

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FERNANDA ELISA ARAB

**Avaliação da atividade antimicrobiana de
nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e
prata em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**

SÃO CARLOS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FERNANDA ELISA ARAB

**Avaliação da atividade antimicrobiana de
nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e
prata em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores:

Dr. Marcos David Ferreira

Dr. Clovis W. Oliveira de Souza

SÃO CARLOS
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Fernanda Elisa Arab, realizada em 28/09/2018:

Prof. Dr. Marcos David Ferreira
EMBRAPA

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
UFSCar

Profa. Dra. Katia Sivieri
UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico à minha família, principalmente aos meus pais e meus irmãos, que sempre foram os meus exemplos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por estar sempre iluminando o meu caminho e abençoando toda a minha família.

Aos meus pais, Arnaldo e Elisa, que sempre me proporcionaram o melhor e nunca desistiram de investir na minha educação apesar de todas as dificuldades. Agradeço por todo amor e apoio.

Aos meus irmãos, Ignácio e Rodrigo, que sempre foram os meus exemplos, agradeço pelos conselhos.

Ao meu noivo, Fábio, por toda cumplicidade, companheirismo, carinho e paciência.

Aos meus orientadores, Marcos David Ferreira e Clóvis Oliveira de Souza, por me acolherem quando eu mais precisei, pela paciência, pelos ensinamentos, pela confiança em mim e por toda oportunidade que me proporcionaram para a realização deste trabalho.

À todos os técnicos da Embrapa, Silviane, Joana, Paulinho, Matteo, Viviane, Adriana, obrigada por toda ajuda, dedicação e contribuição para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório, agradeço ao grupo pós colheita por toda a amizade e acolhimento.

Ao pessoal da Sala 28 da Embrapa, onde fiz grandes amizades, obrigada por todo carinho.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de São Carlos, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) pela oportunidade de desenvolver meu projeto e por toda a infraestrutura proporcionada.

Aos membros da banca examinadora, agradeço de coração por aceitarem o meu convite e por dedicarem um tempo para leitura e por toda contribuição para a melhoria deste trabalho. Obrigada por estarem presente nesse momento importante.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Novas tecnologias de embalagens de alimentos são desenvolvidas como respostas as demandas do consumidor e da produção industrial para comercialização de alimentos mantendo o frescor e o sabor, com prazos de validade prolongados, sem perder a qualidade e a garantia de um alimento seguro. Mudanças nas práticas de varejo e estilo de vida dos consumidores são grandes desafios para a indústria de embalagens na produção dessas inovações na área. O uso de antimicrobianos em embalagens, em especial os óxidos metálicos podem ser eficazes para inibir ou retardar o crescimento de microrganismos, possibilitando assim um maior tempo de prateleira dos alimentos. O objetivo principal desse trabalho foi sintetizar, caracterizar e testar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e prata em bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*). Para a síntese das nanopartículas de ZnO foram realizados os métodos de precipitação e sonoquímica (ultrassom), para as de CuO além destes métodos, realizou-se também a síntese por hidrotermal e para as de Ag por precipitação. A prata, considerada um antimicrobiano universal, foi utilizada como parâmetro de comparação nos estudos, por isso a realização apenas da síntese mais tradicional, por precipitação. As caracterizações realizadas para as nanopartículas foram a Difração de Raios X (DRX), a Espectroscopia na região Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), a Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (FEG) e o Potencial Zeta. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada por meio do teste de difusão em ágar (análise qualitativa) e o teste de agitação em frasco (análise quantitativa). Este último foi realizado para as bactérias que mostraram maior inibição do teste de difusão, *S. aureus* e *E. coli*, e para as sínteses que obtiveram menores nanopartículas, sendo a de ultrassom para ZnO, ultrassom 2 h para CuO e precipitação para Ag. A espessura das nanopartículas (NPs) foram entre 10 a 40 nm. No teste de difusão as ZnONPs mostraram halos de inibição para a bactéria *S. aureus* (12 mm e 14 mm \pm 0,05) e *E. faecalis* (5 mm \pm 0,05); as CuONPs formaram halos para *S. aureus* (6,6 a 9,6 mm \pm 0,05) e levemente para *E. coli* (4,5 a 5,2 mm \pm 0,05); já para as AgNPs, houve a formação de halos de inibição em todas as bactérias, *S. aureus* (12,4 mm \pm 0,05); *E. faecalis* (9,7 mm \pm 0,05); *E. coli* (8,6 mm \pm 0,05) e *Salmonella* (8,1 mm \pm 0,05). Enquanto no teste de agitação em frasco para *S. aureus* as nanopartículas obtiveram uma inibição de aproximadamente 100% em relação ao controle com uma concentração por volta de 200 μ g/ml para CuONPs e AgNPs e a 350 μ g/ml para ZnONPs. Para *E. coli* com a maior concentração estudada para todas as NPs, 500 μ g/ml, foi possível uma inibição por volta de 90% em relação ao controle. A atividade antimicrobiana das nanopartículas utilizadas mostraram maior inibição para as bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas. De acordo com os estudos realizados, as nanopartículas testadas (ZnO, CuO e Ag) mostraram-se como potenciais agentes antimicrobianos. Elas podem ser consideradas de grande importância com o propósito de investir em processos que retardam/inibem o crescimento bacteriano, com potencial de aplicação embalagens antimicrobianas para o armazenamento de alimentos.

Palavras chaves: Bactérias; Embalagens; Nanomateriais; Óxidos metálicos; Potencial antimicrobiano.

ABSTRACT

New food packaging technologies has been developed as responses to the demands of the consumer and industrial production for food marketing maintaining freshness and flavor, with long expiration date, without compromising the quality and guarantee of a safe food. Changes in retail practices and consumer lifestyles are major challenges for the packaging industry in producing these innovations in this area. The use of antimicrobials in packages, in particular metal oxides, can be effective in inhibiting or retarding the growth of microorganisms, thus enabling a longer expiration date of foods. The main objective of this work was to synthesize, characterize and test the antimicrobial activity of zinc oxide, copper oxide and silver nanoparticles in Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*). For the synthesis of ZnO nanoparticles the precipitation and sonochemistry (ultrasound) methods were performed, for CuO, besides these methods, hydrothermal and Ag precipitation were also performed. Silver, considered a universal antimicrobial, was used as a benchmark in the studies, and therefore only the most traditional synthesis (precipitation). The characterizations performed for the nanoparticles were X-Ray Diffraction (XRD), Fourier-transform infrared Spectroscopy (FTIR), Scanning Electron Microscopy with Field Emission Source (FEG) and Zeta Potential. The evaluation of the antimicrobial activity was performed through the agar diffusion test (qualitative analysis) and the bottle agitation test (quantitative analysis). The latter was performed for the bacteria that showed greater inhibition of the diffusion test, *S. aureus* and *E. coli*, and for the syntheses that obtained smaller nanoparticles, being the ultrasound for ZnO, ultrasound 2 h for CuO and precipitation for Ag. The thickness of the nanoparticles (NPs) were between 10 and 40 nm. In the diffusion test the ZnONPs showed inhibition halos for *S. aureus* (12 mm and 14 mm \pm 0,05) and *E. faecalis* (5 mm \pm 0,05); the CuONPs formed halos for *S. aureus* (6.6 to 9.6 mm \pm 0.05) and slightly for *E. coli* (4.5 to 5.2 mm \pm 0.05); for AgNPs, inhibition halos were formed in all bacteria, *S. aureus* (12.4 \pm 0.05); *E. faecalis* (9.7 mm \pm 0.05); *E. coli* (8.6 mm \pm 0.05) and *Salmonella* (8.1 mm \pm 0.05). While in the bottle shake test for *S. aureus* the nanoparticles obtained about 100% inhibition relative to the control at a concentration of about 200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for CuONPs and AgNPs and at 350 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for ZnONPs. For *E. coli* with the highest studied concentration for all NPs, 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$, it was possible an inhibition around 90% related to the control. The antimicrobial activity of the nanoparticles used showed greater inhibition for Gram-positive bacteria compared to Gram-negative bacteria. According to the studies performed, the nanoparticles tested (ZnO, CuO and Ag) were shown to be potential antimicrobial agents. They can be considered of great importance for the purpose of investing in processes that retard / inhibit bacterial growth, with the potential of applying antimicrobial packaging for food storage.

