,7698	0,56123	17,502337		
		112	67,8442	0,57232	17,657341		

Concentração do sal precursor - $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ - 0,32 M							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,8118	0,37997	22,947813	23,6	2,6
		0002	34,4718	0,31067	28,261239		
		101	36,3133	0,3777	23,365249		
		102	47,567	0,46475	19,717854		
		110	56,6109	0,42313	22,509527		
		103	62,913	0,41081	23,92916		
		112	67,9669	0,41106	24,602096		

Concentração do sal precursor - $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ - 0,48 M							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,7505	0,31727	27,478654	27,0	1,1
		0002	34,4104	0,30515	28,767692		
		101	36,2519	0,31886	27,672036		
		102	47,5056	0,36147	25,345701		
		110	56,5495	0,35733	26,646825		
		103	62,7698	0,3806	25,808819		
		112	67,8851	0,37842	26,711263		
		201	69,0309	0,37278	27,300482		

Síntese 7 – Estudo da variação do tempo de síntese

Tempo de síntese - 1 h							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,6891	0,38188	22,826086	19,5	3,0
		0002	34,3286	0,3638	24,124583		
		101	36,1496	0,40388	21,840475		
		102	47,4238	0,52365	17,490376		
		110	56,4472	0,48763	19,517141		
		103	62,7084	0,56456	17,393418		
		112	67,8237	0,60283	16,761664		
		201	68,99	0,6284	16,191243		

Tempo de síntese - 6 h							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,7709	0,41179	21,172428	18,3	2,9
		0002	34,4309	0,39503	22,223496		
		101	36,2724	0,43263	20,396233		
		102	47,5056	0,57719	15,872954		
		110	56,5086	0,50686	18,782076		
		103	62,8107	0,57158	17,189154		
		112	67,8646	0,59668	16,938492		
		201	69,0105	0,74427	13,672227		

Tempo de síntese - 12 h							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,6481	0,35792	24,351646	20,8	3,1
		0002	34,2877	0,34167	25,684305		
		101	36,1292	0,39125	22,544202		
		102	47,3829	0,49495	18,501668		
		110	56,4063	0,4487	21,206422		
		103	62,7084	0,55113	17,817263		
		112	67,7419	0,54095	18,670098		
		201	68,8877	0,5807	17,510493		

Tempo de síntese - 24 h							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,6277	0,34727	25,097191	21,9	3,6
		0002	34,2877	0,32619	26,903205		
		101	36,1292	0,36475	24,182094		
		102	47,3829	0,48289	18,96374		
		110	56,4268	0,45518	20,90653		
		103	62,647	0,51338	19,121167		
		112	67,7623	0,54759	18,445912		
		201	68,8877	0,60028	16,939334		

Tempo de síntese - 72 h							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,6686	0,37485	23,25299	21,0	2,6
		0002	34,3286	0,35597	24,655233		
		101	36,1496	0,38819	22,723231		
		102	47,4033	0,49605	18,462083		
		110	56,4677	0,46276	20,568022		
		103	62,7493	0,53003	18,530583		
		112	67,7623	0,54667	18,476955		
		201	68,9082	0,55985	18,16485		

Síntese 8 – Estudo da variação do tipo de matéria orgânica

Caldo de síntese da bactéria <i>B. megaterium</i> RF1C com 12 h de cultivo							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,72	0,29751	29,301513	25,4	3,6
		0002	34,38	0,29441	29,814682		
		101	36,2	0,29876	29,529383		
		102	47,48	0,39228	23,352733		
		110	56,52	0,3774	25,226264		
		103	62,76	0,42876	22,908676		
		112	67,84	0,44857	22,528034		
		201	68,96	0,49187	20,681781		

Caldo de síntese da bactéria <i>B. amiloliquefaciens</i> RFD1C com 24 h de cultivo							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2 θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,72	0,33278	26,195964	21,9	2,3
		0002	34,34	0,41642	21,076781		
		101	36,2	0,37293	23,656446		
		102	47,48	0,43165	21,222773		
		110	56,48	0,40441	23,53702		
		103	62,74	0,49955	19,660252		
		112	67,8	0,4944	20,43493		
		201	68,92	0,51535	19,734763		

