



Universidade Federal do ABC



Curso de Pós-Graduação em Nanociência e Materiais Avançados

Dissertação de Mestrado

FERNANDA DE JESUS GONÇALVES

**ESTUDO DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE ZINCO SINTETIZADAS EM
CONDIÇÕES HIDROTERMAIS: AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**

SANTO ANDRÉ

2015



Universidade Federal do ABC



Curso de Pós-Graduação em Nanociência e Materiais Avançados

Dissertação de Mestrado

FERNANDA DE JESUS GONÇALVES

**ESTUDO DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE ZINCO SINTETIZADAS EM
CONDIÇÕES HIDROTERMAIS: AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**

TRABALHO APRESENTADO COMO REQUISITOS
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM NANOCIÊNCIAS E MATERIAIS
AVANÇADOS, SOB ORIENTAÇÃO PROFESSOR
DOUTOR FLAVIO LEANDRO DE SOUZA.

SANTO ANDRÉ

2015

Este exemplar foi revisado e alterado em relação á versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

Santo André, 02 de Fevereiro de 2015.

Assinatura do autor: _____

Assinatura do orientador:_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Antonio e Evanir, e ao meu marido, Sandro, por toda compreensão, carinho, incentivo e auxílio à minha formação. Sou o que sou porque vocês existem.

AGRADECIMENTOS

Aproveito a oportunidade para agradecer a todos que, com seus conhecimentos, incentivos, compreensão e críticas colaboraram para que eu ultrapassasse mais uma etapa. Em especial agradeço:

A Deus, essa misteriosa fonte de vida e energia.

Aos meus pais, Antonio e Evanir, por tudo que de melhor eu pude receber e aprender com vocês. Todo amor e gratidão!

Ao meu marido, Sandro, pela sua compreensão e ajuda em todos os momentos.

A minha família, por todo companheirismo, apoio e infindáveis momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Flavio Leandro de Souza, base da minha formação científica. Obrigada pela orientação, confiança, profissionalismo, competência, paciência e tempo dedicado.

Aos professores e funcionários da UFABC, obrigada pelos conhecimentos transmitidos.

Aos companheiros de laboratório. Obrigada por tornarem meus dias mais agradáveis e pela rica troca de experiências.

Aos professores presentes nesta banca, que farão orientações para a melhora do meu trabalho. Obrigada pela disposição de vocês.

Obrigada a todos!

RESUMO

Nanopartículas de óxido de zinco têm sido por décadas aplicadas em diversos produtos industriais e mais recentemente vem recebendo enorme atenção por suas implicações nos campos da medicina e biomedicina. Em particular nanoestruturas unidimensionais (1D) de óxido de zinco tem despertado interesse devido à alta área de superfície disponível receber grupos funcionais tornando o material compatível, eficiente para terapias fotodinâmicas e como agente cancerígeno. Nessa dissertação de mestrado o foco dos estudos foi direcionado a investigar a citotoxicidade das nanoestruturas de óxido zinco preparado a partir de uma solução aquosa em condições hidrotermais. As NPs de óxido de zinco foram sintetizadas em diferentes tempos (30 minutos, 2 e 4 horas) com intuito de avaliar o efeito de diferentes tamanhos na toxicidade. Pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi possível acompanhar a evolução morfológica e a formação de bastões (1D) organizados na forma de flores. Pelas imagens de MEV foi observado que o tamanho e a morfologia variam de acordo com o tempo de síntese. A fase pura hexagonal (wurtzita) do ZnO foi indexada nos difratogramas obtidos. Analisando os espectros de absorção na região do ultravioleta/visível e foram estimados os valores de *band gap* ótico de cada nanoestrutura. As características óticas ainda foram monitoradas por espectroscopia de fluorescência e para todas as NPs de ZnO estudadas foram observadas a presença de banda na região do visível, normalmente relacionada a presença de defeitos estruturais e morfológicos durante a preparação das NPs de ZnO. O potencial zeta e tamanho da partícula dispersas em meio aquoso (pH ~7.0) foram investigados e o ilustrando que a técnica utilizada para separação e dispersão foram eficientes proporcionando um comportamento monomodal.. O estudo de citotoxicidade das NPs de ZnO sintetizadas foi realizado pela técnica de citometria de fluxo, em que foi verificada a morte celular por necrose e apoptose. Os resultados mostraram propriedade nociva das NPs em relação às células tumorais HeLa e não tumorais L929. Esses estudos preliminares apontam essas NPs de ZnO excelente candidatas para futuras aplicações na área médica como agentes cancerígenos.

Palavras-chave: óxido de zinco, nanoestruturas, síntese química e *toxicidade*.

ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles have been applied for decades in many industrial products and more recently have received enormous attention for their implications in the fields of medicine and biomedicine. In particular one-dimensional (1D) zinc oxide nanostructures have attracted attention due to the high surface area available to receive functional groups making compatible, efficient material for photodynamic therapy and as carcinogenic agents. In this dissertation the focus was directed to investigate the cytotoxicity of zinc oxide nanostructures prepared from an aqueous solution under hydrothermal conditions. Zinc oxide NPs were synthesized at various times (30min., 2 and 4 hours) in order to evaluate the effect of different sizes in toxicity. By the scanning electron microscopy (SEM) technique, it was possible to follow the morphological evolution and the formation of rods (1D) organized in flowers. From SEM images, it was observed that the size and morphology varied with the time of synthesis. The pure hexagonal (wurtzite) ZnO phase was indexed in the diffractograms obtained by X-Ray Diffraction analysis. The absorption spectra in the ultraviolet / visible region and the values of optical band gap were estimated for each nanostructure. The optical characteristics were also monitored by fluorescence spectroscopy and all ZnO NP studied presented band in the visible region, usually related to the presence of structural and morphological defects during the preparation of the NPs of ZnO. The zeta potential and particle size dispersed in water (pH ~ 7,0) have been investigated and illustrated that the technique used for separation was efficient, providing a monomodal behavior. The cytotoxicity study of the synthesized ZnO NPs was carried out via flow cytometry in which cell death was observed by necrosis and apoptosis. The results showed NPs harmful property with respect to non-tumor HeLa cells and healthy L929 cells. These preliminary studies indicate these ZnO NPs are excellent candidates for future applications in the medical field as carcinogens.

Keywords: zinc oxide, nanostructures, chemical synthesis and toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As esferas em branco representam os átomos de zinco, e na cor preta são os átomos de oxigênio. a) wurtzita hexagonal ⁸ e b) blenda de zinco ⁹	14
Figura 2. Esquema da rota sintética utilizada para se obter as nanoestruturas de óxido de zinco (ZnO).	23
Figura 3. Difratrograma de raios X obtido para as amostras apresentadas na Tabela 1. Os picos foram indexados com base no padrão cristalográfico referente a fase hexagonal wurtzita do ZnO.	27
Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das NPs de ZnO sintetizadas em condições hidrotermais em diferentes tempos. (a) 30 min, (b) 2 horas e (c) 4 horas.	30
Figura 5. Os espectros de UV-Vis de ZnO - 1 (30 minutos), ZnO - 2 (2h) e ZnO - 3 (4 horas) de nanoestruturas na função de diferentes tempos de reação.	31
Figura 6. Espectros de Fotoluminescência das nanoestruturas. ZnO - 1 (30 minutos), ZnO - 2 (2h) e ZnO - 3 (4 horas) obtidas em diferentes tempos de reação. 1 - Comprimento de onda ~ 350 nm. 2 - A presença de dois pico de emissão no UV de 380 - 390 nm e 3 - Componentes principais na região do visível entre 520-620 nm como apresentado na Figura 6.	34

Figura 7. Distribuição do tamanho de partícula em suspensão aquosa de acordo com o tempo de síntese a) 30 minutos, b) 2 horas e c) 4 horas. 36

Figura 8. Potencial Zeta em suspensão aquosa, a) síntese 30 minutos b) síntese 2 horas c) síntese 4 horas..... 38

Figura 9. Histograma do efeito das ZnONps em células HeLa (carcinoma cervical) sobre a porcentagem de (a) apoptose, e (b) necrose. Esses ensaios foram detectados com uso do corante positivo Annexin V-FITC / negativo PI. Os dados estão apresentados pela média de dos ensaios realizados em triplicata com seus respectivos valores de desvio padrão estimados (SD). *Estatisticamente diferente do grupo utilizado como controle negativo (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, $p < 0.05$). 41

Figura 10. Histograma do efeito das ZnONps em células L929 sobre a porcentagem de (a) apoptose, e (b) necrose. Esses ensaios foram detectados com uso do corante positivo Annexin V-FITC / negativo PI. Os dados estão apresentados pela média de dos ensaios realizados em triplicata com seus respectivos valores de desvio padrão estimados (SD). *Estatisticamente diferente do grupo utilizado como controle negativo (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, $p < 0.05$)..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Código das amostras sintetizadas e seus respectivos tempos e tratamento de síntese.....	22
Tabela 2. Produtos utilizados durante os procedimentos experimentais.	25
Tabela 3. Equipamentos utilizados para fabricação e caracterização das amostras. ...	25
Tabela 4. Parâmetros estruturais calculados para os três tempo de síntese a partir dos picos obtidos na análise de difração de raios X.	29
Tabela 5. Avaliação tamanho das partículas.....	35
Tabela 6. Avaliação potencial zeta (ζ).....	37
Tabela 7. pH das amostras analisadas.	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CEM: Central Experimental Multiusuários

LEAN: Laboratório de Energias Alternativas e Nanomateriais

PBM: *Purpose Built Material*

NPs: Nanopartículas

ZnO: Óxido de zinco

LEDs: diodos emissores de luz

MEV: Microscopia eletrônica de varredura.

UV-VIS: Espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível

PL: Espectroscopia fluorescência

DRX: Difração de raios X.

d : espaçamento entre os planos cristalinos adjacentes.

Θ : ângulo de espalhamento (conhecido como ângulo de Bragg).

n : ordem de reflexão, que pode ser qualquer número inteiro.

λ : comprimento de onda.

d_{hkl} : distância entre os planos cristalográficos (hkl).

(h,k,l): índices de Miller.

a, b, c, α, β e γ : parâmetros de rede.

PI: Iodeto de Propídio

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

HeLa: Células epiteliais carcinoma cervical humano

L929: Fibroblastos de adipócitos de camundongo

DMEM: Eagle modificado por Dulbecco

SBF: soro bovino fetal

PBS: tampão fosfato salino

ANOVA: análise de variância

pH: Potencial Hidrogeniônico

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vii
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Óxido de zinco	13
2.2. Citotoxicidade de nanoestruturas oxido de zinco.....	15
2.3. Meio de Cultura	16
2.4. Estudos conduzidos com ZnO.....	18
3. OBJETIVOS	21
3.1 Geral	21
4. Metodologia Experimental	22
4.1 Síntese das nanoestruturas de ZnO	22
5. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
6.1 Análises Estruturais.....	26
6.2 Análises Morfológica	29
6.3 Análise Óptica	31
6.4. Análise Tamanho de Partícula e Potencial Zeta	35
6.4.1 Análise Tamanho	35

6.4.2 Potencial Zeta (ζ)	37
6.5 Cultura e tratamento celular	39
6.5.1 A apoptose e necrose	40
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

A nanociência e a nanotecnologia são campos muito amplos e interdisciplinares que buscam compreender os materiais no domínio de partículas e interfaces com dimensões da ordem de 1 a 100 nm. Isso ocorre de tal forma que o interesse, a criação, a exploração, o desenvolvimento, o aproveitamento e o desejo de compreender e controlar o mecanismo que rege a organização e as propriedades destes materiais promoveu o envolvimento de diversas áreas do conhecimento. Tal como, física, química, biofísica, bioquímica, ciência dos materiais, ciência da computação, medicina, entre outras.¹

Nesse trabalho foi estudado nanopartícula (NP) de óxido de zinco. De um modo geral NP desse óxido despertam bastante interesse devido a grande possibilidade de aplicação como componentes em diversos produtos industriais, tais como, os pigmentos na indústria da construção, corantes inorgânicos, dispositivos eletrônicos, ópticos e aplicações médicas. Nos últimos anos a NP de óxido de zinco tem recebido uma enorme atenção devido à descoberta de seu potencial na terapia do câncer, devido suas propriedades de biocompatibilidade e potencial de citotoxicidade. No entanto, o uso intenso de produtos que contenham essa NPs, na área médica e agrícola levantou uma preocupação sobre os possíveis efeitos tóxicos.^{2,3}

Para a produção dessas NPs foi utilizado conhecimentos de química coloidal relacionando-o a estrutura cristalina natural de semicondutor criando assim possibilidades de crescimento de nanopartícula em determinadas direções cristalográficas, apenas controlando as energias de interface e os fenômenos de adsorção e dessorção de espécies em solução na superfície do germe de nucleação. Tal enfoque auxiliou na compreensão e desenvolvimento de métodos precisos de síntese, conhecido como “bottom-up”, dessa partícula.^{4,5}

As NPs de ZnO foram amplamente aplicada a diversos produtos em que é necessária a transparência ou a grande reatividade. Por outro lado, a elevada reatividade das NPs de ZnO dão origem a um aumento das respostas biológicas tais como a absorção celular e eficiência de entrega. Recentemente nosso grupo desenvolveu uma rota química versátil para produção concomitante de NPs e substratos recobertos com camadas (eletrodos) de nanoestruturas ZnO. Ainda nesses trabalhos foram investigadas as características fundamentais e proposto o mecanismo de formação e crescimento das NPs organizadas em flores com base em resultados experimentais e teóricos (simulações teóricas realizadas utilizando cálculos *ab initio* com base na teoria de densidade funcional)⁹. O conjunto de resultados obtidos nos trabalhos a partir de diversas técnicas apontaram algumas características que tornam esse material potencial candidato para aplicação em: células solares, fotodetectores, sensores de gás, entre outros^{7, 8}. As principais características observadas nas NPs de ZnO, nos trabalhos mencionados, foram: a presença de *band gap* indireto (relacionado com a presença de defeitos morfológicos e estruturais) e alta área superficial devido a organizados das NPs na forma de flores.