Key Words: Bacteria; Packaging; Nanomaterials; Metallic oxides; Antimicrobial potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de uma escala de comprimento para contextualização de nanomateriais (modificado de GOESMANN e FELDMANN, 2010).	4
Figura 2: Diferentes mecanismos de ação das nanopartículas de ZnO (Fonte: ESPITIA, 2012).	6
Figura 3: Representação esquemática (a) Cu^{2+} ligado ao grupo carboxila e (b) Cu^{2+} ligado ao grupo amina na parede celular bacteriana (Fonte: PANDIYARAJAN et al., 2013).	8
Figura 4: Mecanismos de ação das nanopartículas de prata nas bactérias (Fonte: PRABHU; POULOSE, 2012).	9
Figura 5 : A estrutura de uma célula procariótica. Estruturas marcadas em vermelho são encontradas em todas as bactérias (Fonte: TORTORA et al., 2005, p.80).	11
Figura 6: Morfologia da parede celular de bactérias Gram-positivas (modificado de TORTORA et al., 2005).	12
Figura 7: Morfologia da parede celular de bactérias Gram-negativas (modificado de TORTORA et al., 2005).	13
Figura 8: Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil entre 2000 a 2015 (Fonte: BRASIL, 2015).	17
Figura 9: Etapas da síntese de ZnONPs pelo método de precipitação. A) Solução de KOH e Zn (NO_3) ₂ no agitador. B) Centrifugação da solução após o término da agitação. C) Solução de ZnO e etanol na placa de Petri coberta com o alumínio para ser colocada na estufa. D) Formação de ZnO em pó. E) Desaglomeração do pó no almofariz. F) Amostra guardada em microtubo.	22
Figura 10: Etapas da síntese de ZnONPs pelo método de sonoquímica. A) O béquer contendo a solução de KOH e Zn (NO_3) ₂ após a agitação, foi colocado no ultrassom em banho de gelo por 1h. B) A solução foi transferida para os tubos. C) Centrifugação. D) Solução de ZnO e etanol na placa de Petri. E) Solução coberta com papel alumínio e colocada na estufa. F) Formação de ZnO em pó. G) Desaglomeração do pó no almofariz.	23
Figura 11: Etapas da síntese de CuONPs por precipitação. A) Solução de NaOH e Cu (NO_3) ₂ no agitador. B) A solução foi transferida para tubos Falcon para centrifugar. C) Solução de CuO e etanol na placa de Petri. D) Solução coberta com papel alumínio e colocada na estufa. E) Formação de pó da amostra. F) Maceração do pó no almofariz. G)	

Formação de CuO após retirar da mufla. H) Desaglomeração da amostra no almofariz.
..... 25

Figura 12: Etapas da síntese de CuONPs pelo hidrotermal. A) Solução de NaOH e Cu (NO₃)₂ no agitador. B) A solução foi transferida para o tubo de teflon. C) Suporte do hidrotermal com o tubo de teflon no interior e sobre o agitador. D) Centrifugação após o término da síntese no hidrotermal. E) O precipitado escuro formado no fundo do tubo após o descarte do sobrenadante. F) A suspensão de etanol e CuO foi transferida para uma placa de Petri. G) Formação de CuO após retirar da estufa. 26

Figura 13: Etapas da síntese de CuONPs pelo método de sonoquímica. A) Solução de NaOH e Cu (NO₃)₂ no agitador. B) O béquer contendo a solução anterior após a agitação, foi colocado no ultrassom em banho de gelo por 3h. C) O béquer com coloração escura foi retirado do ultrassom para posterior centrifugação da solução. D) O precipitado escuro formado no fundo do tubo após o descarte do sobrenadante. E) A suspensão de etanol e CuO foi transferida para uma placa de Petri. F) Formação de CuO após retirar da estufa. G) Desaglomeração da amostra no almofariz. H) A amostra foi transferida para um microtubo..... 27

Figura 14: Etapas da síntese de AgNPs pelo método de precipitação. A) Solução de citrato de sódio em agitação. B) Deposição de nitrato de prata e sílica na solução anterior. C) Filtração a vácuo da solução formada. 28

Figura 15: Teste de difusão em ágar realizado para as bactérias *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *Salmonella*. Ilustração das seguintes etapas: Repique e inoculação da bactéria; leitura da absorvância e ajuste para uma concentração de 10⁵ UFC/ml; 100 µL da amostra diluída colocados na placa de Petri com meio MH e espalhados com a alça de Drigalski; deposição das nanopartículas e incubação; por fim, a medição do diâmetro dos halos de inibição com auxílio do paquímetro. 31

Figura 16: Segundo e terceiro dia do teste de agitação em frasco realizado para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. No segundo dia foram acrescentados aos frascos com o meio TSB, já preparados no primeiro dia, 100 µl da suspensão bacteriana e as nanopartículas; em seguida os frascos ficaram sob agitação a 165 rpm, 35°C por 24 horas. No terceiro dia as amostras que estavam em agitação foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato; em sequência foi realizada a técnica de pour plate. 33

Figura 17: Últimas etapas do teste de agitação em frasco. No final do terceiro dia após o meio solidificar as placas invertidas foram incubadas a 35°C por 24 horas. No quarto dia foi realizado a contagem das colônias nas placas com auxílio do contador de colônias.33

Figura 18: Difrátogramas de raios X das amostras de ZnO sintetizadas pelo método de precipitação e por ultrassom. Os valores entre parênteses correspondem aos planos pertencentes aos ângulos de difração. O asterisco se refere aos planos que foram repetidos nas duas sínteses.	35
Figura 19: Síntese por precipitação de ZnONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.	37
Figura 20: Síntese por ultrassom de ZnONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.	37
Figura 21: Imagem dos espectros de ZnO obtidos pela espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR), para a síntese 1 (precipitação) e síntese 2 (ultrassom).	38
Figura 22: Difrátogramas de raios X das amostras de CuO que foram sintetizadas por 3 métodos diferentes (Precipitação, Hidrotermal, Ultrassom). Os valores entre parênteses correspondem aos planos pertencentes aos ângulos de difração. O asterisco se refere aos planos que foram repetidos nas duas sínteses.	40
Figura 23: Síntese por precipitação de CuONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.	41
Figura 24: Síntese por hidrotermal de CuONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.	41
Figura 25: Síntese por ultrassom (3 h) de CuONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.	41
Figura 26: Síntese por ultrassom (2 h) de CuONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.	42
Figura 27: Imagem dos espectros de CuO obtidos pela espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR) sintetizadas por 3 métodos diferentes (Precipitação, Hidrotermal, Ultrassom).	43
Figura 28: Difrátograma de raio X da amostra de Ag sintetizada pelo método de precipitação. Os valores entre parênteses correspondem aos planos pertencentes aos ângulos de difração.	44
Figura 29: Síntese por precipitação de AgNPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.	45
Figura 30: Imagem dos espectros de Ag obtidos pela espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR).	46
Figura 31: Teste do halo de inibição para a síntese 1 das ZnONPs (precipitação), evidenciando a formação do halo para bactérias <i>S. aureus</i>	48