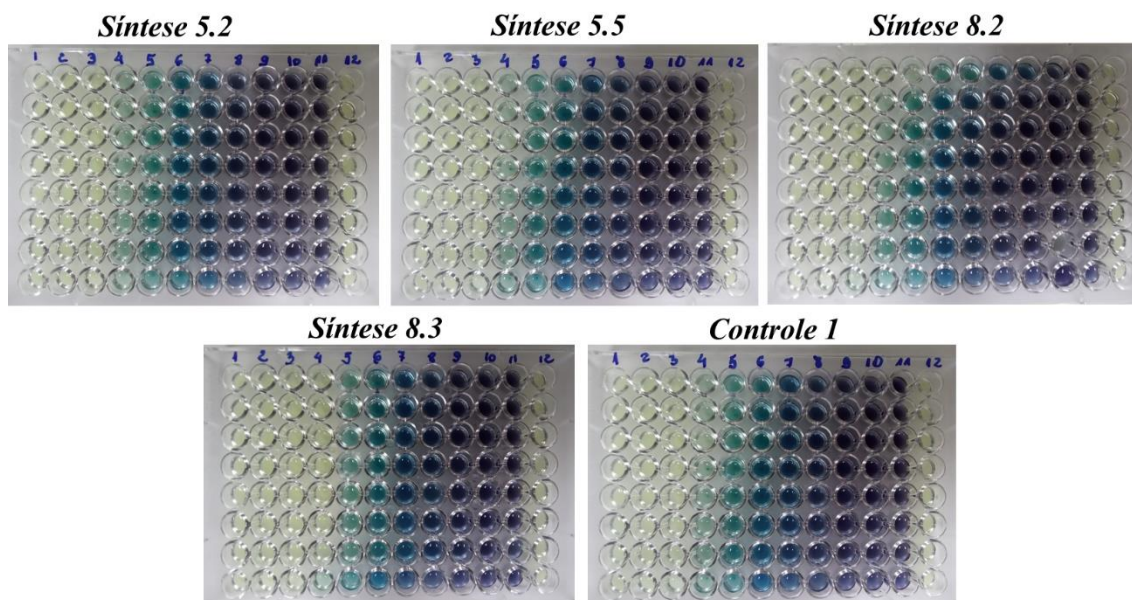
Biossurfactante - Ramnolípido							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,74	0,37734	23,103634	20,3	2,3
		0002	34,38	0,25325	34,660377		
		101	36,24	0,37308	23,649634		
		102	47,52	0,5341	17,154498		
		110	56,54	0,44962	21,176294		
		103	62,84	0,49176	19,98233		
		112	67,9	0,52096	19,404486		
		201	69,02	0,56632	17,96936		

1,3-Diaminopropano							
Parâmetros			Cálculos				
K	λ	hkl	Posição do pico 2θ (°)	FWHM β (°)	D (nm)	D médio (nm)	D padrão (nm)
0,95	0,15406	100	31,6816	0,28936	30,123941	28,3	3,0
		0002	34,3416	0,2569	34,164387		
		101	36,1626	0,30517	28,906045		
		102	47,4368	0,32623	28,07618		
		110	56,5216	0,38763	24,560698		
		103	62,7214	0,37841	25,9515		
		112	67,8163	0,38348	26,348167		
		201	69,003	0,38254	26,599494		

APÊNDICE B – Placas dos testes antimicrobianos com as NPs-ZnO

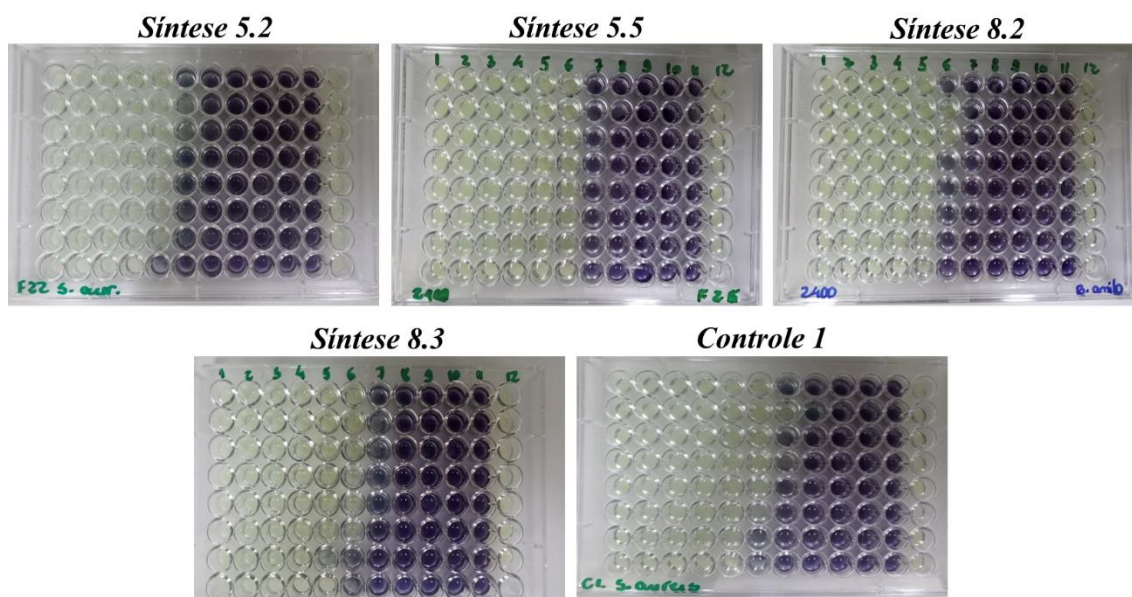
Teste antimicrobiano – foto das placas com os 96 poços de cada uma das análises.