Essas duas características aliadas proporcionam ampla absorção de luz (ultravioleta - visível) e a forma de bastões (estruturas unidimensionais – 1D) organizadas em flores apresenta alta área de superfície que favorece reações de interface e aplicações como sensores. Mais recentemente, devido essas e outras características mencionadas acima, NPs de ZnO de outros elementos químicos tem sido exaustivamente investigadas e aplicadas na área da saúde (em protetores solares, como agente de prevenção de câncer, entre outros) e agrícola (fertilizantes). O crescente uso das NPs em áreas que envolvem riscos a saúde dos seres vivos despertou nos últimos anos diferentes preocupações e a necessidade de uma nova área de pesquisa que envolve métodos e estratégias para avaliar os níveis de toxicidade desses novos materiais.

Como mencionado acima o nosso grupo tem ao longo dos anos desenvolvido estratégias para produzir NPs de diferentes elementos para aplicações em dispositivos que convertem luz solar em energia limpa, mas também esses materiais tem atraído atenção para novas aplicações. Assim, esse trabalho teve como motivação o estudo da toxicidade das NPs de ZnO e seu potencial para aplicações na área da medicina. A motivação extra para esse trabalho foi à participação do grupo na Rede Nacional financiada pela CAPES cujo tema envolve Nanociência e Medicina, NANOBIOMED. Este trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (LNN) coordenado pelo Prof. Valtencir Zucolotto. O LNN tem como foco investigar a aplicação da Nanotecnologia em Medicina, áreas biomédicas e veterinárias.

Os trabalhos foram conduzidos de forma a avaliar a influência das NPs em sistema biológicos conhecidos e analisados pela técnica de citometria de fluxo. A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para investigar a toxicidade das NPs, ou seja, essa técnica promove a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência.⁶ Nas próximas seções serão apresentados brevemente alguns conceitos fundamentais sobre as NPs e estudos de toxicidade. Na sequência serão apresentados os objetivos do trabalho, metodologia utilizada para obtenção das NPs de ZnO, descrições das técnicas de caracterização, resultados obtidos e discussões, as conclusões a partir do presente estudo e algumas sugestões para trabalhos futuros envolvendo as duas área Nanotecnologia e Medicina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Óxido de zinco

O óxido de zinco é um composto inorgânico cuja fórmula química é ZnO. Esse composto é muito utilizado como aditivo em vários materiais e produtos comerciais, incluindo plásticos, cerâmica, vidro, cimento, borracha (pneus de carro), lubrificantes, tintas, pomadas, adesivos, selantes, pigmentos, alimentos (fonte de nutrientes Zn), baterias, fitas de primeiros socorros, entre outros.⁷

O ZnO está presente na crosta terrestre como o mineral “zincite”, no entanto, a maior parte do ZnO utilizado comercialmente, é produzida sinteticamente. Na ciência dos materiais, o ZnO é um semicondutor de banda larga, do grupo II-VI isto é, o zinco e o oxigênio pertencem aos grupos II e VI da tabela periódica. ZnO é um semicondutor com alta mobilidade eletrônica, alta condutividade térmica, energia de banda *gap* relativamente amplo de aproximadamente 3,37 eV à temperatura ambiente e ampla energia de ligação de éxciton (60 meV). Essas características fazem do ZnO um material adequado para aplicação em diferentes tipos de dispositivos eletro-ópticos tais como , transistores, fotodetectores, diodos emissores de luz (LEDs) e diodos laser ⁷, além de transdutores piezoelétricos, varistores, sensores químicos e de gás, emissores de luz UV ¹, células solares sensibilizadas por corante ¹⁰, entre outros. O óxido de zinco pode assumir três diferentes tipos de arranjo cristalino: wurtzita hexagonal, blenda de zinco, e o sal de rocha, este último é raramente observado. ¹ A estrutura wurtzita é termodinamicamente estável em condições ambiente e, portanto, mais comum (Figura 1a). A estrutura do tipo blenda de zinco pode ser estabilizada (Figura 1b) quando sintetizadas em substratos e a estrutura sal de rocha (NaCl) pode ser obtida em pressões relativamente alta ~10 GPa e alta temperatura (em torno de 800°C). ^{1,7}

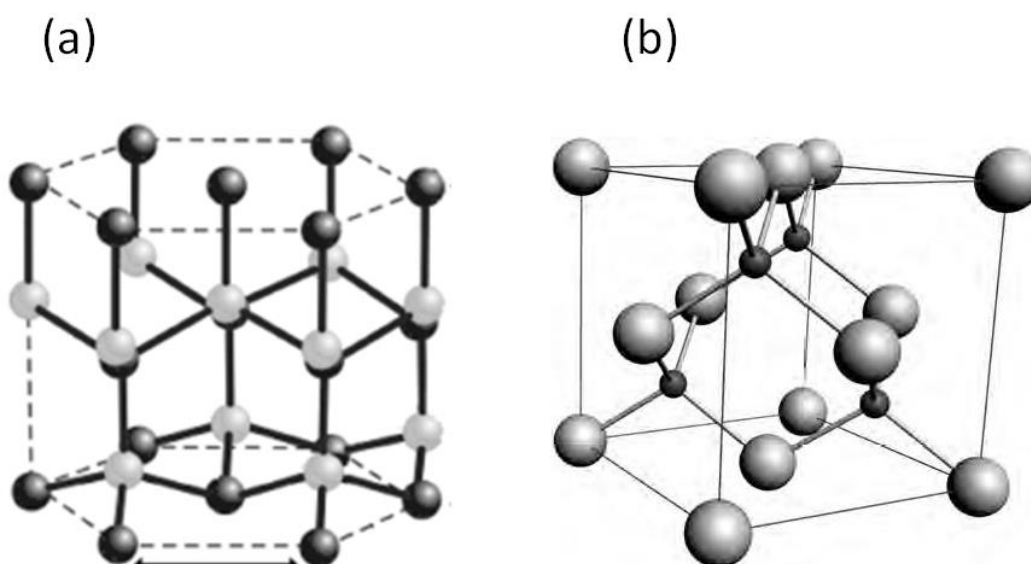


Figura 1. As esferas em branco representam os átomos de zinco, e na cor preta são os átomos de oxigênio. a) wurtzita hexagonal⁸ e b) blenda de zinco⁹.

As NPs o ZnO estão sendo cada vez mais utilizado em aplicações que envolvem a área médica, de cosméticos e odontológica.¹⁰ Mais especificamente esse interesse em NP de ZnO tem sido dirigido para biodetecção e imagens de células, terapia fotodinâmica e nanomedicina.¹¹ Apesar da aplicação ativa e desenfreada das NPs há muito pouco ou quase nenhuma informação sobre a toxicidade em níveis celulares e moleculares. Assim a necessidade de compreensão dos efeitos tóxicos e os reais benefícios que implicam o uso desses materiais fornece motivação extra para estudos nessa área. Na próxima sessão será apresentada uma breve discussão sobre uso e estudos acerca dos efeitos que causam a aplicação desse material na área da saúde.

2.2. Citotoxicidade de nanoestruturas óxido de zinco.

O uso desenfreado das NPs na área da saúde aliada ao marketing apelativo e constante sobre a potencialização dos efeitos benéficos causados pelo uso dessa nova tecnologia em remédios, cremes e terapias, mobilizou a comunidade científica a investigar de maneira detalhada os efeitos nocivos e benéficos desses materiais.¹²⁻¹⁴

Estudo recente mostrou que a NP de ZnO faz parte de um grupo separado dentro da família óxido de metal de transição, devido sua alta solubilidade.¹⁵ Esse é um dos cinco compostos de zinco que são atualmente listado como seguro e reconhecido pela US *Food and Drug Administration* (FDA). Além disso, o ZnO parece resistir fortemente a microorganismos.¹⁶ Um aspecto importante para a utilização de NPs de ZnO como agente antibacteriano é a exigência das partículas não serem tóxicos para as células humanas. Outra propriedade de potencial interesse médico e pouco desenvolvida continua a ser sua prioridade anticarcinogênico.¹⁷⁻¹⁸

A importância da produção de materiais nanométricos com função biológico é interessante, porque no momento poucas materiais, que pode arbitrariamente penetrar lacunas de tamanho nanométrico, tais como pele, membranas e vasos sanguíneos

A potencial aplicação de NPs de ZnO como agente antibacteriano cancerígena seria fornecer novas oportunidades para esse material na nanomedicina. Como estudado o ZnO no estado bulk apresenta propriedade que deve-se ao aumento da área de superfície das partículas finas podendo ser considerados como não irritantes, não alergênico, e não comedogênico.²²

A vantagem de utilizar esse óxido para aplicações biomédicas é que eles contêm o elemento zinco essenciais para os seres humanos. Além disso, esse material exibe uma forte atividade mesmo quando administrada em pequenas quantidades. As NPs de ZnO, podem ser caracterizado pelas propriedades fotocatalítico e foto oxidante contra espécies química e biológica.²³ Esta dissertação de mestrado envolveu o estudo das características do ZnO com diferentes tamanhos e com morfologia de bastões (organizados em flores) e uma avaliação preliminar de sua toxicidade.

2.3. Meio de Cultura

Os experimentos, análise e interpretação dos resultados de toxicidade das NPs de ZnO foram realizado em conjunto com a Dra. Iêda M. M. Paino, membro do laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (LNN – coordenado pelo Profº Dr. Valtencir Zucolotto, departamento de Física USP - São Carlos).

O estudo foi conduzido utilizando dois meios de cultura celular diferente, as células HeLa e fibroblastos L929 do camundongo murino. As células HeLa são conhecida como um tipo de célula imortal usada em pesquisas científicas, esta é a linha celular humana mais antiga e mais utilizada.⁴¹ A linhagem é derivada de uma célula cancerígena cervical coletada pela primeira vez de uma paciente vítima dessa doença, em 8 de fevereiro de 1951 cujo nome era Henrietta Lacks (por isso chamadas de células HeLa).⁴² Descobriu-se que a linhagem celular era extremamente durável e prolífica pela sua contaminação de muitas outras linhas celulares utilizadas na investigação.^{43,44}

O diâmetro médio dessa células (HeLa) é de 20 μm o que favorece a aplicação para nanopartículas ^{ref}. No caso dos fibroblastos L929 são considerados como referência para testes de citotoxicidade. Esse fibroblasto é um subclone da linhagem parental L que foi estabelecida por W. R. Earle no ano de 1940.⁴⁵ Foi uma das primeiras linhagens celulares a serem estabelecidas em cultura contínua. A linhagem L é derivada de o tecido aureolar subcutâneo e adiposo de um camundongo macho C3H/An de 100 dias e os fibroblastos são as células predominantemente encontradas em tecidos conectivos perdidos ou danificados e são importantes nos mecanismos de reparação tecidual e na fase de remodelamento dos tecidos.⁴⁶ Estas células são importantes na produção de muitos componentes essenciais do tecido conectivo, como os componentes de matriz extracelular no tecido fibroso do colágeno.^{47,48} A adesão dos fibroblastos ao biomaterial pode ajudar na integração do tecido conectivo, adicionando vascularização à superfície e diminuindo a chance de encapsulamento fibroso e infecção bacteriana.⁴⁹

Para isso, tornam-se necessários estudos do comportamento celular em biomateriais que podem colaborar para o desenvolvimento de técnicas de engenharia de tecidos mais efetivos, o favorecimento da utilização dessa célula também se dá pelo diâmetro médio das células (L929) 250 μm bem superior as partículas do estudos.⁵⁰ Deve-se levar em conta que modelos de cultura celular estão se tornando prevalentes na investigação de respostas de tecidos a materiais de implantes.⁵⁰ O uso de métodos *in vitro* pode reduzir a extensão de testes em animais e pode reduzir significativamente o tempo e o custo dos testes. Os ensaios foram embasados na Norma Técnica da International Organization for Standardization (ISO 10993). In vitro methods ISO 10993-5.⁵¹

2.4. Estudos conduzidos com ZnO.

O papel do zinco como um elemento essencial á vida foi descrito, pela primeira vez, em 1869, por Raulin, discípulo de Pasteur, que revelou o seu papel no crescimento do fungo, *Aspergillus Níger*.²⁵ No entanto, a sua importância no crescimento e desenvolvimento dos mamíferos foi apenas reconhecida na primeira metade do século XX, com identificação de síndromes relacionadas a sua carência em 1934. Em experimentação animal e mais tarde em 1961 em seres humanos.^{26,27} A deficiência de Zn afeta cerca de 25% da população do mundo e pode resultar em má absorção de alimentos, síndromes, doença hepática crônica, doença renal crônica, doença das células, diabetes, câncer e outras doenças crônicas.³¹ Quimicamente o íon zinco (Zn^{2+}) é um metal de transição forte, aceitador de elétrons, mas que ao contrário do ferro (Fe^{2+} , Fe^{3+}) e do cobre (Cu^+ , Cu^{2+}), tem o orbital 3d completamente preenchido e não sofre alterações no estado de oxidação. Desta forma, não participa das reações de redox. O Zn^{2+} é um íon estável que atua nos sistemas biológicos como ácido de Lewis, aceitando um par de elétrons e formando ligações covalentes dativas. O zinco parece ser fundamental para várias vias de sinalização metabólica e celulares, proteínas estruturantes^{28,29}, processos enzimáticos e fatores de transcrição, por isso tem chamado bastante atenção para pesquisa.²⁷

Porém o uso do ZnO em escala nanométrica tem sido considerado um "problema" importante com consequências de grande alcance e relativamente novos para a humanidade, além do fato de existirem poucas técnicas analíticas quantitativas para medição dessas nanopartículas em sistemas naturais.³²

Os óxidos de metais de transição em especial as NPs de ZnO são aplicados na fabricação de protetores solares, ou seja, bloqueantes de raios UVA e UVB. Naturalmente os pós-brancos, espessos e opacos (ZnO), são transformados em pastas brancas (creme) para espalhar sobre a pele, especialmente no nariz (uma prática comum entre os nadadores e salva vidas).