Figura 32: Teste do halo de inibição para a síntese 2 das ZnONPs (ultrassom), evidenciando a formação do halo para bactéria <i>S. aureus</i> e para <i>E. faecalis</i>	48
Figura 33: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria <i>S. aureus</i> em relação ao controle nas diferentes concentrações de ZnONPs utilizadas no experimento.	51
Figura 34: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria <i>E. coli</i> em relação ao controle nas diferentes concentrações de ZnONPs utilizadas no experimento.	53
Figura 35: Teste do halo de inibição para a síntese 1 das CuONPs (precipitação), evidenciando a formação do halo para a bactéria <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i>	55
Figura 36: Teste do halo de inibição para a síntese 2 das CuONPs (hidrotermal), evidenciando a formação do halo para a bactéria <i>S. aureus</i> e <i>E. faecalis</i>	55
Figura 37: Teste do halo de inibição para a síntese 3 das CuONPs (ultrassom 3 h), evidenciando a formação do halo para a bactéria <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> e para <i>E. coli</i> . .	56
Figura 38: Teste do halo de inibição para a síntese 4 das CuONPs (ultrassom 2 h), evidenciando a formação do halo para a bactéria <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i>	56
Figura 39: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria <i>S. aureus</i> em relação ao controle nas diferentes concentrações de ZnONPs utilizadas no experimento.	58
Figura 40: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria <i>E. coli</i> em relação ao controle nas diferentes concentrações de CuONPs utilizadas no experimento.	59
Figura 41: Teste do halo de inibição para a síntese de AgNPs, evidenciando a formação do halo de inibição para a as bactérias Gram-positivas (azul) e para as bactérias Gram-negativas (vermelho).	60
Figura 42: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria <i>S. aureus</i> em relação ao controle nas diferentes concentrações de AgNPs utilizadas no experimento.	62
Figura 43: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria <i>E. coli</i> em relação ao controle nas diferentes concentrações de AgNPs utilizadas no experimento.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atribuição das bandas provenientes do FTIR das sínteses de ZnONPs.....	38
Tabela 2: Média dos valores e o desvio padrão do Potencial Zeta (mV) obtidos em ambas as sínteses de ZnONPs.....	39
Tabela 3: Atribuição das bandas provenientes do FTIR das sínteses de CuONPs.....	43
Tabela 4: Média dos valores do Potencial Zeta obtidos em todas as sínteses de CuONPs.	43
Tabela 5: Atribuição das bandas provenientes do FTIR da síntese de AgNPs.	46
Tabela 6: Média dos diâmetros (mm) dos halos de inibição das sínteses de ZnONPs. O símbolo (-) significa ausência (não foi possível visualizar).	49
Tabela 7: Média dos diâmetros (mm) dos halos de inibição das sínteses de CuONPs. O símbolo (-) significa ausência (não foi possível visualizar).	57
Tabela 8: Média dos diâmetros (mm) dos halos de inibição da síntese de AgNPs.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS E SÍMBOLOS

CuO – Óxido de cobre	Zn (NO₃)₂ - Nitrato de zinco
CuONPs – Nanopartículas de óxido de cobre	°C – Graus celsius
Cu (NO₃)₂ - Nitrato de cobre	% - Porcentagem
DRX - Difração de Raios X	μL – Microlitro
DTA - Doenças transmitidas por alimentos	μg – Micrograma
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária	
FEG - <i>Field Emission Gun</i> – Fonte de Emissão de Campo	
FTIR - Espectroscopia na região Infravermelho com Transformada de Fourier	
g - Grama	
GRAS - <i>Generally Recognized As Safe</i> – Geralmente reconhecido como seguro	
h - Horas	
HUS - Síndrome hemolítica-urêmica	
KOH - Hidróxido de potássio	
LPS – Lipopolissacarídeos	
M - Molar	
m - Metro	
mg – Miligrama	
min - Minuto	
ml – Mililitro	
mV - Milivolt	
NaOH - Hidróxido de sódio	
nm – Nanômetro	
NPs – Nanopartículas	
PCA – <i>Plate Count Agar</i>	
ROS – <i>Reactive Oxidative Species</i>	
RPM – Rotações por minuto	
TSB – <i>Tryptic Soy Broth</i>	
UFC – Unidades formadoras de colônias	
UV vis - Ultravioleta – visível	
ZnO – Óxido de zinco	
ZnONPs – Nanopartículas de óxido de zinco	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Nanotecnologia e Nanopartículas.....	3
2.1.1 Óxido de Zinco.....	5
2.1.2 Óxido de cobre	7
2.1.3 Prata	8
2.2 Morfologia Bacteriana.....	9
2.2.1 Morfologia bacteriana de Gram-positivas e Gram-negativas	10
2.3 Alimentos: Contaminação bacteriana	15
2.4 Embalagens de alimentos	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Rotas das sínteses das nanopartículas	20
4.1.1 Sínteses de nanopartículas de óxido de zinco.....	20
4.1.2 Sínteses de nanopartículas de óxido de cobre.....	23
4.1.3 Sínteses de nanopartículas de prata	27
4.2 Técnicas de caracterização das nanopartículas	28
4.2.1 Difração de Raios X (DRX).....	28
4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	29
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG)	29
4.2.4 Potencial Zeta	29
4.3 Atividade antimicrobiana	30
4.3.1 Teste de difusão em ágar	30
4.3.2 Teste de agitação em frasco.....	31
4.4 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 Caracterizações das nanopartículas.....	35
5.1.1 Nanopartículas de ZnO.....	35
5.1.2 Nanopartículas de CuO.....	39
5.1.3 Nanopartículas de Ag	43
5.2 Atividade antimicrobiana	46
5.2.1 Nanopartículas de ZnO.....	46
5.2.2 Nanopartículas de CuO.....	53

5.2.3 Nanopartículas de Ag	59
6 CONCLUSÃO	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O mercado para o desenvolvimento de novas tecnologias de embalagens de alimentos está voltado para as demandas do consumidor e tendências da produção industrial, com o objetivo da comercialização de alimentos com prazos de validade prolongados, sem perder a qualidade e a segurança alimentar. Mudanças nas práticas de varejo e estilo de vida dos consumidores são grandes desafios para a indústria de embalagens na produção dessas inovações na área (CHA e CHINNAN, 2004; DAINELLI et al., 2008). (LACOSTE et al., 2005; ASSIS, 2012).