- *E. coli* - ATCC25922



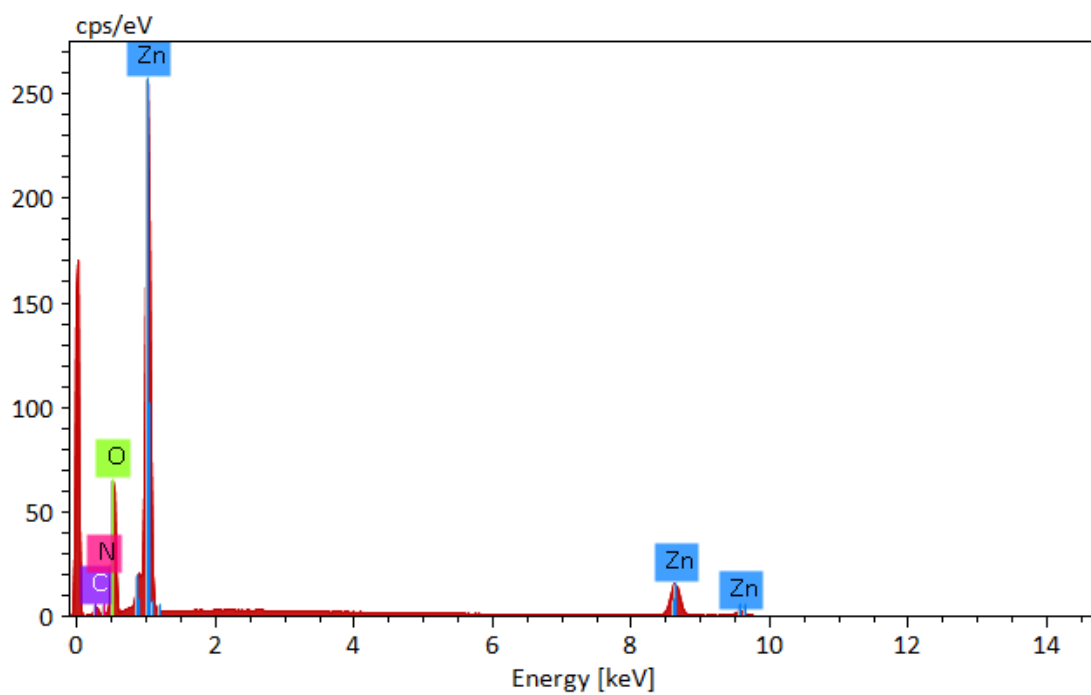
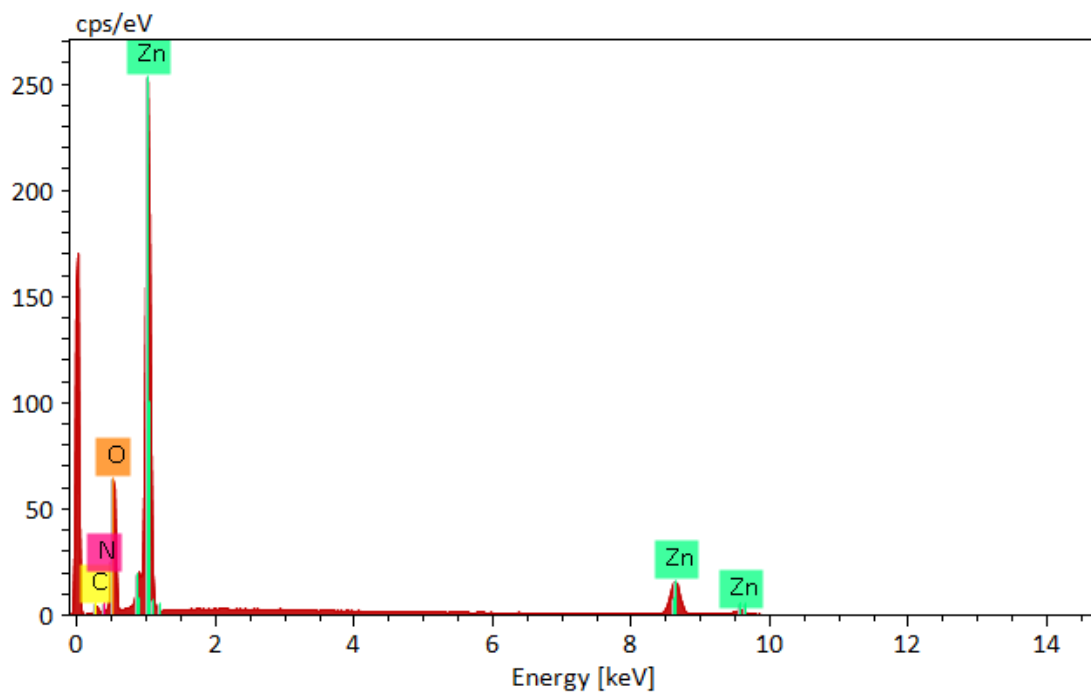
Fonte: Autoria própria.