Para tornar esses óxidos mais transparentes à vista, os fabricantes tem optado pelo uso de partículas nanométricas que podem ser exibir propriedades cada vez mais transparentes. Essa prática permitiu o uso dessas NPs nas fórmulas dos protetores solares sem passarem por testes, porque foram consideradas seguras no seu estado natural.^{32,33}

No entanto, os cientistas estão a descobrir que o tamanho radicalmente reduzido origina comportamentos radicalmente diferentes desses óxidos. Cientistas da Universidade da Califórnia, Los Angeles, identificaram que as filhotes de ratinhos expostos a NPs de TiO_2 sofrem grandes supressões de DNA.³³ Uma consequência desse estudo é que as nanopartículas poderiam atravessar a placenta causando danos em bebês humanos expostos no útero devido a esses óxidos metálicos em tamanho nanométrico. Outros cientistas identificaram que as NPs de TiO_2 não só atravessam a membrana celular como também passam para o interior do núcleo da célula, onde danificam o DNA e perturbam a divisão celular normal.³⁴ Igualmente importante é o trabalho de outros pesquisadores que descobriram que essas nanopartículas são tão pequenas que atravessam a barreira hemato-encefálica de proteção e são capazes de matar os neurônios cerebrais.³⁵ Atualmente alguns cientistas afirmam que essas partículas em escala nanométrica foram libertadas para uso do consumidor sem serem realizados estudos para assegurar que os seres vivos não seriam prejudicados.³⁶

No caso particular das NPs de ZnO poucos estudos foram encontrados e ainda não podemos afirmar, mas resultados preliminares apontam que o uso dessas NPs podem não ser tão benéficos. Em 2010, estudos conduzidos com avaliação de seres vivo em águas do mar, mostraram que as nanopartículas de ZnO matam o plâncton,³⁷ enquanto outros estudos determinaram que as nanopartículas de ZnO e TiO_2 são extremamente tóxicas podendo prejudiciais à vida marinha.³⁸

Porém outros estudos tem se mostrado otimistas em relação a NPs de ZnO, alguns estudos têm relatado que Zn^{2+} liberado pelo ZnO conduzidos com nanofios demonstram que a citotoxicidade do ZnO induz nanocristais contra células cancerosas.¹⁷ Outro estudo demonstrou que a dissolução intracelular de NP de ZnO, com liberação de Zn biodisponível, é determinante da citotoxicidade para dessa NP.⁵⁶ A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular, fornece evidência de que fatores determinantes são necessários para citotoxicidade NP de ZnO em células imunitárias humanas. Apesar da dissolução das NPs de ZnO ocorrerem em algum nível extracelular, a concentração de Zn biodisponível das NPs de ZnO é insuficiente para induzir citotoxicidade, mesmo com elevada concentrações de NPs.⁵⁶

Estudo de toxicidade seletiva de NP de ZnO em relação as bactérias gram-positivas e células cancerosas por meio de apoptose induzida por peroxidação lipídica⁵⁷, observou que bactéria *S. Aureus* exibiu um efeito antibacteriano acentuado. No entanto comparado com as bactérias gram-negativas os ensaios exibiram efeito antibacterianos ainda mais acentuado, por isso ainda não se chegou a uma conclusão para estudos com bactérias gram-positiva e gram-negativa, mais pesquisas para resolução e entendimento desse problema devem ser avaliados.⁵⁷

Devido ao aumento da produção e aplicação de NPs, novos alvos precisam ser determinador e identificado para uma conclusão da toxicidade desse material, com pouca informação e com os diferentes estudos, ora benéficos, ora tóxicos, chamou atenção para um melhor entendimento dessas NPs de seu potencial desenvolvimento.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Este projeto de pesquisa visa avaliar o efeito tóxico das NPs de ZNO sintetizadas em condições hidrotermais. As NPs foram produzidas em diferentes tempos para investigar também o efeito do tamanho nas características de citotoxicidade. A citotoxicidade foi avaliada utilizando NPs de ZnO em células cancerígenas do cancro do colo do útero.

3.2. Específicos

- Síntese de NPs de óxido de zinco ;
- Investigar as propriedades morfológicas e estruturais.
- Avaliar as propriedades ópticas;
- Avaliar a carga e o tamanho das partículas em suspensões coloidais
- Avaliar a toxicidade das NPs de ZnO por meio de apoptose e de necrose utilizando a metodologia de citometria de fluxo em células HeLa de cancro e células L929 de fibroblasto.

4. Metodologia Experimental

Nos tópicos a seguir estão descritas a metodologia experimental para a preparação das nanoestruturas de óxido de zinco. Posteriormente estão detalhados os métodos utilizados para caracterização das amostras, assim como informações sobre os principais produtos, reagentes e equipamentos utilizados durante este estudo.

Tabela 1. Código das amostras sintetizadas e seus respectivos tempos e tratamento de síntese.

Amostra	Tempo de Aquecimento (horas)
ZnO-1	0.50
ZnO-2	2
ZnO-3	4

4.1 Síntese das nanoestruturas de ZnO

A síntese das nanoestruturas de óxido de zinco baseia-se numa modificação da metodologia realizada por Cunha⁶⁰ e conhecida na literatura como (PBM).¹⁷ Para a síntese das nanoestruturas, inicialmente foi preparada uma solução de 50 mmol L⁻¹ cloreto de zinco (ZnCl₂ - Carlo Erba – 97%), com pH ajustado pela adição de hidróxido de amônio NH₄OH - Vetec – 28 a 30%) até que a mistura atingisse o pH 10,5. A mistura foi então transferida a um frasco autoclave e aquecida em uma estufa a 90°C por diferentes períodos de tempo (t = 0,30, 2 e 4, horas), para avaliar sua influência nas propriedades ópticas, morfológicas e estruturais das nanoestruturas. Após a síntese, o frasco foi rapidamente resfriado em gelo para evitar crescimento e maturação indesejados e os precipitados obtidos foram centrifugados e limpos com água destilada. Foram realizados cinco processos de lavagem e centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. Abaixo podemos observar Figura 2 o preparo da solução com acerto de pH e após o aquecimento a formação dos precipitados Nps.

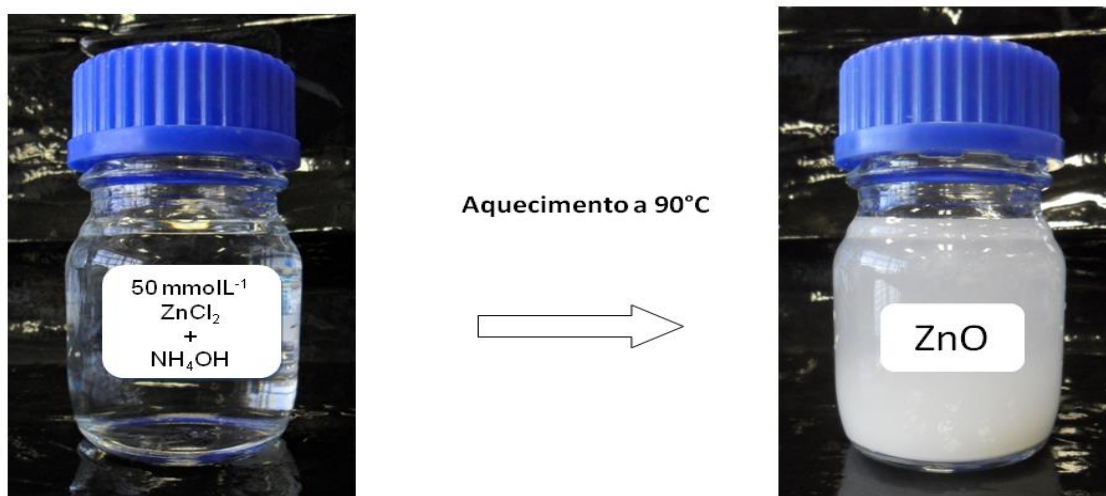


Figura 2. Esquema da rota sintética utilizada para se obter as nanoestruturas de óxido de zinco (ZnO).

5. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os pós resultantes das síntese da Tabela 1 foram analisados por conjunto de técnicas para avaliar a qualidade das NPs sintetizadas pela metodologia proposta. A análise morfológica e o efeito do tempo de síntese na formação das nanoestruturas da Tabela 1 foram realizados utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (FE-SEM – *Field Emission Scanning Electron Microscopy*) utilizando um microscópio FEI Inspect F50. As amostras também foram submetidas à análise óptica onde foi utilizado um espectrofotômetro eletrônico de UV-Vis modelo Varian Cary 50 com lâmpada de Tungstênio, variando o comprimento de onda de 200 a 800 nm. As análises foram realizadas no modo absorbância, e água ultrapura (Millipore) foi utilizada como *baseline* para a análise de espectroscopia e como solvente. Para essa caracterização os pós foram dispersos em água e analisadas após calibração do equipamento.

As análises de fotoluminescência foram realizadas utilizando um Varian Cary Eclipse com flash de Xenônio. As soluções preparadas para análise óptica possuem concentração $0,16 \pm 0,002$ g/L. Para evitar possíveis aglomerações, todas as soluções foram submetidas a ultrassom por 20 minutos. As análises de fotoluminescência foram realizadas a temperatura ambiente com comprimento de onda de excitação de $\lambda_{ex}=300$ nm (4,13 eV). Todos os espectros foram normalizados para que os picos de emissão no UV possuísem a mesma intensidade para comparação. O espectrofluorímetro foi ajustado para trabalhar com filtros automáticos, eliminando as emissões secundárias e terciárias do fluorímetro. O ruído foi eliminado com o método de média adjacente, onde cada novo ponto obtido é a média dos 20 pontos próximos ao ponto considerado.

Potencial Zeta e tamanho de partícula também foram avaliados nesse trabalho, o equipamento utilizado Zetasizer NanoZS avalia: tamanho (RH), potencial zeta (ζ) e massa molecular (Mw) não utilizado nesse trabalho. O equipamento permite determinar o raio hidrodinâmico (RH) de partículas (de 0,6 nm até 6 μ m) pela técnica espalhamento de luz dinâmico (DLS) a interpretação dos resultados utilizaram a equação de Stokes-Einstein. O potencial zeta (ζ) é medido utilizando a técnica conhecida como espalhamento de luz eletroforético (ELS) onde mede a velocidade de uma partícula movimentando-se em um determinado líquido quando um campo elétrico é aplicado. O valor da velocidade é convertido para o valor do potencial zeta da partícula e esses valores são indicativos da estabilidade de sistemas coloidais.

A caracterização estrutural, as fases cristalinas das nanoestruturas de óxido de zinco das amostras Tabela 1 também foram identificadas com auxílio de um difratômetro de raios X (DRX), Bruker AXS D8 Discover, utilizando radiação $K\alpha$ do Cobre (filtro de Níquel) tensões e correntes máximas 40 kV e 40 mA, medição do padrão de difração de pó por raios - x na geometria $\theta / 2 \theta$ no intervalo $-110^\circ < 2 \theta < 168^\circ$. As caracterizações foram realizadas com equipamentos disponíveis no laboratório do grupo LEAN, Central multiusuário da UFABC e a parte das imagens de microscopia foram obtidas no departamento de química de São Carlos (tempo de máquina cedido pelo grupo do Prof. Dr. Leite).

Nas tabelas abaixo estão contida uma breve descrição dos principais reagentes (Tabela 2) e equipamentos (Tabela 3) utilizados para fabricação e caracterização das amostras.

Tabela 2. Produtos utilizados durante os procedimentos experimentais.

Produto	Fórmula Química	Marca
Cloreto de Zinco (97%)	ZnCl_2	Carlo Erba
Hidróxido de Amônio (28 a 30%)	NH_4OH	Vetec

Tabela 3. Equipamentos utilizados para fabricação e caracterização das amostras.

Equipamento	Marca	Modelo
Estufa	Nova Etica	Série 400
Aagitador Magnético	IKA	C-MAG HS7
Lavadora Ultrassônica	Unique	USC 2800
Sistema Ultra Purificador de Água	Millipore	Direct-Q5
Centrífuga	Herolab	UniCen M
Microscópio Eletrônico de Varredura	FEI	Inspect F50
Espectrofotômetro fotodiodo ultravioleta-visível	Varian	Cary 50
Espectrofotômetro de fluorescência	Varian	Cary Eclipse
Medidor de Potencial Zeta	Malvern	Zetasizer NanoZS
Difratômetro de Raios X	Bruker AXS	D8 Discover
Citrometro de Fluxo	Becton Dickinson	FACSCalibur®

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir da metodologia proposta foram sintetizadas as amostras apresentadas na Tabela 1. Os resultados foram divididos em duas etapas: na primeira serão discutidas as caracterizações, estruturais, morfológicas, ópticas das NPs, e na segunda parte serão apresentadas as caracterizações de citotoxicidades realizado com as NPs de ZnO em colaboração com o Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia do Instituto de Física da USP em São Carlos.