Durante o transporte e armazenamento, os alimentos são expostos a condições que podem alterar sua qualidade. A causa mais comum de sua deterioração é o crescimento de microrganismos na superfície dos alimentos (ORTS et al., 2005). O crescimento microbiano pode ser controlado por meio da incorporação de agentes antimicrobianos nas embalagens, como exemplo, a incorporação de nanopartículas em filmes.

O uso da nanotecnologia como alternativa na manutenção da qualidade e incremento da vida útil dos alimentos é promissor, em especial com a utilização de embalagens ativas (AZEVEDO, 2012).

Em sua grande maioria, materiais inorgânicos antibacterianos são nanopartículas metálicas e nanopartículas de óxidos metálicos, como prata, óxido de cobre e óxido de zinco (ESPITIA et al., 2012).

O efeito bactericida das nanopartículas metálicas tem sido relacionado ao seu pequeno tamanho, elevada relação superfície / volume, permitindo interagir com as membranas microbianas. Os primeiros relatos do óxido de zinco (ZnO) como agente antimicrobiano começaram na década de 1950, sendo atualmente um dos cinco compostos de zinco reconhecido como seguro pela *U.S. Food and Drug Administration*. O óxido de zinco é um antimicrobiano promissor devido à sua atividade contra uma vasta gama de microrganismos (ESPITIA et al., 2012). Estudos com nanopartículas de óxido de cobre (CuO) mostraram-se favoráveis como agentes bactericidas (RUPARELIA et al., 2008). As propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata são consideradas universais devido há muitas pesquisas na área (DURAN et al., 2016). Vale ressaltar, no entanto, o risco de exposição dos consumidores à migração de nanopartículas para os alimentos (BECARO et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o de sintetizar nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e prata, caracterizá-las estruturalmente e

morfologicamente e avaliar o potencial antimicrobiano de cada uma delas contra bactérias consideradas potenciais patógenos, dentre elas Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*), com o propósito de investir em processos que retardam/inibam o crescimento de microrganismos em alimentos, como por exemplo o desenvolvimento de embalagens antimicrobianas com essas nanopartículas. Dentre as principais contribuições desse desenvolvimento estão as estratégias nanotecnológicas para melhorar a conservação de frutas e hortaliças, aumentando a vida útil dos alimentos; assegurar a qualidade do produto; minimizar perdas de alimentos; melhorar a aparência; aumentar a comercialização devido um consumidor mais satisfeito e assim proporcionar ganhos para a cadeia produtiva e de consumo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnologia e Nanopartículas

A nanotecnologia oferece abordagens únicas para controlar uma ampla variedade de processos biológicos e médicos que ocorrem em um comprimento de nanômetro e acredita-se ter um impacto bem-sucedido na biologia e medicina (ZANDONELLA, 2003). O campo da nanotecnologia é uma das áreas de pesquisa mais ativas na ciência moderna dos materiais (YOUSEF; DANIAL, 2012). Esta tecnologia é capaz de fornecer diversas aplicações inovadoras que vão desde compostos de tecido inovadores, processamento de alimentos e produção agrícola até técnicas medicinais sofisticadas (SAHOO, 2010).

O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro, ou seja, é uma área da ciência relacionada à aplicação de partículas ou interfaces com ao menos uma dimensão na escala de 1 a 100 nm (1 nm é correspondente a 10^{-9} m). A faixa correspondente aos nanomateriais é a mesma em que se encontram algumas moléculas, como a hemoglobina, e estão a uma escala inferior as dimensões celulares, como por exemplo, a bactéria *Escherichia coli* (Figura 1). Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas não encontradas na escala macro (CHAU et al., 2007; GOESMANN; FELDMANN, 2010; SAHOO et al., 2007).

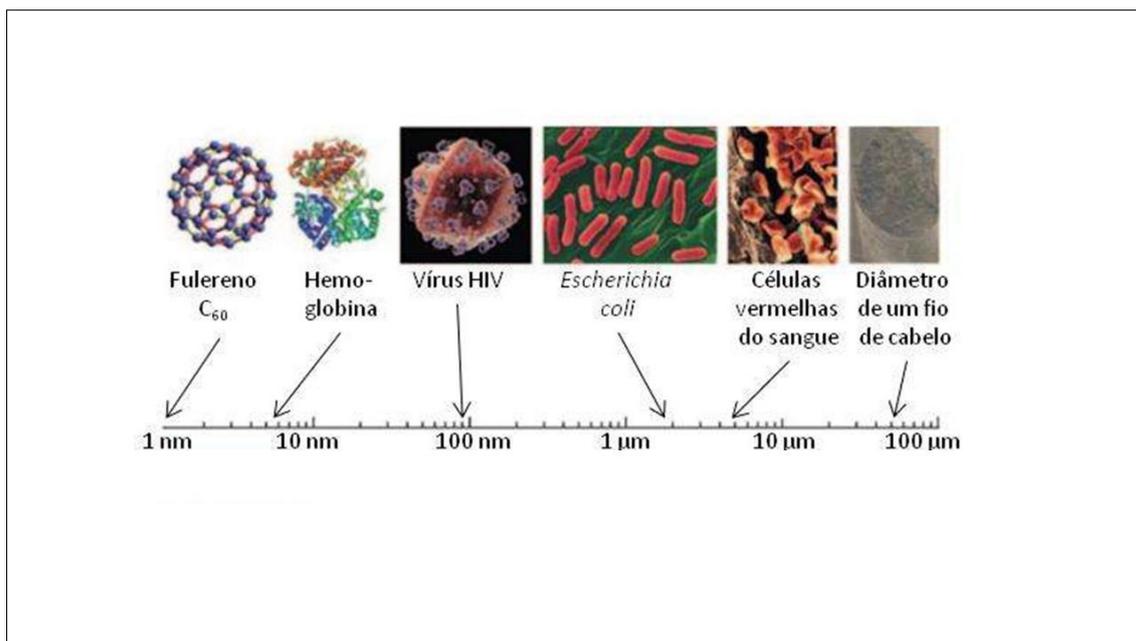


Figura 1: Representação de uma escala de comprimento para contextualização de nanomateriais (modificado de GOESMANN e FELDMANN, 2010).

O advento desta área de pesquisa proporcionou muitas oportunidades para o desenvolvimento de materiais com novas propriedades para o uso como agentes antimicrobianos. Ao longo da última década percebeu-se um aumento no interesse em materiais inorgânicos com tamanhos na escala nano. Estes materiais apresentam forte atividade antibacteriana em baixas concentrações devido à sua alta relação superfície / volume (RAI et al., 2009). Eles também são mais estáveis em condições extremas, como altas temperaturas e pressões (SAWAI, 2003). A maioria dos materiais inorgânicos antibacterianos são nanopartículas metálicas e nanopartículas de óxidos metálicos como óxido de cobre, óxido de titânio e óxido de zinco (ESPITIA et al., 2012).

Nanopartículas (NPs) de óxidos metálicos representam uma nova classe de materiais importantes que estão cada vez mais desenvolvidos para uso em pesquisas e aplicações relacionadas à saúde. Vários estudos no campo da nanotecnologia, particularmente em relação a capacidade do desenvolvimento de materiais nanoparticulados, voltaram-se para o uso destes materiais como agentes bactericidas eficazes (JONES et al., 2008). As nanopartículas exibem propriedades completamente novas ou melhoradas com base em características específicas, como tamanho, distribuição e morfologia (JAIN et al., 2009).