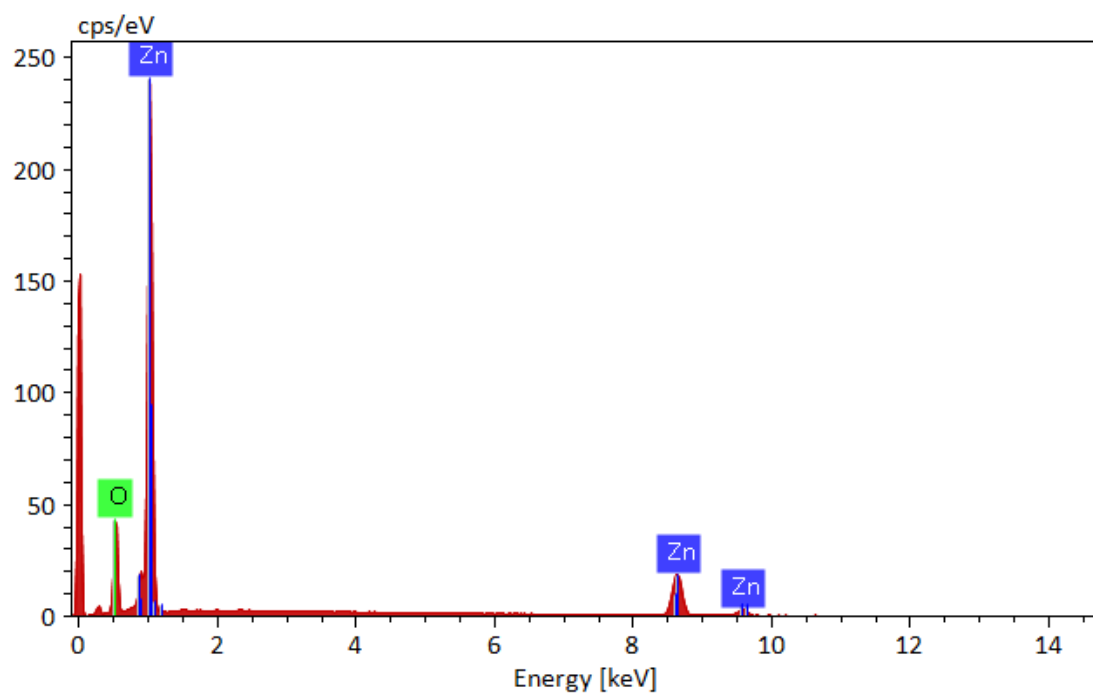
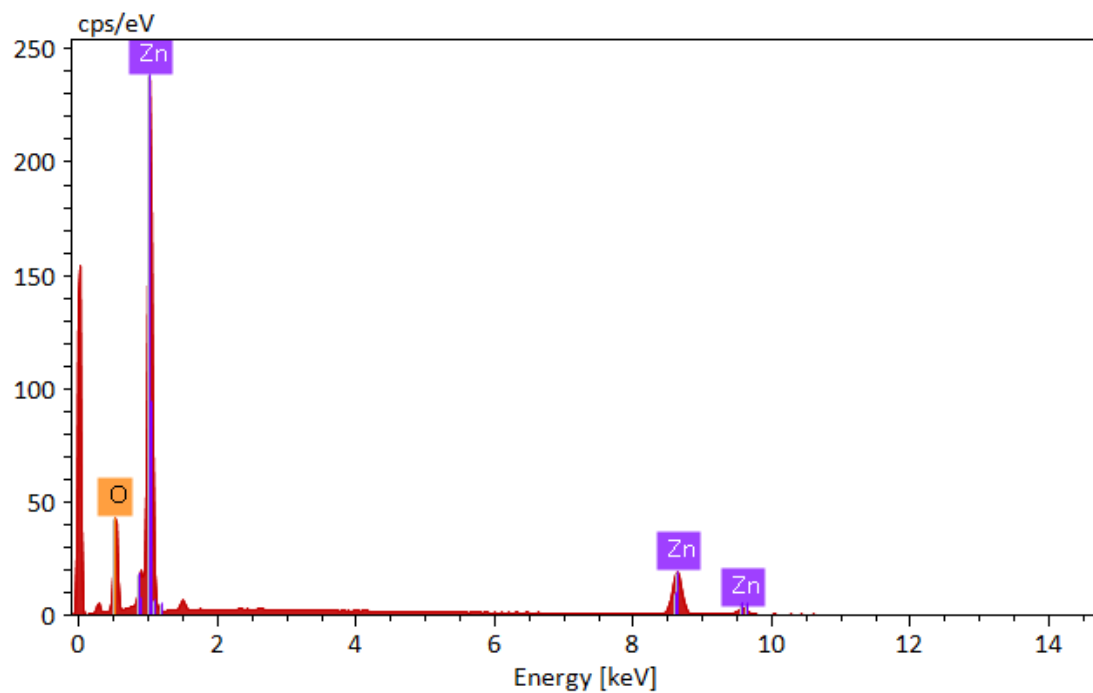
- *S. aureus* - ATCC25923