6.1 Análises Estruturais

A pureza e as propriedades estruturais das nanoestruturas de ZnO formadas foram examinadas via difração de raios X do precipitado produzido. A Figura 8 ilustra o padrão de difração de raios X das amostras apresentadas na Tabela 1. Os picos foram indexados com base no padrão cristalográfico (arquivo JCPDS no. 36-1451) do ZnO referente a fase wurtzita (hexagonal). Todos os picos observados para as amostras podem ser perfeitamente indexados ao arranjo hexagonal referente à fase wurtzita do ZnO no estado bulk. Nenhum pico correspondente a outras fases ou impurezas foi observado pelo difratograma de raios X, indicando que a fase cristalina de ZnO é de alta pureza. Os picos não indexados em * no difratograma se trata do sinal emitido pelo porta amostra, também pode ser observado esse mesmos perfil em trabalhos já estudados e publicados pelo grupo.⁶⁰ A partir dos dados de raios X o grau de orientação das Nps de ZnO foi determinado utilizando-se a equação 6 seguindo os mesmo procedimentos reportados por Cunha e colaboradores⁶⁰.

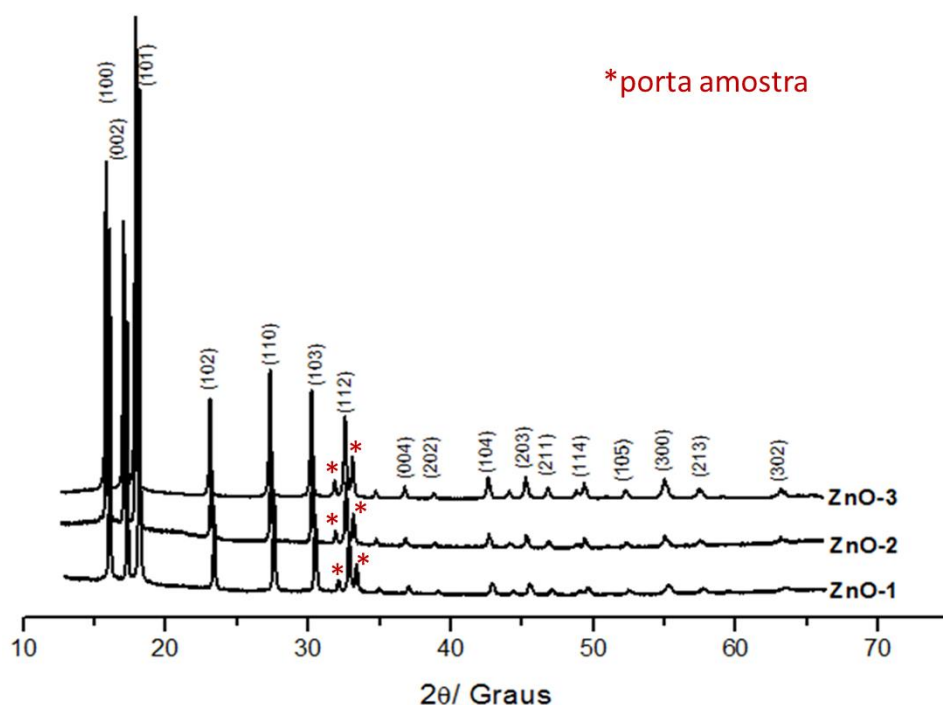


Figura 3. Difratoograma de raios X obtido para as amostras apresentadas na Tabela 1. Os picos foram indexados com base no padrão cristalográfico referente a fase hexagonal wurtzita do ZnO.

O grau de orientação dos cristais são obtidos com base na equação 1 e na intensidade dos picos de difração. Esta característica do cristal é fornecida pelo parâmetro F , equação 6 abaixo, que fornece o coeficiente de textura ou o grau de orientação:

$$F = \frac{P - P_0}{I - P_0} \quad (1),$$

onde $P = \frac{\sum I(h00)}{\sum I(hkl)}$ e P para a amostra policristalina. P é calculado a partir da razão entre a intensidade relativa do plano que se deseja avaliar o fator F e a somatória dos valores de intensidade de todos os planos analisados. O plano preferencial de crescimento calculado foi (0002) para todas as amostras com exceção das amostras ZnO-2 (2 horas) e ZnO-3 (4 horas) que apresentaram plano preferencial (100), provavelmente relacionado ao tempo de síntese.

Ainda em relação aos resultados de raios X foram estimados os parâmetros de rede cristalina da fase hexagonal wurtzita para todas as NPs de ZnO sintetizadas com auxílio das equações 1 a 3.

De posse do ângulo de incidência dos picos nos difratogramas de raios X e de acordo com a Lei de Bragg, foi possível ainda calcular as distâncias interplanares d para cada pico utilizando a Equação 2 ³⁸,

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (2),$$

onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, n a um número inteiro (ordem da difração), d à distância interplanar para o conjunto de planos hkl (índice de Miller) da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência dos raios X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos) ⁶³. Para o cálculo dos parâmetros de rede foi utilizado a equação 3 - própria para uma estrutura hexagonal ⁶³ - que relaciona a distância interplanar com os parâmetros de rede e os índices de Miller.

$$\frac{1}{d^2} = \frac{4}{3} \frac{h^2 + hk + k^2}{a^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad (3),$$

onde h , k e l são os índices do plano e a e c são os parâmetros de rede (no caso hexagonal, $a=b$). Aplica-se a Equação 3 nos dois planos com maior ângulo e encontra-se um sistema de duas equações e duas incógnitas (a e c), onde é possível calcular os parâmetros de rede. É possível se obter o volume da célula unitária, utilizando a equação 4 ⁶³:

$$V = \frac{\sqrt{3}a^2c}{2} \quad (4),$$

Os valores calculados de plano preferencial de crescimento, dos parâmetros de rede e de volume de célula unitária para as amostras estão resumidos na Tabela 4, juntamente com os valores do padrão JCPDS (arquivo no. 36-1451) para comparação.

Tabela 4. Parâmetros estruturais calculados para os três tempo de síntese a partir dos picos obtidos na análise de difração de raios X.

Amostra	a (Å)	c (Å)	V (Å ³)	Crescimento Preferencial
ZnO-1	3,249 ± 0,003	5,207 ± 0,005	47,59 ± 0,01	(002)
ZnO-2	3,254 ± 0,003	5,207 ± 0,005	47,75 ± 0,01	(100)
ZnO-3	3,256 ± 0,003	5,212 ± 0,005	47,81 ± 0,01	(002)

Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que os parâmetros de rede *a*, *c* e o volume de célula permanecem constantes, comparados aos valores da ficha JCPDS (36-1451) da estrutura wurtzita do ZnO, com as variações no tempo de síntese. Esse resultado está em acordo com estudo recentemente publicado pelo grupo no qual os parâmetros estruturais mantiveram-se praticamente inalterados para um longo período de tempo de síntese. Neste mesmo estudo a única fase indexada para todas as NPs sintetizadas desde 5 min até 72 horas foi a fase wurtzita hexagonal do ZnO. Além disso, os mesmos valores de grau de orientação foram encontrados seguindo os tempos de síntese aqui utilizados o que revela que o processo é bastante reprodutível.

6.2 Análises Morfológica

A morfologia das NPs foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens obtidas para os diferentes períodos de síntese estão ilustradas na Figura 4. As NPs de ZnO obtidas em condições hidrotermais, nos diferentes tempos de reação, resultaram em bastões (nanoestruturas 1D) organizados na forma de flor dispersa. Cunha *et al.*⁶⁰ em estudos recentes utilizando essa mesma rota de síntese mostrou que esta é a morfologia tipicamente obtida quando o pH é ajustado para ~10,5.¹

O diâmetro médio da estrutura que compõem as “*flores*” foram estimados entre $(1,2 - 1,8 \pm 1,0 \mu\text{m})$ a partir das imagens de MEV (Figura 4), utilizando o software ImageJ.⁴⁴ para as NPs de ZnO preparadas neste trabalho (30 min, 2h e 4 h respectivamente). Além disso, o diâmetro médio dos nanobastões $(250 \pm 1,5 \text{ nm})$ se manteve constante para todas as sínteses utilizados neste trabalho e o comprimento médio dos bastões foram estimados entre $(0,4 - 1,0 \pm 0,5 \mu\text{m})$.

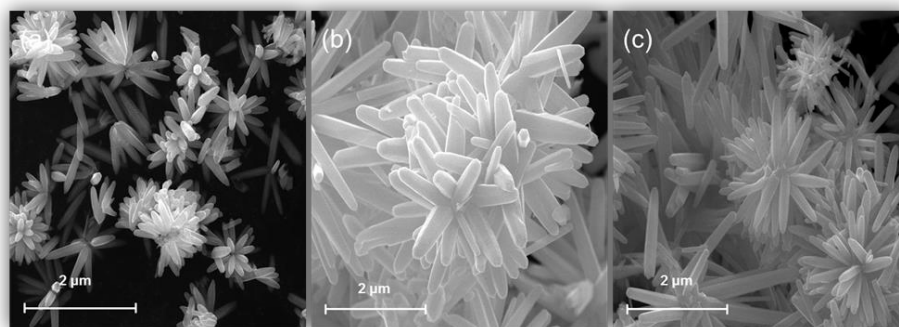


Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de varredura das NPs de ZnO sintetizadas em condições hidrotermais em diferentes tempos. (a) 30 min, (b) 2horas e (c) 4 horas.

O comprimento das nanoestruturas de ZnO estão relacionado diretamente com o tempo de permanência da solução precursora em condições hidrotermais (Figura 4). Outro fato bastante conhecido que está envolvido no comprimento dos bastões foi a temperatura que pode acelerar o crescimento e conseqüentemente o alcance do comprimento máximo⁴⁰, neste estudo a temperatura foi mantida constante.

O efeito do tempo e da temperatura de forma geral estão relacionados a dois diferentes estágios da formação das NPs de ZnO: nucleação e crescimento. Esta é a morfologia tipicamente obtida quando o pH é ajustado para ~10,5. Este valor de pH foi determinado em estudos anteriores por Cunha e colaboradores⁶⁰ em experimentos de titulação potenciométrica (triplicata). Em pH 10,5 é observado a total dissolução dos precipitados de hidróxido de zinco presentes na solução precursora.

6.3 Análise Óptica

As propriedades ópticas dos materiais produzidos foram analisadas usando as técnicas de espectroscopia eletrônica na região do Ultravioleta-Visível e Espectroscopia de Emissão de Fotoluminescência. Os espectros de absorbância para todas as amostras estão ilustradas na Figura 5. Os pico exibem absorção entre 360-390 nm na região do ultravioleta.

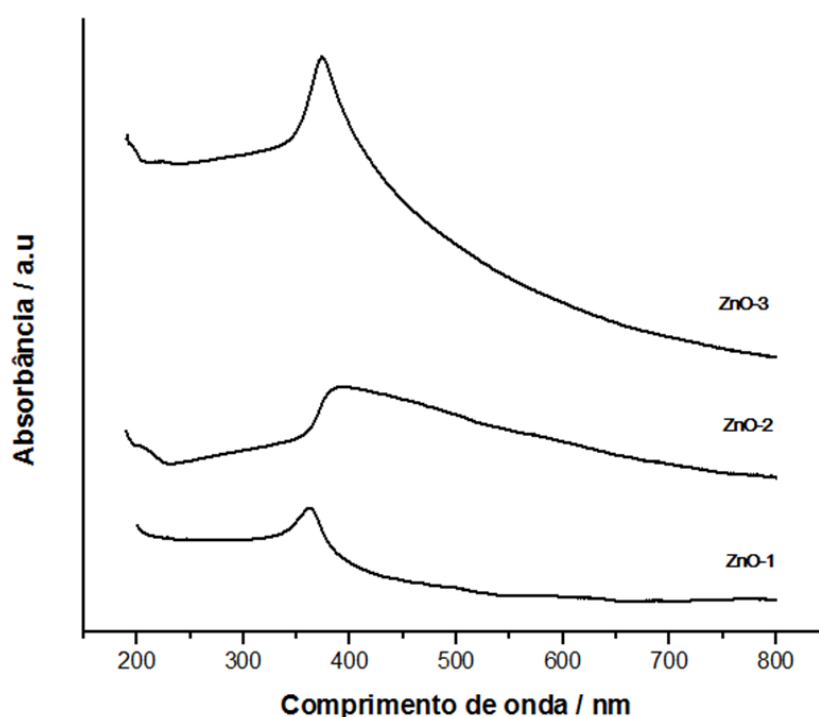


Figura 5. Os espectros de UV-Vis de ZnO - 1 (30 minutos), ZnO - 2 (2h) e ZnO - 3 (4 horas) de nanoestruturas na função de diferentes tempos de reação.

As bandas no espectro de absorção (Figura 5) são tipicamente associados com a lacuna existente entre da banda intrínseca do material,¹⁵ banda de valência (BV) e a banda de condução (BC). Esse espaço entre BV-BC é normalmente chamado de *band gap* e está relacionado à energia mínima necessária para transferência de elétrons entre elas^{15,16}. A partir dos espectros eletrônicos de absorção (Figura 5) e da equação de Tauc,²² (equação 1) o valor do *band gap* óptico (banda proibida) foi estimado para todas as amostras.

$$\alpha h\nu = A (h\nu - E_g) \quad (5),$$

onde A é uma constante, h é a constante de Planck, ν e a frequência de onda, E_g e a energia de banda proibida e n e o número de possíveis transições eletrônicas que podem ocorrer no material.

Para obter o valor de E_{gopt} do material é necessário converter os valores que estão na unidade de comprimento de onda (nm) para unidade de energia em elétrons-volts (eV). Para isso foi utilizada a equação 2 abaixo:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1.5) \quad (6),$$

c é a velocidade da luz e λ é o comprimento de onda incidente.