O tamanho reduzido da nanopartícula pode modificar suas características químicas, mecânicas, propriedades elétricas, estruturais, morfológicas e ópticas. Esses recursos modificados permitem que as NPs interajam em uma maneira única com biomoléculas celulares e, assim, facilitar a transferência física de NPs nas estruturas celulares internas (RASMUSSEN et al., 2010).

A prevenção e o controle de doenças bacterianas são de extrema importância, principalmente devido a capacidade das bactérias de desenvolver resistência aos agentes antimicrobianos. No entanto, estudos estão sendo voltados para o desenvolvimento de agentes com maior potencial antimicrobiano, como as nanopartículas de óxido metálico, para controlar a proliferação bacteriana (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008; REDDY et al., 2014).

2.1.1 Óxido de Zinco

O óxido de zinco (ZnO) é um composto inorgânico, muito utilizado em aplicações cotidianas. Atualmente é um material reconhecido como seguro (GRAS- *Generally Recognized As Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA, 2011). Como um aditivo alimentar, é a fonte de zinco mais comumente utilizada na fortificação de alimentos à base de cereais (XIE et al., 2011). A chegada da era da nanotecnologia impulsionou o desenvolvimento de materiais com novas propriedades para uso como agentes antimicrobianos. O ZnO como nanomaterial mostrou propriedades antimicrobianas e aplicações potenciais em preservação de alimentos (ESPITIA et al., 2012).

Devido às suas propriedades antimicrobianas, o ZnO foi incorporado aos revestimentos de latas de alimentos, em embalagens para carne, peixe, milho e ervilhas para preservar as cores e evitar a deterioração (XIE et al., 2011).

No início da década de 1950 iniciaram-se os estudos relacionados ao efeito antimicrobiano do ZnO. Mas somente em 1995 o uso do ZnO como agente antimicrobiano foi evidenciado, período em que Sawai e colaboradores descobriram que alguns compostos, como MgO, CaO e ZnO apresentaram atividades antimicrobianas contra algumas cepas bacterianas (SAWAI, 2003; SAWAI et al., 1997; SAWAI et al., 1998).

A atividade antibacteriana de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) recebeu interesse significativo em todo o mundo, em particular pela implementação da nanotecnologia para sintetizar partículas na região do nanômetro. ZnO é um material bio-seguro que possui ações foto-oxidante e fotocatalítica em espécies químicas e biológicas (SIRELKHATIM et al., 2015).

O exato mecanismo de ação das nanopartículas de ZnO ainda não é totalmente compreendido (Figura 2). Porém, a atividade antimicrobiana dessas NPs é atribuída a vários mecanismos, como: a liberação de íons antimicrobianos; a interação das NPs com o microrganismo danificando a integridade da célula bacteriana e a formação de radicais livres ROS (*Reactive Oxidative Species*- espécies reativas de oxigênio) pelo efeito da radiação, como o ânion superóxido - O_2^- e radical hidroxila - OH^\cdot (JALAL et al., 2010; KASEMETS et al., 2009; ZHANG et al., 2008).

As atividades funcionais (químicas, catalíticas ou biológicas) das nanopartículas são fortemente influenciadas pelo tamanho das partículas (LEWIS; KLIBANOV, 2005; ROSI; MIRKIN, 2005). Os possíveis mecanismos antimicrobianos das suspensões de partículas de ZnO são: mecanismo físico, anexando-se às paredes celulares bacterianas diretamente, mecanismo biológico ao interagir com os componentes da parede celular e mecanismo químico produzindo espécies reativas de oxigênio (ZHANG et al., 2007).

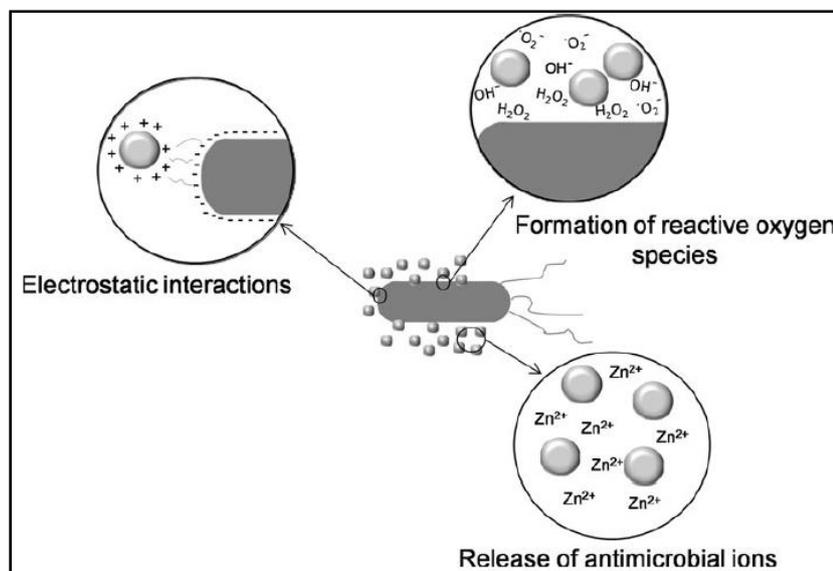


Figura 2: Diferentes mecanismos de ação das nanopartículas de ZnO (Fonte: ESPITIA, 2012).

2.1.2 Óxido de cobre

O óxido de cobre (CuO) (óxido de cobre (II) ou óxido cúprico) é um semicondutor composto com uma estrutura monoclínica. CuO atraiu atenção particular porque é o membro mais simples da família de compostos de cobre e exibe uma gama de propriedades físicas, como a supercondutividade de alta temperatura, efeitos de correlação eletrônica e dinâmica de rotação (AHAMED et al., 2014; CAVA, 1990; TRANQUADA et al., 1995).

O CuO é mais barato que a prata, facilmente misturado com polímeros e relativamente estáveis tanto em termos químicos quanto físicos (REN et al., 2009). Óxidos metálicos nanoparticulados altamente iônicos, como CuO, podem ser agentes antimicrobianos particularmente valiosos (STOIMENOV et al., 2002). Este é um dos óxidos de metais de transição importantes devido à sua ação fotocatalizadora, além disso costuma ser usado em várias aplicações tecnológicas, como supercondutores de alta temperatura crítica (AZAM et al., 2012b).

Os mecanismos de ação das nanopartículas dependem da composição, modificação da superfície, propriedades intrínsecas e das espécies bacterianas. As atividades antibacterianas das NPs dependem de dois fatores: propriedades físico-químicas das nanopartículas e tipos de bactérias (HARIKUMAR; ARAVIND, 2016).

As nanopartículas de CuO têm sido anexadas com maior facilidade devido a presenças de grupos amina e carboxila na superfície celular de algumas bactérias, principalmente as Gram-positivas, e a maior afinidade do cobre a esses grupos (Figura 3) A ligação do Cu^{2+} com a parede celular bacteriana conduz a alterações químicas ocasionando danos e rupturas, facilitando assim a entrada das nanopartículas (PANDIYARAJAN et al., 2013).