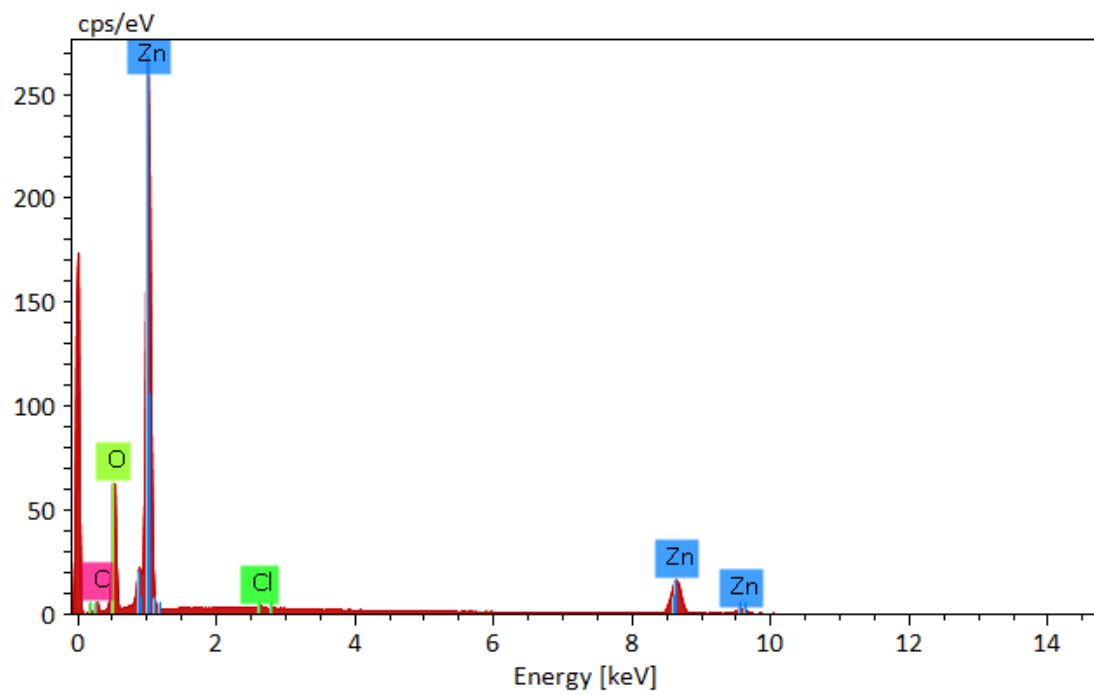
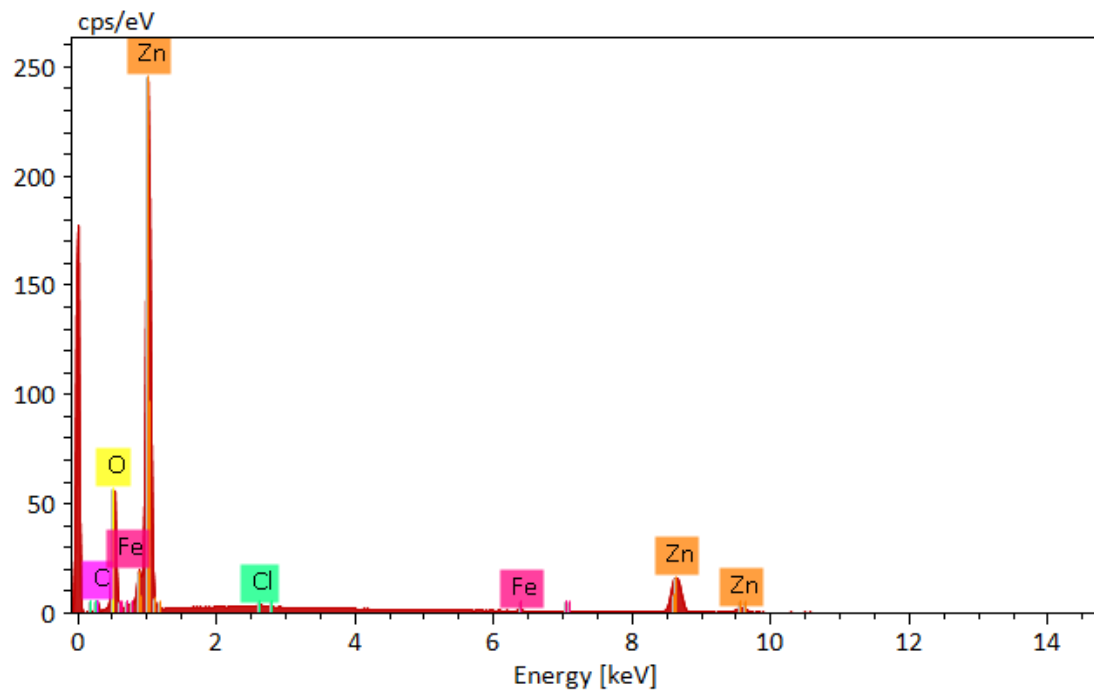
Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE C – EDS do Controle 1