Os valores estimados do *band gap* óptico aumenta linearmente com o aumento do tempo de síntese variando entre 3,1 eV - 3,3 eV. Essa larga distribuição dos valores de *band gap* óptico pode estar associada ao tamanho das NPs e da formação de defeitos. A formação de defeitos e a variação do tamanho das NPs são, como já discutido por Cunha *et al*⁶⁰ e outros autores, estritamente dependentes do tempo de reação, ou seja, o período em que a solução é mantida sob condições hidrotermais.⁴⁸

Os espectros de fotoluminescência obtidos a temperatura ambiente para as amostras da Tabela 1 exibem o padrão normalmente observado para nanoestruturas de ZnO, i.e., a presença do pico de emissão no UV de 380-390 nm e dois componentes principais na região do visível entre 540-570 e 580-620 nm como apresentado na Figura 6. A emissão no UV é associada ao band gap de emissão do ZnO como consequência de recombinação dos éxcitons ^{15,56}. A variação da posição e intensidade relativa do pico de emissão do UV do ZnO é normalmente atribuída a diferentes morfologias, cristalinidade, dimensões, e defeitos na estrutura do material ¹²⁻¹⁵.

Os picos do espectro são fortemente afetadas por diferentes morfologias de ZnO, mas não há nenhuma evidência clara deste no presente estudo.⁵⁷ Usualmente, os diferentes picos na região visível observado nos espectros de fotoluminescência estão associados com o espalhamento da excitação devido à presença de diferentes defeitos ^{29,56,57,58}, entre outros. Assim, as propriedades ópticas da NPs de ZnO pode ser manipulada para várias aplicações controlando a morfologia, as dimensões e a presença de defeitos ou de impurezas durante o processo de síntese. Göpel e Lampe mostraram que a variação da posição do pico de emissão no UV e a forma dos picos no espectro de emissão do ZnO pode ser devido a diferentes concentrações de defeitos nativos ⁵¹.

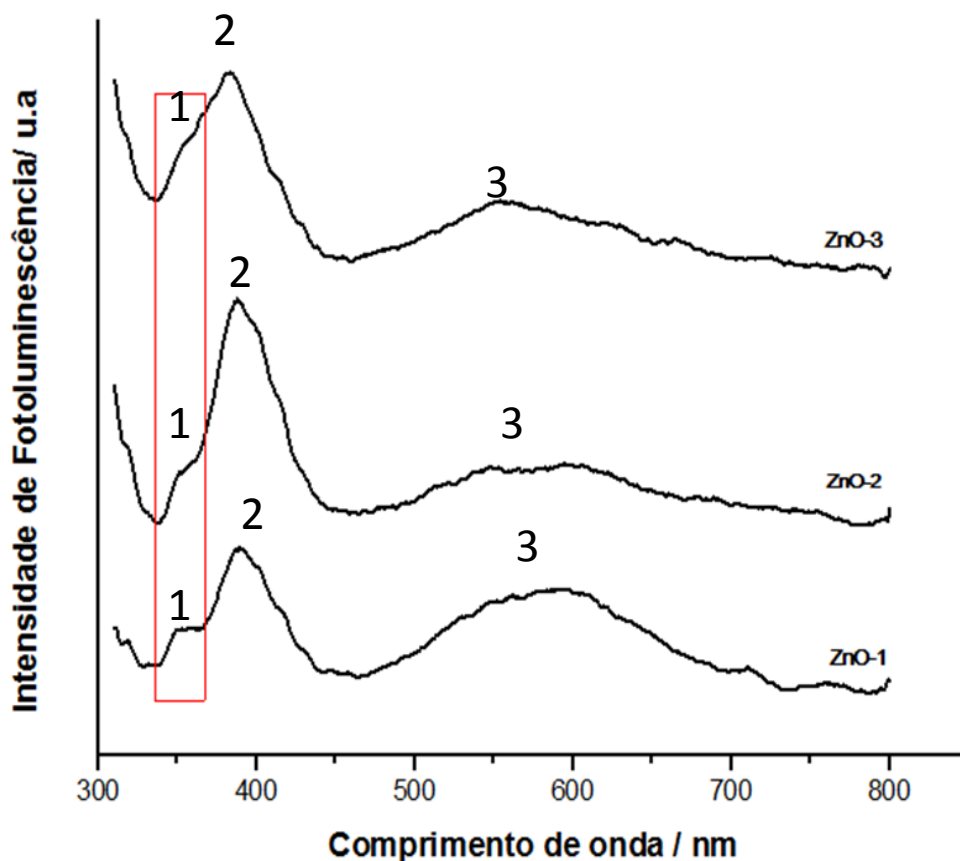


Figura 6. Espectros de Fotoluminescência das nanoestruturas. ZnO - 1 (30 minutos), ZnO - 2 (2h) e ZnO - 3 (4 horas) obtidas em diferentes tempos de reação. 1 - Comprimento de onda ~ 350 nm. 2 - A presença de dois pico de emissão no UV de 380 - 390 nm e 3 - Componentes principais na região do visível entre 520-620 nm como apresentado na Figura 6.

O espectro de fotoluminescência claramente indica a presença de defeitos nas amostras. Pelas imagens obtidas MEV observa a formação de nanoestruturas na forma de flor durante os primeiros 30 minutos de síntese (amostra ZnO-1), sugerindo a presença de defeitos. Esta análise é consistente com a alta intensidade relativa da banda do visível do espectro de fotoluminescência. Além disso, os picos no espectro de fotoluminescência também são fortemente afetados por diferentes morfologias do ZnO, mas no presente estudo não foram encontradas evidências deste fenômeno ¹⁷.

Em trabalhos anteriormente analisados pelo grupo observou que o ZnO sintetizado com mais horas, há uma alta concentração de defeitos nas nanoestruturas de ZnO.⁶⁰ Entre 4 horas, os bastões hexagonais que compõem as nanoflores apresentam um valor mínimo de defeitos. Para tempos maiores de tratamento hidrotérmico, a presença de defeitos volta a aumentar. Para essa avaliação, a presença de defeitos e o tamanho dos cristais se mostram responsáveis pelo comportamento óptico do ZnO.⁶⁰

6.4. Análise Tamanho de Partícula e Potencial Zeta

6.4.1 Análise Tamanho

O tamanho médio foi estimado utilizando os valores de diâmetro hidrodinâmico médio obtido pela técnica espalhamento de dinâmica de luz (DLS). Para essa avaliação as amostras foram diluídas em água e dispersas com o auxílio do ultrassom. A calibração do equipamento foi avaliado em tempo de estabilização 0. Foram obtidas por medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) em um equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).⁶¹ O diâmetro das sínteses analisadas (d.nm) estão descritos na Tabela 5 Os valores dos tamanhos das NPs obtidos pela técnica de DLS foram diferentes dos valores estimados utilizando as imagens de MEV. Provavelmente essa diferença se deve ao fato das NPs de zinco produzidas nesse trabalho terem a forma de bastões organizadas na forma de flores, além de fácil aglomeração pela ausência de um agente surfactante. Esses fatores podem ser limitante na estimativa correta ou precisa do tamanho utilizando essa técnica de DLS.

Tabela 5. Avaliação tamanho das partículas

<i>Tamanho Partícula</i>	d.nm
30 minutos	900
2 horas	1100
4 horas	1400

No entanto, as curvas obtidas pelo equipamento para todas as três NPs de óxido de zinco produzidas neste trabalho ilustram uma única faixa de distribuição no tamanho, indicando que o método de homogeneização das amostras foi eficaz para obtenção de uma única faixa de tamanho das NPs produzidas, (Figura 7).

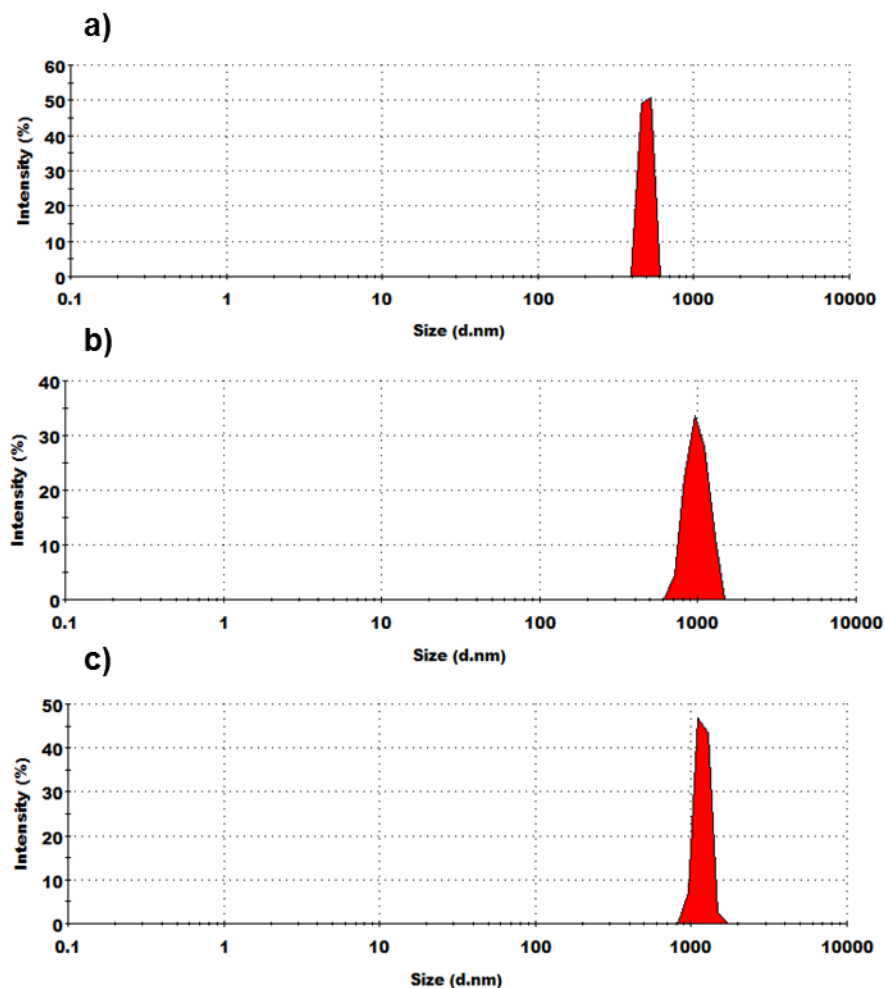


Figura 7. Distribuição do tamanho de partícula em suspensão aquosa de acordo com o tempo de síntese a) 30 minutos, b) 2 horas e c) 4 horas.

6.4.2 Potencial Zeta (ζ)

A análise do Potencial Zeta das NPs em solução foram realizadas a fim de descobrir se o material apresenta boa estabilidade eletrostática quando em suspensão. Para essa avaliação as amostras foram diluídas em água e dispersas com o auxílio do ultrassom. A calibração do equipamento foi avaliada em tempo de estabilização 0. A regra geral para a estabilidade eletrostática da solução é a faixa de Potencial Zeta de ± 30 mV. Como os potenciais zeta das três amostras estão dentro dessa faixa, podemos considerar que as amostras estão estáveis. Os valores de potencial zeta (ζ) para todas as NPs de óxido de zinco dispersas em meio aquosos (\sim pH 7,9) estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Avaliação potencial zeta (ζ)

Potencial zeta	mV 0s
30 minutos	17,9
2 horas	28,4
4 horas	27,4

A apresentação gráfica obtida pelo equipamento, também indica que o método de homogeneização das amostras foi eficaz, o qual pode observar picos monomodal.

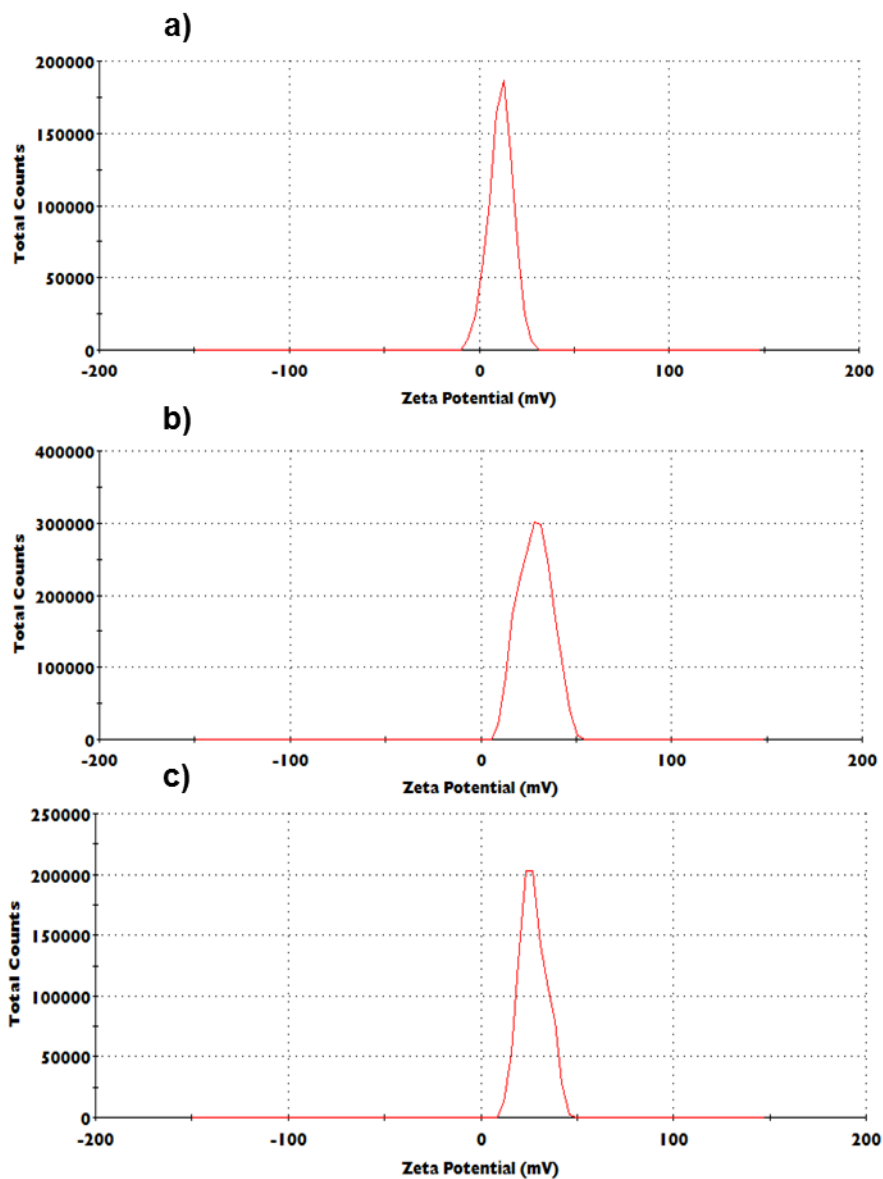


Figura 8. Potencial Zeta em suspensão aquosa, a) síntese 30 minutos b) síntese 2 horas c) síntese 4 horas.