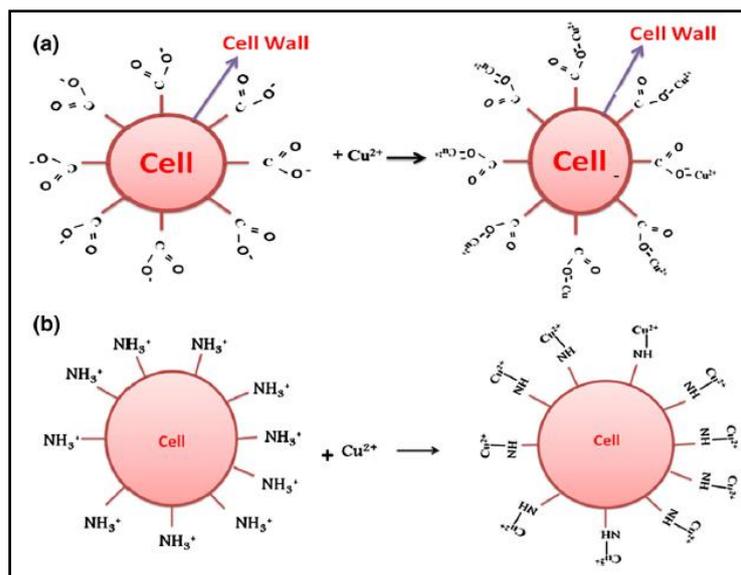


Figura 3: Representação esquemática (a) Cu^{2+} ligado ao grupo carboxila e (b) Cu^{2+} ligado ao grupo amina na parede celular bacteriana (Fonte: PANDIYARAJAN et al., 2013).

2.1.3 Prata

A prata pode ser considerada como uma das substâncias antimicrobianas universais. O uso na nanotecnologia permite a expansão de sua área de superfície, otimizando o seu modo de ação (SONG et al., 2006). O interesse por este metal se encontra em suas características intrínsecas, como estabilidade química, condutividade elétrica e alta atividade catalítica, assim como as características referentes às NPs (NETO, 2010). As nanopartículas de prata (AgNPs) possuem ação antimicrobiana, intervindo no crescimento microbiano com aplicação na área das ciências médicas, química, biológicas, farmacêuticas, e com potencialidade de aplicação em diversos produtos (DURÁN et al., 2007; DURÁN et al., 2010). Quando aplicadas em um polímero, as AgNPs podem melhorar as propriedades das embalagens, promovendo maior flexibilidade das embalagens, durabilidade e estabilidade à temperatura (AUGUSTIN e SANGUANSRI, 2009; CHAUDHRY e CASTLE, 2011).

A ação bactericida da prata cobre uma ampla gama de microrganismos, como bactérias Gram positivas e negativas, dentre elas, *E. coli*; *S. aureus*; *E. fucium*; *Tuberculosis*; *S. pneumoniae* e *V. cholera* (KIM et al., 2007; NETO, 2010).

Apesar do mecanismo exato que as nanopartículas empregam nas bactérias não ser claramente conhecido este é um tópico bastante debatido. No entanto existem algumas

teorias sobre os mecanismos de ação das AgNPs para causar o efeito antimicrobiano (PRABHU; POULOSE, 2012).

As nanopartículas de prata têm a capacidade de ancorar às paredes celulares das bactérias e posteriormente penetrá-la, causando assim mudanças estruturais na membrana como a permeabilidade e interações com as bases do DNA. Há a formação de poços na superfície celular e acumulação das nanopartículas (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004). Um outro mecanismo considerado é a formação de radicais livres ROS pelas NPs quando em contato com a bactéria, danificando a parede e ao interagir com a cadeia respiratória pode ocasionar a distribuição da célula (DANILCAUK et al., 2006; KIM et al., 2007). Outro mecanismo proposto é a liberação de íons de prata (carga positiva) e seu acúmulo na parede celular que são atraídos eletrostaticamente pelas cargas negativas presentes na membrana celular, esses íons interagem com as enzimas bacterianas, inativando-as (MATSUMURA et al., 2003) (Figura 4).

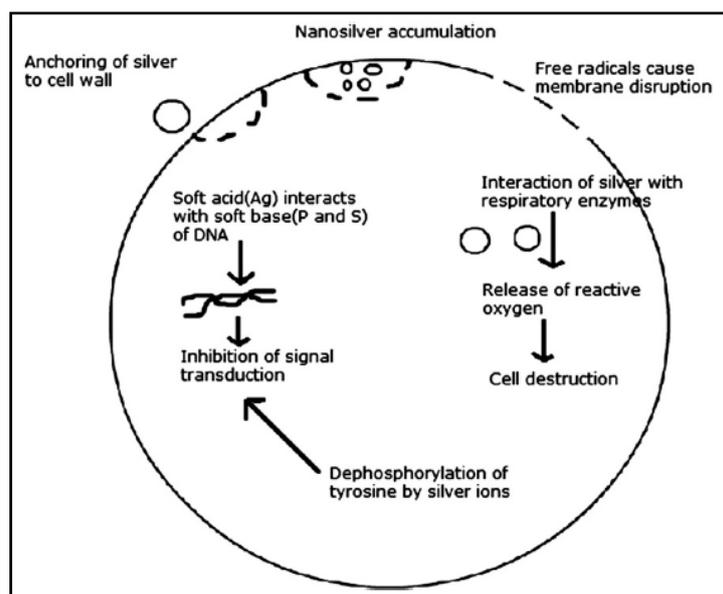


Figura 4: Mecanismos de ação das nanopartículas de prata nas bactérias (Fonte: PRABHU; POULOSE, 2012).

2.2 Morfologia Bacteriana

As bactérias são organismos simples e unicelulares. Elas fazem parte do grupo de organismos conhecidos como procariotos, ou seja, seu material genético não é envolto

por uma membrana nuclear. As células bacterianas apresentam várias formas, dentre as mais comuns estão os *bacilos* (em forma de bastão), os *cocos* (esféricos ou ovóides) e os *espirilos* (em forma de saca rolha ou curvados). As bactérias podem ser encontradas de forma isolada ou em arranjos diferentes de várias células (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Esses organismos se reproduzem por *fissão binária*, ou seja, por divisão em duas células iguais. Em relação a sua nutrição, algumas bactérias podem produzir seu próprio alimento através da fotossíntese, ou obter a partir de compostos inorgânicos ou orgânicos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

As alterações químicas prejudiciais estão dentre as interações que os microrganismos têm com os alimentos, ocasionando variações na qualidade e nos atributos nutricionais e sensoriais. Esses fatores são resultantes da atividade metabólica dos microrganismos que utilizam os alimentos como fonte de energia. Todavia, esta interação além de prejudicar a qualidade do alimento, pode apresentar um risco ao consumidor (ESPITIA; BATISTA, 2016).