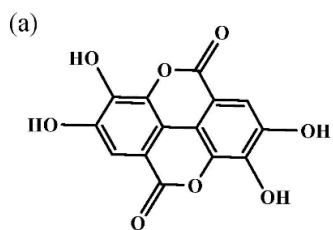
APÊNDICE D – EDS do resíduo de TG da *Síntese 5.2*

APÊNDICE E – EDS da Síntese 5.2

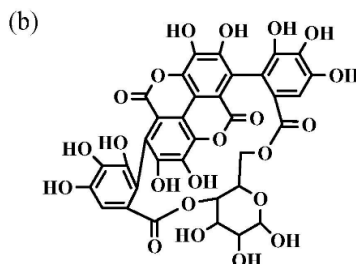


ANEXO A - Fitoquímicos ativos de extratos de plantas

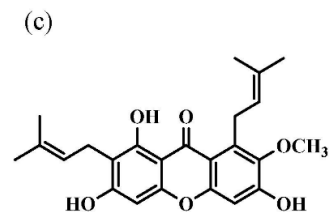
Phenolics



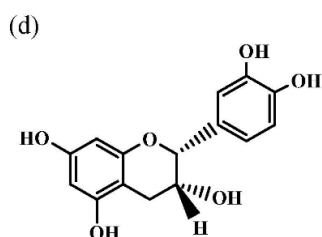
Ellagic acid (thyme, rambutan)



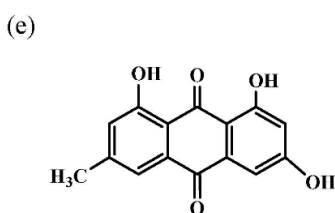
Punicalin (pomegranate)



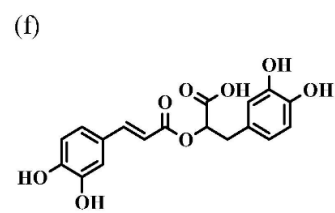
Mangostin (mangosteen)



Epicatechin (green tea)

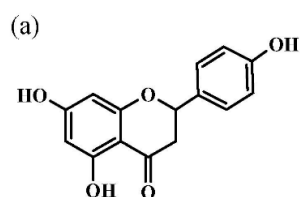


Emodin (Aloe vera)

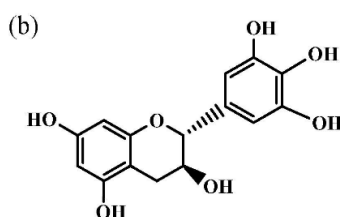


Rosmarinic acid
(rosemary, basil)

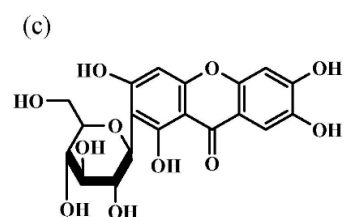
Flavonoids



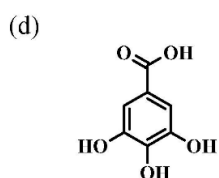
Apigenin (moringa oleifera,
Aloe vera, rambutan)



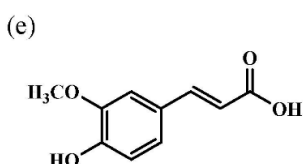
Gallicocatechol (green tea)



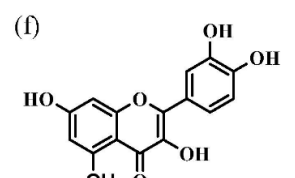
Mangiferin (mango)



Gallic acid (desert dill)

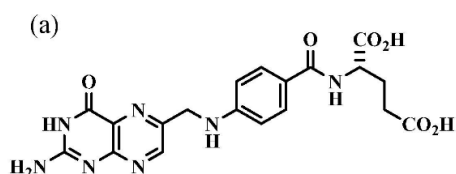


Ferulic acid (desert dill)

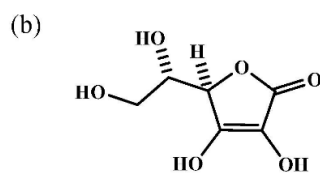


Quercetin (desert dill)