Os valores de potencial zeta são alterados em função do pH por isso é muito importante termos determinado antes de se iniciar o estudo

Tabela 7. pH das amostras analisadas.

Amostra	pH
30 minutos	7,82
2 horas	7,90
4 horas	8,02

As análises de cargas superficiais dos óxidos tem grande influência no comportamento da suspensão. A Figura 8 mostra o gráfico de potencial zeta para o ZnO. Pode-se observar que as ZnO NPs tem carga predominantemente positiva quando introduzido em meio aquoso e a suspensão adquire pH ~ 7,9 sem qualquer aditivo. Conhecer o pH das soluções é muito importante para o passo seguinte, quando será feito a introdução a um meio biológico.

6.5 Cultura e tratamento celular

As células cancro do colo do útero humano (HeLa) e fibroblastos de murino (L929), foram adquiridas a partir do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro, foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% (v / v) de soro fetal bovino (FBS), penicilina / estreptomicina (50 UI / mL e 50 ug / ml, respectivamente), a 37 °C sob uma atmosfera umidificada de CO₂ a 5% / ar incubadora (Thermo Electron Co.), passou a confluência e verificada em microscópio invertido (Nikon Eclipse Ti, Japão). Para analisar os efeitos de citotoxicidade, HeLa e L929 células foram tratadas com nanopartículas de óxido zinco; suspensão estoque das Nps, foram diluído em série na concentrações de 10,0 µg/mL para as incubações de apoptose, necrose e ensaios de incorporação celular. Imediatamente antes de todos os ensaios, a viabilidade das células foram também determinada pelo método de exclusão de azul de tripano,⁵² e o número de células viáveis foi > 95% para cada célula em ambos os ensaios de controle e tratados.

6.5.1 A apoptose e necrose

Os ensaios de apoptose e necrose foram medidos por citometria de fluxo, utilizando isotiocianato de fluoresceína (FITC) - anexina V para a detecção da apoptose e iodeto de propídio (PI) para a detecção de necrose de coloração utilizando um kit comercial (BD Bioscience®, EUA). HeLa e células L929 (1×10^6 células / ml) foram plaqueadas em placas de cultura de 6 poços a aderir durante 24 h. A seguir, as células foram tratadas com $10,0 \mu\text{g} / \text{mL}$ solução de nanopartículas de óxido de zinco, como descrito anteriormente, durante 24 h. O controle negativo não foi tratado. Depois disso, as células foram colhidas, lavadas duas vezes em PBS frio, ressuspensionado em solução tampão de ligação 1x e com $5 \mu\text{l}$ do corante anexina V-FITC (misto e agitado durante 15 minutos no escuro) e com $5 \mu\text{l}$ PI incubando à temperatura ambiente por mais 5 minutos. As células foram analisadas por citometria de fluxo dentro de 1 hora. Células que passar por processo de apoptose são definido como FITC anexina V positivo / PI negativo e células que estão passando por processo de necrose anexina V positivo / PI positivo. Células mancha negativa tanto para solução PI e anexina V-FITC conjugado são células vivas. Um número de 10.000 células foi analisado por amostra. A análise de citometria de fluxo foi efetuada utilizando citometria de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson, CA, EUA).

Os resultados foram expressos pela média de seis experimentos realizados em triplicata. Os dados foram avaliados utilizando análise de variância (ANOVA), seguido pela comparação múltipla de teste Tukey Post Hoc, usando Graph Pad Prism programa de software versão 5.0. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Um histograma gerado pelo equipamento dispõem de informações emissão de fluorescência no qual foram tratados para valores utilizados para a avaliação estatística dos gráficos da Figura 9, abaixo.

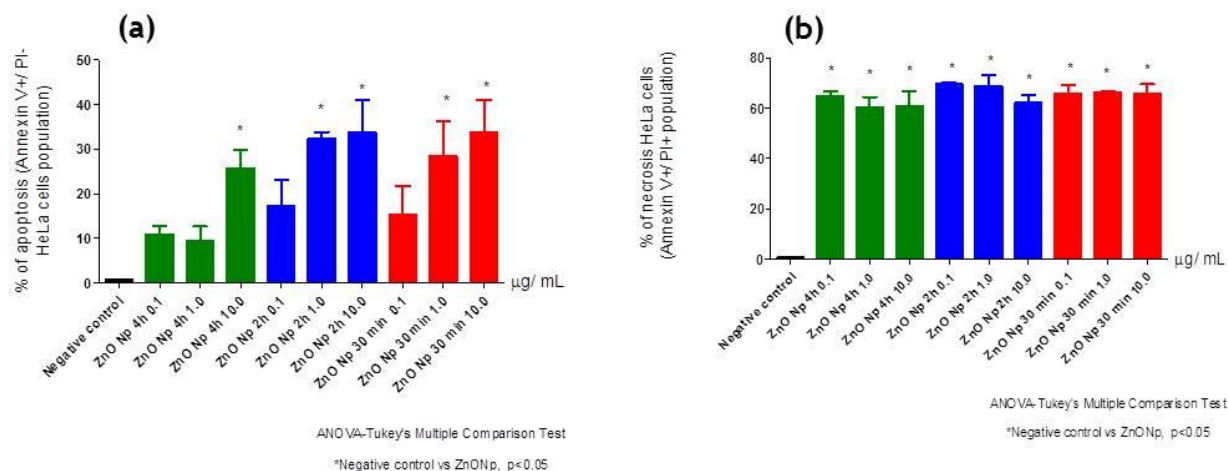


Figura 9. Histograma do efeito das ZnONps em células HeLa (carcinoma cervical) sobre a porcentagem de (a) apoptose, e (b) necrose. Esses ensaios foram detectados com uso do corante positivo Annexin V-FITC / negativo PI. Os dados estão apresentados pela média de dos ensaios realizados em triplicata com seus respectivos valores de desvio padrão estimados (SD). *Estatisticamente diferente do grupo utilizado como controle negativo (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, $p < 0.05$).

Na primeira parte dos ensaios de toxicidade foi realizada uma avaliação estatística de morte celular por apoptose (Figuras 9a) utilizando células HeLa (carcinoma cervical) na presença das Nps de ZnO. Para todas as amostras de Nps de ZnO e concentrações utilizadas nessa dissertação causaram a morte da célula cancerígena sem comprometer a integridade das células saudáveis (comparado ao controle negativo em preto na Figura 9). É possível notar que o uso de 10 $\mu\text{g/mL}$ de nanopartículas apresenta maior eficiência na morte das células cancerígenas (HeLa). Na Figura 9b está representada a morte por necrose das células HeLa na presença das Nps de ZnO. A eficiência para todas as amostras chega próximo as 80% e não há diferenças significativas nas porcentagens de morte quando a concentração de Nps é variada. Em ambas as análises os resultados foram comparados com o controle negativo. Assim, pode-se destacar o efeito seletivo das Nps de ZnO em provocar a morte especificamente das células cancerígenas sem qualquer efeito na células saudáveis.

Outro ensaio de toxicidade foi realizado utilizando-se células L929. Da mesma forma foi realizada uma avaliação estatística de morte das células por apoptose e necrose e os resultados foram representados na forma de histogramas, Figura 10.

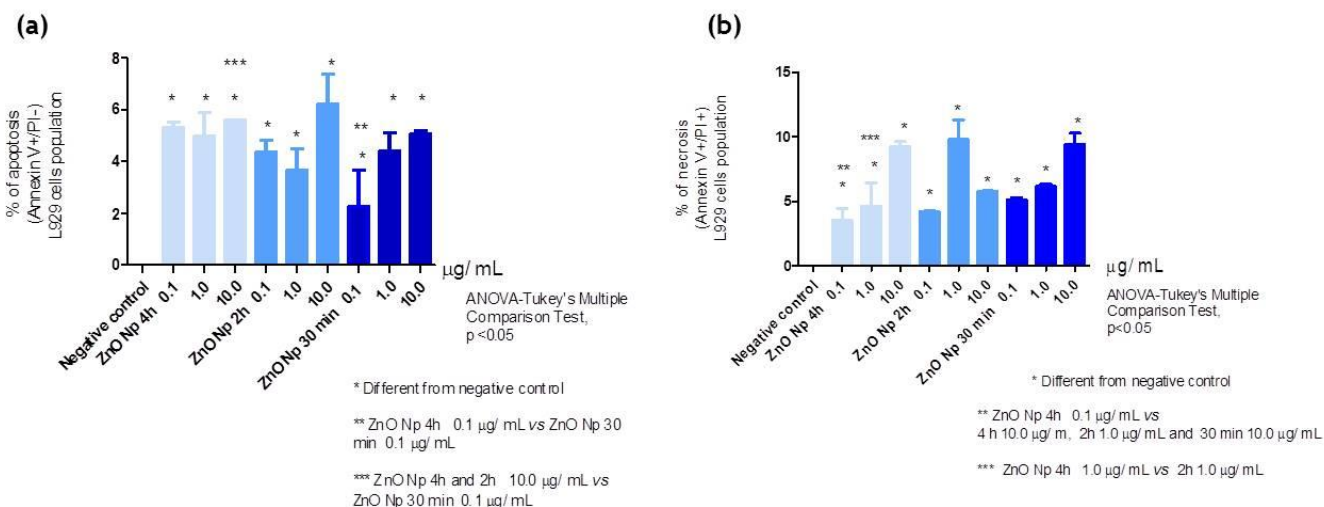


Figura 10. Histograma do efeito das ZnONps em células L929 sobre a porcentagem de (a) apoptose, e (b) necrose. Esses ensaios foram detectados com uso do corante positivo Annexin V-FITC / negativo PI. Os dados estão apresentados pela média de dos ensaios realizados em triplicata com seus respectivos valores de desvio padrão estimados (SD). *Estatisticamente diferente do grupo utilizado como controle negativo (ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test, $p < 0.05$).

O resultado do ensaio de apoptose (Figura 10a) ilustra que houve morte celular na presença de todas as Nps de ZnO (diferentes tamanhos) e concentrações utilizadas nesse trabalho. É possível notar que cada amostra de ZnO é mais eficiente que a outra em determinada concentração para causar a morte da célula L929. No entanto, o maior valor observado foi para amostra produzida por um período de 2h com tamanho intermediário apresentando aproximadamente 8% de morte comparado ao controle negativo. No entanto, é importante mencionar que as Nps maiores (4h) se mostraram mais eficientes em baixas concentrações (~6%).

Já no ensaio por necrose (Figura 10b) as células foram mais eficientemente mortas pelas Nps de ZnO quando utilizado maiores concentrações (10 µg/mL). O histograma da Figura 10b ilustra que o uso das Nps de ZnO no ensaio de necrose causa a morte celular (L929) em todas as concentrações com o máximo de morte (10%) em 10 µg/mL.

Com base nos resultados *in vitro* de ambos os ensaios de apoptose e necrose utilizando células HeLa e L929 na presença de Nps de ZnO, é possível inferir que as Nps exibiram uma forte preferência em causar morte das células cancerígenas. Por fim, as Nps de ZnO utilizadas nesse trabalho em diferentes concentrações e tamanhos exibiram uma habilidade seletiva em causar a morte de células cancerígenas sem danos as células saudáveis como observado e comparados com o controle negativo nos histogramas das Figuras 9 e 10. Esse foram os primeiros testes realizados com as Nps de ZnO sintetizadas no grupo com a colaboração do grupo de São Carlos coordenado pelo Prof. Zucolotto. Novos ensaios serão realizados no futuro.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo a metodologia utilizada foi bastante eficiente na preparação de nanoestruturas de óxido de ZnO, na forma de bastão (1D) organizadas como flores. Os resultados de DRX confirmaram a obtenção da fase pura hexagonal do ZnO (wurtzita) para todas as NPs sintetizadas, incluindo as amostras mantidas por curto período (30 min.) durante o processo de síntese, sem a necessidade de tratamentos térmicos adicionais. Pela técnica de microscopia eletrônica de varredura foi acompanhada a evolução morfológica das nanoestruturas de ZnO e foi observada a formação de bastões já nos primeiros 30 minutos de síntese organizados em “flores”. O comprimento dos bastões individualmente e das flores são bastante dependentes do tempo de síntese, no entanto, o diâmetro permaneceu constante para os tempos investigados nesse trabalho.

O efeito do tamanho das nanoestruturas foi também monitorado pelas técnicas de espectroscopia na região do UV-Vis e por fotoluminescência. As bandas de absorção no espectro de UV-vis deslocam com aumento do tempo de síntese, e ainda com base nesses resultados foi possível estimar o *band gap* óptico do material. O valor médio estimado foi de $3,21 \pm 0,02$ eV, e em acordo com a literatura para este tipo material em escala nanométrica. Pelos espectros de fotoluminescência foi observado três bandas de emissão sendo: uma na região do ultravioleta característica da energia do gap do material e outras duas (400 nm e 600 nm) relacionadas a defeitos estruturais e morfológicos formados durante o processo de preparação. As nanoestruturas também foram investigadas dispersas em água com pH ~7.0, simulando as condições do ambiente celular, com intuito de observar o comportamento desse material. A análise do potencial zeta e de distribuição de tamanho das nanoestruturas mostraram a presença de um único pico, ilustrando que a metodologia de separação e dispersão das nanoestruturas foi bastante eficaz. O tamanho médio das nanoestruturas na forma de flores estimado foi de 2157 nm e potencial zeta médio (carga) foi de + 22,4 mV. Esse valor de carga mostra que as nanoestruturas de óxido de zinco são bastante estáveis para análise e aplicação no meio celular.