A contaminação de alimentos por bactérias geralmente é proporcionada por más condições higiênicas sanitárias, podendo ocorrer em diversos momentos, desde a produção, o armazenamento e transporte, até o manuseio doméstico, causando as doenças transmitidas por alimentos, mais conhecidas como DTAs - Doenças Transmitidas por Alimentos (ESPITIA; BATISTA, 2016; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

2.2.1 Morfologia bacteriana de Gram-positivas e Gram-negativas

A parede celular da célula bacteriana é uma estrutura complexa e semirrígida, sendo responsável pela forma da célula. Esta parede circunda a membrana plasmática funcionando como proteção a alterações no meio externo, prevenindo a ruptura das células bacterianas. A membrana plasmática é constituída de uma dupla camada de fosfolípídeos, além de manter o material citoplasmático no interior da célula, atua como uma barreira seletiva, ou seja, permitindo ou bloqueando a passagem de moléculas e íons (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Algumas estruturas como citoplasma, ribossomos, membrana plasmática e nucleóide contendo o DNA (material genético disperso no citoplasma) são visualizadas

em todas as bactérias. As demais estruturas como ilustradas na Figura 5 variam entre os microrganismos procariontes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

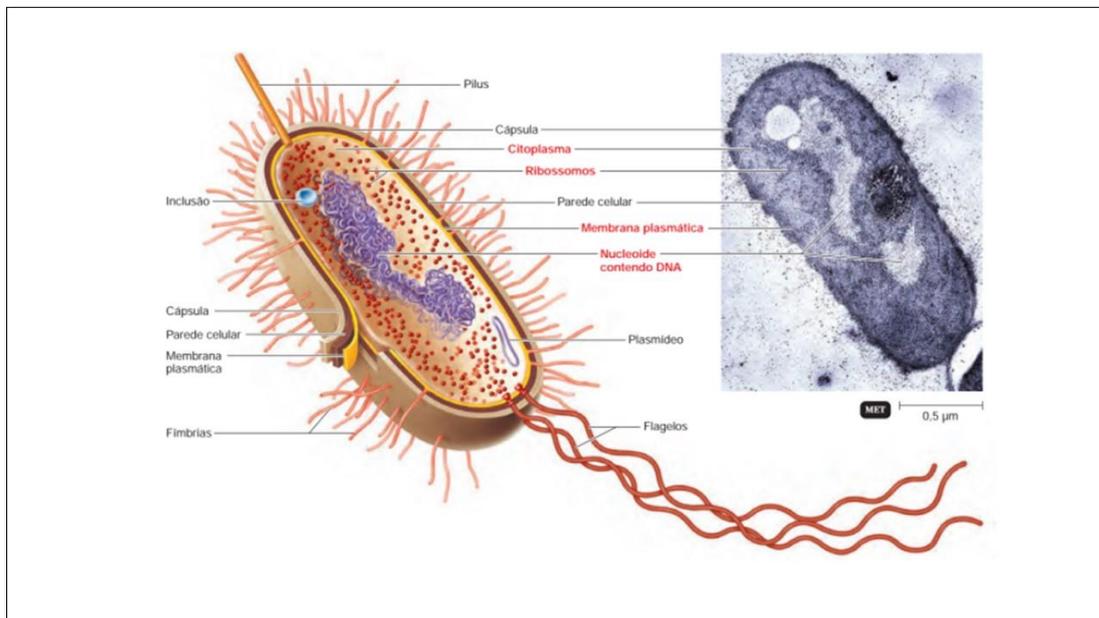


Figura 5 : A estrutura de uma célula procariótica. Estruturas marcadas em vermelho são encontradas em todas as bactérias (Fonte: TORTORA et al., 2005, p.80).

Devido as diferenças na constituição da parede celular, as bactérias são classificadas em Gram-positivas, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, e Gram-negativas, como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Bactérias Gram-positivas e as Gram-negativas apresentam parede celular com composição química semelhante, denominada peptídeoglicana, que consiste em um dissacarídeo repetitivo, composto por monossacarídeos (N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico) unidos por polipeptídeos, formando uma rede que envolve a célula (MADIGAN et al., 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Todavia, na maioria das bactérias Gram-positivas, a parede celular consiste em muitas camadas de peptídeoglicanos (cerca de 90 %), formando uma estrutura espessa e rígida, como ilustrado da Figura 6. Além disso, as paredes celulares das bactérias Gram-positivas contêm ácidos teicoicos, que consistem principalmente de um álcool e fosfato e

estão relacionados ao crescimento celular, impedindo a ruptura extensa da parede e a possível lise celular (MADIGAN et al., 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

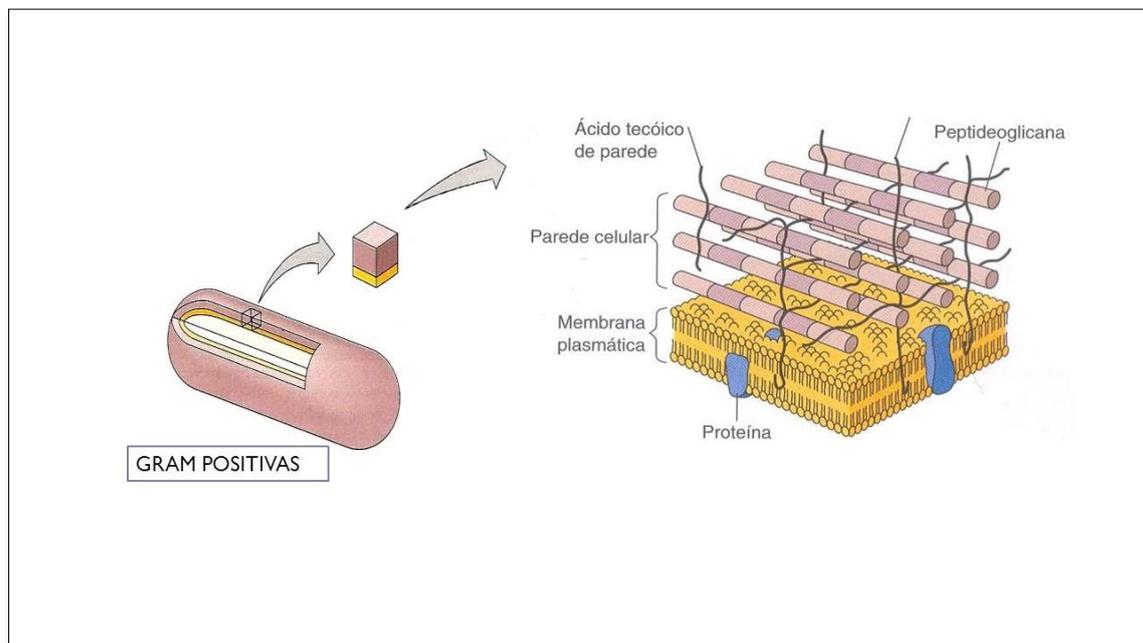


Figura 6: Morfologia da parede celular de bactérias Gram-positivas (modificado de TORTORA et al., 2005).