Vitamins

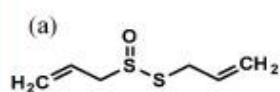


Folic acid (cowplant)

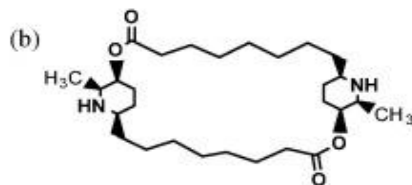


Ascorbic acid (broccoli)

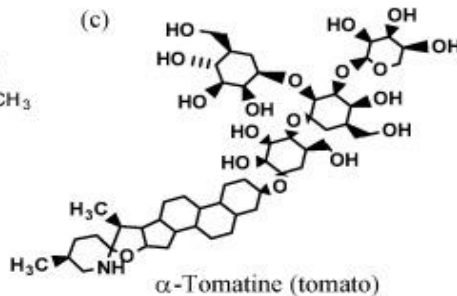
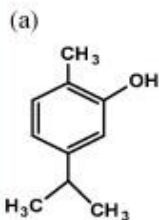
Fonte: WELDEGEBRIEAL, 2020

Alkaloids

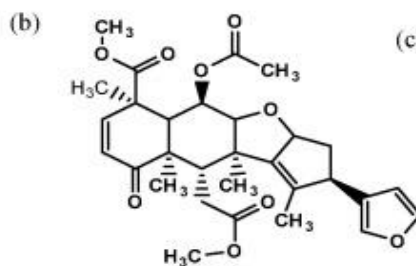
Allicin (garlic)



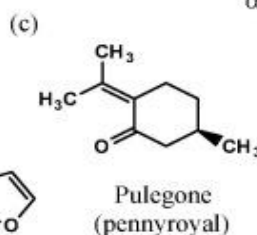
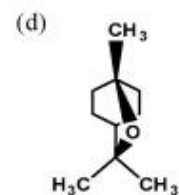
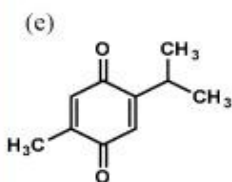
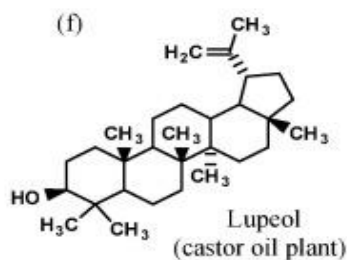
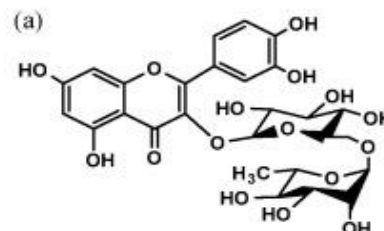
Carpaine (papaya)

 α -Tomatine (tomato)**Terpenoids**

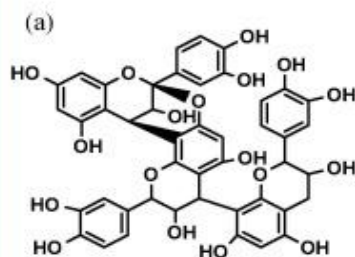
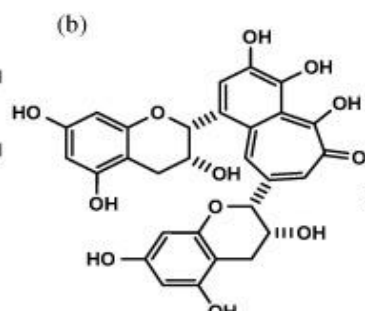
Carvacrol (thyme)



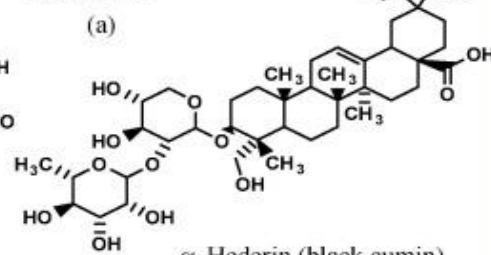
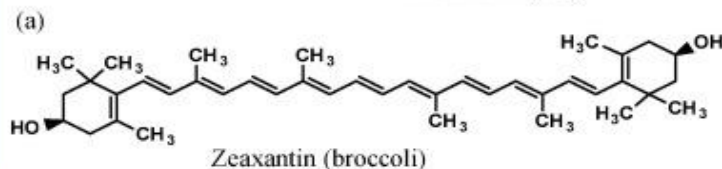
Nimbin (neem)

Pulegone
(pennyroyal)Eucalyptol
(eucalyptus leaves)Isoquinone
(black cumin)Lupeol
(castor oil plant)**Glycosides**

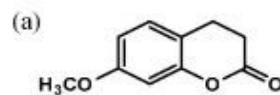
Rutin (desert dill)

TanninsCinnamontannin B1
(Laurus Nobilis)