Por fim, em colaboração com Prof. Zucolotto da USP - São Carlos, foi avaliada a toxicidade das nanoestruturas envolvendo células saudáveis e cancerígenas. De acordo com essa investigação preliminar as nanoestruturas apresentam alta seletividade e habilidade em provocar a morte de células cancerígenas sem causar qualquer dano as células saudáveis. Assim, pode-se atribuir que as nanoestruturas ou Nps de ZnO apresentam baixa toxicidade para as células saudáveis e bastante agressivas para células tumorais. Outros estudos serão realizados no futuro para confirmar e garantir essa eficácia das NPs de ZnO como agentes cancerígenos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ÖZGÜR, Ü.; ALIVOV, YA.I.; LIU, C.; TEKE, A.; RESHCHIKOV, M. A.; DOĞAN, S.; AVRUTIN, V.; CHO, S.-J.; MORKOÇ, H. **A comprehensive review of ZnO materials and devices**. J. Appl. Phys., Vol. 98 (041301-1-041301-103), pp. 1 – 103, 2005 .
2. KATZ, E; WILLNER, I. **Integrated nanoparticle-biomolecule hubrid systems: synthesis, properties, and applications**. Angewandte Chemie – International Edition, v.43, n 45, p 6042-108,2004.
3. FREITAS JUINIOR, R.A. **What is nanomedicine?** Namomedicine, v.1, n.1, p 2-9, 2005.
4. Xavier, A. M.; **Avaliação das propriedades morfológicas e estruturais de nanoestruturas de óxidos de ferro sintetizadas pelo método hidrotérmico**. UFABC Dissertação (Mestrado em Nanociências e Materiais Avançados). Universidade Federal do ABC, 2012.
5. WANG,Y.L.; XIA, Y. N. **Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersed spherical colloids of low melting-point metals**. Nano Letters, v.4, n.10, p. 2047-2050, 2004.

6. KEREN, D.F. **History and evolution of surface marker assays.** In: **KEREN, D.F. et al. Flow citometry and clinical diagnosis.** Chicago: American Society of Clinical Pathologists,p.1, 1994 .

7. JANOTTI, A.; VAN DE WALLE, C. G. **Fundamentals of zinc oxide as a semiconductor.** Reports on Progress in Physics, Vol. 72, 2009.

8. Zaoui, A.; Sekkal, W.; **Pressure-induced softening of shear modes in wurtzite ZnO: A theoretical study.** Phys. Rev. B 66, 174106 –12 November 2002.

9. JAGADISH C.; PEARTON, S. J. **Zinc Oxide Bulk, Thin Films, and Nanostructures: Processing, Properties and Applications.** 1^a ed. Nova York: Elsevier, 2006.

10. ANTA, J. A.; GUILLÉN, E.; TENA-ZAERA, R. **ZnO-based dye sensitized solar cells.** The Journal of the Physical Chemistry C, Vol. 116, p. 11413-11425, 2012.

11. KYLE MEYER, P.R., M.A., J. J. R., Y. H. **ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts,** via p53 and p38 pathways. Elservier. Toxicology in Vitro 25 1721–1726, 2011.

12. Wang Y, Gao S, Ye WH, Yoon HS, Yang YY. **Co-delivery of drugs and DNA from cationic core–shell nanoparticles self-assembled from abiodegradable copolymer.** Nat Mater; 5:791-6, 2006.

13. Seo WS, Lee JH, Sun X, Suzuki Y, Mann D, Liu Z, et al. **FeCo/graphiticshellnanocrystals as advanced magnetic-resonance-imaging and nearinfraredagents.** Nat Mater;5:971-6, 2006.

14. Visaria RK, Griffin RJ, Williams BW, Ebbini ES, Paciotti GF, Song CW, et al. **Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle–assisted tumor necrosis factor- α delivery.** *Mol Cancer Ther*;5:1014-20, 2006.

15. Singla ML, Shafeeq MM, Kumar M. **Optical characterization of ZnO nanoparticles capped with various surfactants.** *J Luminescence*;129:434-8, 2009.

16. Gupta V, Sreenivas K, Jagadish C, Pearton SJ, editors. **Pulsed laser deposition of zinc oxide.** In: **ZnO bulk, thin films and nanostructures.** Amsterdam: Elsevier;. p. 85-174, 2006.

17. Kuo TR, Wu CL, Hsu CT, Lo W, Chiang SJ, Lin SJ, et al. **Chemical enhancer induced changes in the mechanisms of transdermal delivery of zinc oxide nanoparticles.** *Biomaterials*;30:3002-8, 2009.

18. Lopes de Romana D, Brown KH, Guinard JX. **Sensory trial to assess the acceptability of zinc fortificants added to iron-fortified wheat products.** *J Food Sci*;67:461-5, 2002.

19. BRAYNER, R., FERRARI-ILIOU, R., BRIOVOIS, N., DJEDIAT, S., BENEDETTI, M.F., FIEVET, F., **Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium.** *Nano Lett.* 6, 866–870, 2006.

20. OSMOND MJ, MCCALL MJ. **Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard.** *Nanotoxicology*.;4(1): 15–41, 2010.

21. Rob J Vandebriel, Wim H De Jong.; **A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles.** Dovepress.; *Nanotechnology, Science and Applications* 2012:5.

22. CENCHAO SHEN., SIMON A. JAMES, MARTIN D. DE JONGE, TERENCE W. TURNEY, PAUL F. A. WRIGHT and BRYCE N. FELTIS **Relating Cytotoxicity, Zinc Ions, and Reactive Oxygen in ZnO Nanoparticle–Exposed Human Immune Cells.** *Toxicological Sciences* 136(1), 120–130, 2013.

23. Akhavan, Omid; Ghaderi, Elham. **"Enhancement of antibacterial properties of Ag nanorods by electric field"**. *Science and Technology of Advanced Materials* 10:015003, 2009.

24. Raulin, J. **Chemical studies on vegetation.** *Annales Des Sci Naturelles.*, pp. 293-299, 11 de 1869.

25. Prasad, AS. **A century of research on the metabolic role of zinc.** *Am J Clin Nutr.* Vol. 22(9), pp. 1215-21, 1969.

26. Tuerk MJ, Fazel N. **Zinc deficiency. Current Opinion in Gastroenterology.**, pp. 136-142, 25 de 2009.

27. Llobet JM, Domingo JL, Colomina MT, Mayayo E, Corbella J. **Subchronic oral toxicity of zinc in rats.** *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, Vol. 41, pp. 36-43, 1988.

28. Sandström, B. **Bioavailability of zinc.** *Eur J Clin Nutr. Suppl* 1 de 51 ,pp. S17-9, 1997.

29. Szabo T, Nemeth J, Dekany I. **Zinc oxide nanoparticles incorporated in ultrathin layer silicate films and their photocatalytic properties.** *Coll Surf A*;230:23-35, 2003.

30. SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K.M.; MULLER S.; LATHA, L.Y. **Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts.** African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

31. Nowack B, Bucheli TD. **Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment.** ELSEVIER. Environmental Pollution Volume 150, Issue 1, Pages 5–22, November 2007.

32. Nowack B, Bucheli TD. Environ Pollut. 2007. 150(1):5-22.. **Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment.** Environ Pollut.. 150(1):5-22, 2007 .

33. Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A. **ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells.** Toxicol in Vitro. 25(1):231-241. Epub 2010 Nov 17. [Epub ahead of print] doi: 10.1016/j.tiv.2010.11.008, 2011.

34. Wu J, Liu W, Xue C,. **Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure** Toxicol Lett. doi: 10.1016/j.toxlet.2009.05.020. Epub 2009 Jun 6 2009

35. Liu S.;Xu L.;Zhang T.;Ren G.; Yang Z.; **Toxicol Oxidative stress and apoptosis induced by nanosized titanium dioxide in PC12 cells.** Toxicology.; Lett. 2009;191(1):1-8. Epub 2009 Jan 6 267(1-3):172- 177. Epub 2009 Nov14, 2010 .

36. Fent K, Kunz PY, Gomez E. **UV filters in the aquatic environment induce hormonal effects and affect fertility and reproduction in fish. Endocrine disruptors: natural waters and fishes.** Chimia. 62(5):368-375, 2008.

37. National Geographic Website. **Source of half earth's oxygen gets little credit.** Available at: <http://tinyurl.com/724xwhz>. Marinebio Website. Ocean Resources. <http://tinyurl.com/7qaestu>. Acesso em 23 abril 2013.

38. Miao AJ, Zhang XY, Luo Z, et al. **Zinc oxide-engineered nanoparticles: dissolution and toxicity to marine phytoplankton.** *Environ Toxicol Chem*; 29 (12) : 2814-22. Epub Oct7,2010.

39. Kahru A, Dubourguier HC. **From ecotoxicology to nanoecotoxicology. Toxicology.** 2010;269(2-3):105-119. Epub Sep 2, 2009.

40. Xia T, Kovochich M, Liong M, Zink JI, Nel AE. 2008b. **Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways.** *ACS Nano* 2:85–96.

41. Benjamin Weintraub, Zhengzhi Zhou, Yinhua Li and Yulin Deng **Solution synthesis of one-dimensional ZnO nanomaterials and their applications.** *J. Phys. Chem*,2, 1573-1587, 2010.

42. L. Vayssieres, N. Beermann, S. E. Lindquist, A. Hangfedt,.**Controlled aqueous chemical growth of oriented three-dimensional crystalline nanorod arrays.** *Chem. Mat*, 13(2), 233-235., 2001.

43. Baruah, S.; Dutta, J. **Hydrothermal growth of ZnO nanostructure.** *Sci. Technol. Adv. Mater.* 10 013001 18pp, 2009.

44. TIAGO,F.; WAYNE,R.; **ImageJ User Guide.** 2nd Oct. 2012 <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/intro.html>, Acesso em 17ago 2013

45. Moulahi, A.; Sediri, F.; Gharbi, N.; **Hydrothermal synthesis of nanostructured zinc oxide and study of their optical properties.** *Mater. Res. Bull.* 47, 667-671, 2012.

46. Wang, R. C.; Liu, C. P.; Huang, J. L.; Chen, S. J.; **“ZnO symmetric nanosheets integrated with nanowalls,”** Appl. Phys. Lett. 87, 053103, 2005.
47. D. L. Wood , J. Tauc, **Phys. Rev. B-Solid State** 5, 8,3144-3152, 1972.
48. Wen, F.; Li, W.; Moon, J. H.; Kim, J. H.; **“Hydrothermal synthesis of ZnO : Zn with green emission at low temperature with reduction process,”**Solid State Commun. 135, 34-37 2005.
49. Yu, W.; Li, X.; Gao, X.; **Cryst. Growth Des.** 5 (1), 151-155.2005.
50. Fan, H. J.; Scholz, R.; Kolb, F. M.; Zacharias, M.; **Two-dimensional dendritic ZnO nanowires from oxidation of Zn microcrystals..** Appl. Phys. Lett. 85, 4142-4144,2004.
51. Göpel, W.; Lampe, U.; **“Influence of Defects on the Electronic Structure of Zinc Oxide Surfaces”** Phys. Rev. B 22, 6447-6462,1980.
52. Hughes, W. L.; Wang, Z. L. J. **"Formation of Piezoelectric Single-Crystal Nanorings and Nanobows"** Am. Chem. Soc., 126, 6703,2004.
53. X. Wang, Q. Zhang, Q. Wan, G. Dai, C. Zhou, B. Zou, **“Controllable ZnO architectures by ethanolamine-assisted hydrothermal reaction for enhanced photocatalytic activity,”** J. Phys. Chem. C, 115 (6), 2769-2775. 2011.
54. R. C. Wang, C. P. Liu, J. L. Huang, S. J. Chen,. **“ZnO symmetric nanosheets integrated with nanowalls,”** Appl. Phys. Lett., 87, 053103,2005.

55. X. Q. Meng, D. Z. Shen, J. Y. Zhang, D. X. Zhao, Y. M. Lu, L. Dong, Z. Z. Zhang, Y. C. Liu, X. W. Fan,. **The structural and optical properties of ZnO nanorod arrays.** Solid State Commun. 135, 179-182, 2005.
56. H. T. Ng, B. Chen, J. Li, J. Han, M. Meyyappan,. **“Optical properties of single-crystalline ZnO nanowires on m-sapphire,”** Appl. Phys. Lett. 82, 2023-2025, 2003.
57. Q. Yang, K. Tang, J. Zuo, Y. Qian, **Synthesis and luminescent property of single-crystal ZnO nanobelts by a simple low temperature evaporation route.** Appl. Phys. A, 79, 1847-1851, 2004.
58. B. Lin, Z. Fu, Y. Jia, **"Green luminescent center in undoped zinc oxide films deposited on silicon substrates".**Appl. Phys. Lett., **79**, 943-947, 2001.
59. X. Liu, X. Wu, H. Cao, R. P. H. Chang, **"Growth mechanism and properties of ZnO nanorods synthesized by plasma-enhanced chemical vapor deposition,"** J. Appl. Phys. 95, 3141-3147, 2004.
60. Cunha, D. M ; Souza, Flavio L. . **Facile synthetic route for producing one-dimensional zinc oxide nanoflowers and characterization of their optical properties.** Journal of Alloys and Compounds, v. 577, p. 158-164, 2013.
61. Malvern, **Zetasizer International Trade Marks owned by Malvern Instruments Ltd.** detailed specification from www.malvern.com/zetasizernano. Acesso em 17 Maio 2012.
62. T. Ami, M. Suzuki, **MOCVD growth of (100)-oriented CeO₂ thin films on hydrogen-terminated Si(100) substrates.** Mater. Sci. Eng. B 54 (1–2) 84–91, 1998.

63. Kresse, G. and Joubert, D. Blöchl, P. E. **From ultrasoft pseudopotentials to the projector augmented-wave method** *Phys. Rev. B* 59, 1758 (1999); *Phys. Rev. B* 50, 17953, 1994.
64. CULLITY, B. D.; STOCK, S. R.; **Elements of X-Ray diffraction**. 3 ed. New York: Prentice Hall, 2001.
65. Callister Jr., William D.; Callister Jr., William D. / LTC **Ciência Engenharia de Materiais** - Uma Introdução - 8ª Ed. 2012.
66. Rahbari R, Sheahan T, Modes V, Collier P, Macfarlane C, Badge RM. **"A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification"**. *BioTechniques* 46 (4) April 2009.
67. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. **"Estudos sobre a propagação in vitro dos vírus da poliomielite. IV. Multiplicação viral estável numa estirpe de células epiteliais humanas malignas (linhagem HeLa) derivadas de um carcinoma epidermoide do colo"**. *J. Exp. Med.* 97 (5): 695–710. DOI:10.1084/jem.97.5.695. PMID 13052828, May -1953.
68. Capes-Davis A, Theodosopoulos G, Atkin I, Drexler HG, Kohara A, MacLeod RA, Masters JR, Nakamura Y, Reid YA, Reddel RR, Freshney RI. **"Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines"**. *Int. J. Cancer* 127 Capes (1): 1 8. DOI: 10.1002/ijc.25242. PMID 20143388, July - 2010.
69. Batts DW (2010-05-10). ***Cancer cells killed Henrietta Lacks - then made her immortal***. pp. 1, 12–14. *The Virginian - Pilot*. Página visitada em 03-17 - 2012;

70. SERRANO, M. C.; PAGANI, R.; VALLET-REGI, M.; PENA, J.; RAMILA, A.; IZQUIERDO, I.; PORTOLES, M. T. **In vitro biocompatibility assessment of poly (epsilon-caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts.** *Biomaterials*, v.25, n.25, p.5603-5611. 2004.
71. PAN, H.; JIANG, H. L.; CHEN, W. L. **Interaction of dermal fibroblasts with electrospun composite polymer scaffolds prepared from dextran and poly lactide-coglycolide.** *Biomaterials*, v.27, n.17, p.3209-3220. 2006.
72. BAXTER, L. C.; FRAUCHIGER, V.; TEXTOR, M.; AP GWYNN, I.; RICHARDS, R. G. **Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces.** *Eur Cell Mater*, v.4, p.1-17. 2002.
73. BRUNETTE, D. M.; CHEHROUDI, B. **The effects of the surface topography of micromachined titanium substrata on cell behavior in vitro and in vivo.** *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* , v.121, n.1, p.49-57. 1999.
74. RICHARDS, R. G. **The effect of surface roughness on fibroblast adhesion in vitro. Injury-International.** *Journal of the Care of the Injured*, v.27, p.38-43. 1996.
75. VERRIER, S.; BAREILLE, R.; ROVIRA, A.; DARD, M.; AMEDEE, J. **Human osteoprogenitor responses to orthopaedic implant: Mechanism of cell attachment and cell adhesion.** *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v.7, n.1, p.46-51.1996.
76. KUMARI, T. V.; VASUDEV, U.; KUMAR, A.; MENON, B. **Cell surface interactions in the study of biocompatibility.** *Trends in biomaterials and artificial organs*, v.15,n.2, p.37-41. 2002.
77. Freshney R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.** John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 2000.

78. Lee, J. H., Huh, Y. M., Jun, Y. W., Seo, J. W., Jang, J. T., Song, H. T., Kim, S., Cho, E. J., Yoon, H. G., Suh, J. S., *et al.* **Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging.** *Nat. Med.* **13**, 95–99, 2007.
79. Zhang, L., Gu, F. X., Chan, J. M., Wang, A. Z., Langer, R. S., and Farokhzad, O. C. Nanoparticles in medicine: **Therapeutic applications and developments.** *Clin. Pharmacol. Ther.* **83**, 761–770, 2008.
80. Zhang, L. W., Yu, W. W., Colvin, V. L., and Monteiro-Riviere, N. A. **Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **228**, 200, 2008.
81. Cenchao Shen,* Simon A. James,† Martin D. de Jonge,† Terence W. Turney,‡ Paul F. A. Wright,* and Bryce N. **Relating Cytotoxicity, Zinc Ions, and Reactive Oxygen in ZnO Nanoparticle–Exposed Human Immune Cells.** *Environmental toxicology and chemistry* **32**(1), 120–127, 2013. doi:10.1016/j.envtoxic.2012.10.017 Advance Access publication August 31, 2013.
82. Mariappan Premanathan, PhD^{a,b}, Krishnamoorthy Karthikeyan, MTech^{b,c}, Kadarkaraithangam Jeyasubramanian, PhD^b, Govindasamy Manivannan, MPhil^d. **Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation,** 2011.
83. Brunner TJ, Wick P, Manser P, Spohn P, Grass RN, Limbach LK, *et al.* **In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility.** *Environ Sci Technol*;40:4374–81, 2006.
84. Aker WG, Hu XK, Wang P, Hwang HM. **Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish *Ictalurus furcatus*.** *Environ Toxicol*; 23:548–554, 2008.

85. Yonggang Wang a, Winfred G. Aker a, Huey-min Hwang a,*, Clement G. Yedjou a, Hongtao Yu b, Paul B. **A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells.** Tchounwou a Elsevier Science of the Total Environment Received 7 February 2011.
86. X. Li, Y. Xing, Y. Jiang, Y. Ding, W. Li, **Antimicrobial activities of ZnO powdercoatedPVC film to inactivate food pathogens**, Int. J. Food Sci. Technol. 44,2161rticl, 2009.
87. R. Dastjerdi, M. Montazer, **A review on the application of inorganic nanostructuredmaterials in the modification of textiles: Focus on anti-microbialproperties**, Colloid. Surface. B 79 (1) 5. B, 2010.
88. R. Brayner, R. Ferrari-Lliou, N. Brivois, S. Djediat, M.F. Bebedetti, F. Fievet, **Toxicology impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnOnanoparticles colloidal medium**, Nano Lett. 6 , 866 866 2006.
89. K.M. Reddy, K. Feris, J. Bell, D.G. Wingett, C. Hanley, A. **Punnose, Selectivetoxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems**, Appl. Phys. Lett. 90 (213902). 213902-102-121390, 2007.
90. L.L. Zhang, Y.H. Jiang, Y.L. Ding, M. Povey, D. York, **Investigation into theantibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids)**, J. Nanopart. Res. 9,479007, 2007.
91. A. Emamifar, in: A. Hashim (Ed.), **Applications of Antimicrobial PolymerNanocomposites in Food Packaging Advances in Nanocomposite Technology**, Intech, Vienna, pp. 299y,ln, 2011.

92. S.K. Bajpai, N. Chand, V. Chaurasia, **Investigation of water vapor permeability and antimicrobial property of zinc oxide nanoparticles-loaded chitosan-based edible film**, J. Appl. Polym. Sci. 115 (674) 67, 2010.
93. R. Tankhiwale, S.K. Bajpai, **Preparation, characterization and antibacterial coated polyethylene films for food packaging**, Colloid. Surface. B 90,16ynt, 2012.
94. Y. Wang, Q. Zhang, Ch. Zhang, P. Li, **Characterisation and cooperativeantimicrobial properties of chitosan/nano-ZnO composite nanofibrousmembranes**, Food Chem. 132 , 419Chem, 2012.
95. K. Kairyte, Z. Luksiene, **Photoactivated ZnO nanoparticles destroy main foodpathogens Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes ATCL3 C 7644**,Chem. Technol. 3 (61) (322), 2012.
96. L. He, Y. Liu, A. Mustapha, M. Lin, **Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against Botrytis cinerea and Penicillium expansum**, Microbiol. Res. 166 , 207m, M, 2011.
97. H.-L. Liu, T.C.-K. Yang, **Photocatalytic inactivation of Escherichia coli and Lactobacillus helveticus by ZnO and TiO₂ activated with ultraviolet light**, Proc. Biochem. 39 (47503) 2003.
98. M. Premanathan, K. Karthikeyan, K. Jeyasubramanian, G. Manivannan, **Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation**, Nanomedicine: Nanotech, Biol. Med. 7 (2) 184id p, 2011.
99. Kristina Kairyte, Arunas Kadys, Zivile Luksiene. **Antibacterial and antifungal activity of photoactivated ZnO nanoparticles in suspension** ↑ Elsevier 29 July 2013.

100. Serpone N, Emeline AV. **Modelling heterogeneous photocatalysis by metaloxidenanostructured semiconductor and insulator materials: factors that affect the activity and selectivity of photocatalysts.** Res Chem Intermed;31:391–432, 2005.
101. Diffey BL, Grice J. **The influence of sunscreen type on photoprotection.** J Invest Dermatol;137:103–5, 1997.
102. Sachsenmaier C, Radler-Pohl A, Zinck R, Nordheim A, Herrlich P, Rahmsdorf H. **Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response.** Cell;78:963–72, 1994.
103. Akermann ME, Chan WCW, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. **Nanocrystal targeting in vivo.** Proc Natl Acad Sci U S A;99:12617–21, 2002.
104. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: **A nanoparticle in medical application.** Toxicol Lett;176:1–12, 2008.
105. Roberts LK, Beasley DG. **Commercial sunscreen lotions prevent ultraviolet radiation-induced immune suppression of contact hypersensitivity.** J Invest Dermatol;105:339–44, 1995.
106. Rosette C, Karin M. **Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors.** Science;274:1194–7, 1996.
107. Lavker R, Kaidbey K. **The spectral dependence for UVA-induced cumulative damage in human skin.** J Invest Dermatol;108:17–21, 1997.

108. Choquenot B, Couteau C, Paparis E, Coiffard JM. **Quercetin and rutin as potential sunscreen agents: determination of efficacy by an in vitro method.** J Nat Prod;71:1117–8, 2008.
109. Rouse JG, Yang J, Ryman-Rasmussen JP, Barron AR, Monteiro-Riviere NA. **Effect of mechanical flexion on the penetration of fullerene amino acid-derivatized peptide nanoparticles through skin.** Nano Lett;7:155–60, 2007.
110. Mortensen LJ, Oberdorster G, Pentland AP, DeLouise LA. **In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR.** Nano Lett; 8:2779–87, 2008.
111. Heard CP, Kung D, Thomas CP. **Skin penetration enhancement of mefenamic acid by ethanol and 1,8-cineole can be explained by the ‘pull’ effect.** Int J Pharm;321:167–70, 2006.
112. Pierre M, Tedesco AC, Bentley M. **Oleic acid as optimizer of the skin delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy.** Pharm Res;23:360–6, 2006.
113. Masters BR, So PT, Gratton E. **Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin.** Biophys J;72:2405–12, 1997.
114. Masters BR, So PT. **Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin in vivo.** Opt Express;1:2–10, 2001.
115. Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW. **In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons.** Nature;385:161–5, 1997.
116. Gerritsen HC, Grauw CJ. **Imaging of optically thick specimen using two-photon excitation microscopy.** Microsc Res Tech;47:206–9, 1999.

117. Diaspro A. **Introduction to two-photon microscopy.** Microsc Res Tech;47:163–4, 1999.
118. Soeller C, Cannell MB. **Two-photon microscopy: imaging in scattering samples and three-dimensionally resolved flash photolysis.** Microsc Res Tech; 47:182–95, 1999.
119. Denk W, Svoboda K. **Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick.** Neuron;18:351–7, 1997.
120. So PT, Dong CY, Masters BR, Berland KM. **Two-photon excitation fluorescence microscopy.** Annu Rev Biomed Eng; 2:399–429, 2000.
121. Konig K, Riemann I. **High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution.** J Biomed Opt;8:432–9, 2003.
122. Masters BR, So PT, Buehler C, Barry N, Sutin JD, Mantulin WW. **Mitigating thermal mechanical damage potential during two-photon dermal imaging.** J Biomed Opt; 9:1265–70, 2004.
123. Huzaira M, Rius F, Rajadhyaksha M, Anderson RR, Gonzalez S. **Topographic variations in normal skin, as viewed by in vivo reflectance confocal microscopy.** J Invest Dermatol;116:846–52, 2001.
124. Yu B, Dong CY, So PT, Blankschtein D, Langer R. **In vitro visualization and quantification of oleic acid induced changes in transdermal transport using two-photon fluorescence microscopy.** J Invest Dermatol;117:16–25, 2001.

125. Kushner J, Kim D, So PT, Blankschtein D, Langer R. **Dual-channel two-photon microscopy study of transdermal transport in skin treated with low-frequency ultrasound and a chemical enhancer.** J Invest Dermatol;127:2832–46, 2007.
126. Johnson JC, Yan HQ, Schaller RD, Peterson PB, Yang PD, Saykally RJ. **Near-field imaging of nonlinear optical mixing in single zinc oxide nanowires.** Nano Lett;2:279–83, 2002.
127. Neumann U, Grunwald R, Griebner U, Stainmeyer G, Seeber W. **Second harmonic efficiency of ZnO nanolayers.** Appl Phys Lett;84:170, 2004.
128. Tsung-Rong Kuo a, Chung-Long Wu a, Chih-Ting Hsu b, Wen Lo b, Shu-Jen Chiang c, Sung-Jan Lin d,e, Chen-Yuan Dong b,*, Chia-Chun Chen a,c,** **Chemical enhancer induced changes in the mechanisms of transdermal delivery of zinc oxide nanoparticles.** Elsevier Biomaterial 20 February 2009.