Theaflavin (tea)


Saponins α -Hederin (black cumin)**Carotenoids**

Zeaxantin (broccoli)

Steroids

Herniarin (buxton's blue)

ANEXO B – Laudo de análise CBO

cbo		LABORATÓRIO CBO		IMP 110 v.2	13/09/2022 9:38:34
ANÁLISES LABORATORIAIS		C.B.O. Análises Laboratoriais Ltda. CNPJ 04.337.115/0001-49 Avenida Arquiberto Clayton Alves Combi, 327 - Vale Verde Valinhos - SP - CEP 13279-071 www.labcbo.com - (19) 3790-1500			Pág 1 de 2
		RELATÓRIO DE ENSAIO		022.044.547/00 versão 1	
					
Dados do cliente					
Nome	CNPJ ou CPF	Endereço			
ANDRÉ LUIZ MELEIRO PORTO	00.018.099/8598-83	Av. JOÃO DAGNONE, 1100 -LOT. HABIT. SANTA ANGELINA			
	Cidade	Estado	CEP		
	SÃO CARLOS	SP	13563-120		
Contatos					
Nome	E-mail	Telefone			
André Luiz Meleiro Porto	brizia@uap.br	(31)992964043			
Origem da Amostra					
Nome	Cidade	Estado			
ANDRÉ LUIZ MELEIRO PORTO	SÃO CARLOS	SP			
Contatos					
Nome	E-mail	Telefone			
André Luiz Meleiro Porto	brizia@uap.br	(31)992964043			
Dados da amostra fornecidos pelo cliente					
Nome material					Data envio
CALDO DE CULTIVO 850703					08/07/2022
Observações					
Processo CNPq nº 303355/2021-2					
Dados da amostra no recebimento					
Data Recebimento	Data Início				
08/07/2022	11/07/2022				
Ensaio	Unidade	Matéria Original	Matéria Seca	Data Ensaio	Código
Matéria Seca	%	0,81		13/09/2022	
Proteína Bruta	%	32,30	36,01	13/09/2022	MA-001 R4
Extrato Etéreo	%	0,85	0,95	13/09/2022	MA-008 R6
Amido	%	<0,01 (LQ)		05/08/2022	MA-014 R0
Índice dos Carboidratos Livres	%	0,11	0,12	13/09/2022	MA-014 R0
Glicose Livre	%	<0,01 (LQ)	-	05/08/2022	MA-014 R0
Glicose Livre	%	<0,01	<0,01	13/09/2022	MA-014 R0
Frutose Livre	%	<0,01 (LQ)	-	05/08/2022	MA-014 R0
Lactose	%	0,11	0,12	13/09/2022	MA-014 R0
Lactose	%	<0,01 (LQ)	-	05/08/2022	MA-014 R0
Lactose Livre	%	<0,01 (LQ)	-	05/08/2022	MA-014 R0
Galactose	%	<0,01 (LQ)	-	05/08/2022	MA-014 R0

Código	Referência
MA-001 R4	Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2017, método 45.
MA-003 R3	Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal, 2017. Métodos Analíticos. Método n.53. p.247-248.
MA-014 R0	Thompson, J.C. Methods for the Determination of Carbohydrates by Ion Chromatography, Proceedings of the 1990 Sugar Processing Research Conference, Sugar Processing Research Inc., San Francisco, California, USA, May 29-June 1, 1990, 381-396.
MA-009 R0	American Oil Chemists' Society, 2017. AOCS. Oficial Procedure. Rapid Determination of Oil/Fat Utilizing High Temperature Solvent Extraction. Am S-04. p. 1-4.; ANKOM Technology Method 12-12-05.; Compêndio Brasileiro de Nutrição Animal, 2017. Guia de Métodos Analíticos. Método n. 12 p.75-77.

Dados adicionais

Este relatório de ensaio refere-se somente à amostra recebida e só pode ser reproduzido por completo. Os campos em branco não foram informados pelo cliente. R=Repetição. LO= Limite de Quantificação. A amostragem é de responsabilidade do cliente.

Realização dos ensaios

Ensaios realizados nas instalações do laboratório CBO.

Responsável Técnico

Enedina Vieira - CRQ IV 04219427

Liberatio

Relatório de ensaio finalizado e assinado eletronicamente por Viviane Torres em 13-setembro-2022.

Impressão

Relatório de ensaio impresso por Enedina S. Altomani em 13-setembro-2022 9:38:34


LABORATÓRIO CBO

C.B.O. Análises Laboratoriais Ltda.
 CNPJ 04.337.111/0001-48
 Avenida Arguleto Clayton Alves Costa, 327 - Vale Verde
 Valinhos - SP - CEP 13279-071
 www.labcbo.com - (19) 3790-1500

IMP 110 v.2

 13/09/2022 9:38:34
 Pág.2 de 2

RELATÓRIO DE ENSAIO 022.044.547/00 versão 1