Por sua vez, as paredes celulares das bactérias Gram-negativas consistem em uma ou poucas camadas de peptidoglicanos e uma membrana externa (Figura 7). A camada de peptidoglicanos está ligada a lipoproteínas (lipídeos covalentemente ligados a proteínas) na membrana externa e está no periplasma, um fluido semelhante a um gel, entre a membrana externa e a membrana plasmática. A membrana externa é formada por fosfolípídeos internamente e por lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas externamente (porinas, por exemplo). O LPS é constituído por um lipídeo complexo (lipídeo A), ao qual está ligado um polissacarídeo (polissacarídeo O). Embora a principal função da membrana externa seja estrutural, ela também atua como uma barreira seletiva bloqueando a passagem de alguns componentes tóxicos à célula, como antibióticos e enzimas digestivas, detergentes e sais biliares. Devido ao fato dessas bactérias conterem somente uma pequena quantidade de camada peptidoglicana, são mais suscetíveis ao rompimento mecânico (KIM et al., 2007; RUPARELIA et al., 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

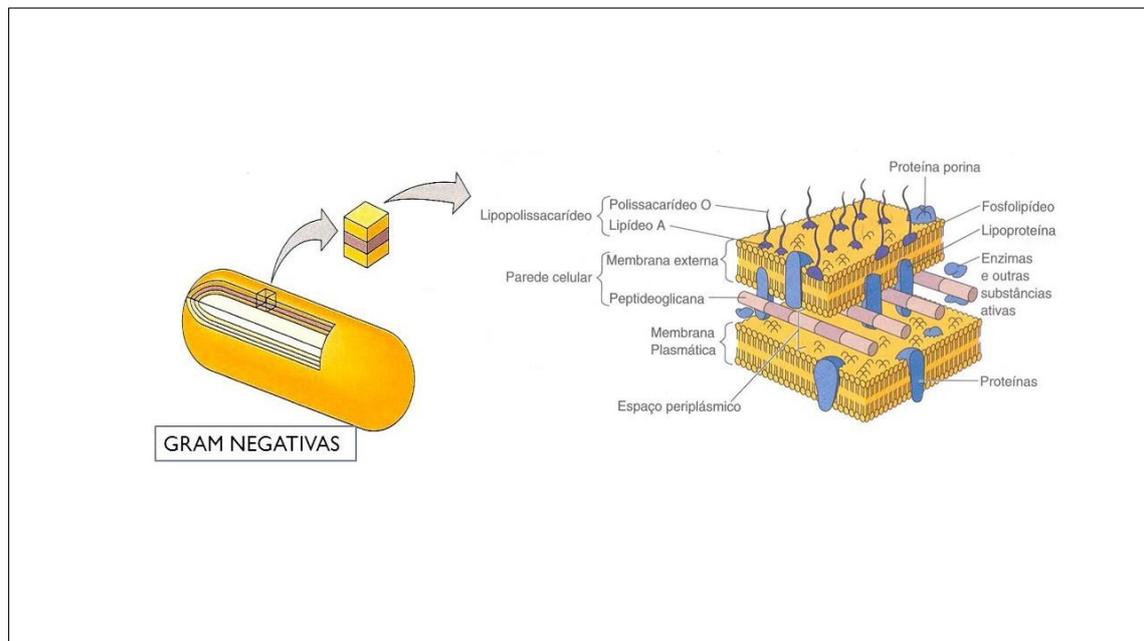


Figura 7: Morfologia da parede celular de bactérias Gram-negativas (modificado de TORTORA et al., 2005).

A parede celular da maioria das bactérias é composta de proteínas de superfície complexas para adesão e colonização e componentes como polissacarídeos e ácido teicoico que protegem contra hospedeiros e condições ambientais (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004).

2.2.1.1 Gram-positivas

Staphylococcus aureus

O gênero *Staphylococcus* pertencente à família *Micrococcaceae* é caracterizado por representantes Gram-positivos, não esporulados, geralmente não encapsulados, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro e imóveis, possuindo em torno de 33 espécies. Uma das espécies de maior interesse médico é o *S. aureus*, que está frequentemente relacionado com diversas infecções em seres humanos. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, geralmente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis.

Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção até infecções graves. Os *Staphylococcus* também são capazes de produzir infecções alimentares devido à produção de exotoxinas durante o crescimento em alimentos

contaminados (CAVALCANTI et al., 2005; LOWY, 1998; SANTOS et al., 2007). A contaminação alimentar por *S. aureus* pode ocorrer em qualquer alimento que ofereça um ambiente favorável para o seu crescimento, como pH entre 4,5 a 9,3 e temperaturas entre 7°C a 48,5°C (HENNEKINNE; BUYSER; DRAGACCI, 2012).

Enterococcus faecalis

Enterococcus são bactérias Gram-positivas, podem ser móveis, facultativamente anaeróbicas, com temperatura de crescimento entre 10°C a 45°C e pH alcalino em torno de 9,6. *E. faecalis* constituem 85 a 90% das espécies de *Enterococcus* identificados nos humanos. Esta bactéria é um microrganismo comensal que habita a cavidade oral e o trato gastrointestinal em humanos, mas podem agir como patógenos oportunistas causando infecções severas do trato urinário, bacteremia e endocardite bacteriana (ANDERSON et al., 2015; FRANZ et al., 2003).

2.2.1.2 Gram-negativas

***Salmonella enterica* sorovar Typhimurium**

O gênero *Salmonella* é pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo uma bactéria Gram-negativa, não esporulada, anaeróbica facultativa, maioria móveis e em forma de bacilos. A *Salmonella* é um gênero heterogêneo, composto por 3 espécies, a *Salmonella subterranea*, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica* (EKPERIGIN; NAGARAJA, 1998; FÀBREGA; VILA, 2013; PUI et al., 2011).

Dentre as de maior importância para a saúde humana, destacam-se a *Salmonella* Typhi (*Salmonella enterica* sorovar Typhi), que causa infecções sistêmicas e febre tifoide e a *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella entérica* sorovar Typhimurium), um dos agentes causadores das gastroenterites. A sua transmissão por alimentos ocorre principalmente através da ingestão de produtos de origem animal contaminado, destacando ovos e carne de aves. O tratamento térmico é imprescindível como método de prevenção para evitar o consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* (EKPERIGIN; NAGARAJA, 1998; FÀBREGA; VILA, 2013; PUI et al., 2011).

Escherichia coli

Pertencente à família *Enterobacteriaceae* é uma bactéria bacilar Gram-negativa, anaeróbica facultativa, não esporulada, temperatura ótima de crescimento a 37°C, variando entre 18°C a 44°C que se encontra normalmente no trato gastrointestinal de animais e humanos. A maioria das estirpes de *E. coli* são comensais, mas algumas podem causar graves infecções alimentares nos seres humanos, e são ocasionalmente responsáveis pela recolha de produtos alimentícios devido à sua contaminação (FERREIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SOUSA, 2006; WELKER et al., 2009).

A presença da *E.coli* em análises microbiológicas de produtos alimentícios sugere um indicador de contaminação fecal, devido a sua presença no trato intestinal e nas fezes. Em humanos a sua transmissão é através da ingestão de alimentos contaminados, como por exemplo, carnes cruas ou má cocção, leite e vegetais crus (FERREIRA et al., 2009; SOUSA, 2006).

2.3 Alimentos: Contaminação bacteriana

Existem mais de 250 tipos de doenças alimentares, sendo muitas delas causadas por microrganismos patogênicos, os quais são responsáveis por problemas de saúde pública. A ingestão de alimentos ou água contaminados por microrganismos podem causar diversas perturbações fisiológicas no homem, denominadas de doenças transmitidas por alimentos (DTA). Essas doenças podem refletir em um grande risco à saúde do indivíduo (BRASIL, 2005; SILVA et al., 2008).

Os surtos de DTA podem ser investigados através da identificação etiológica laboratorial, exames clínicos, bromatológicos ou por critérios epidemiológicos. Por esses métodos é possível obter conclusões sobre seus agentes etiológicos, veículo, local de ocorrência e demais características pertinentes (CARMO et al., 2005).

Os sintomas mais comuns de DTA incluem dor de estômago, náusea, vômitos, diarreia e, por vezes, febre. Boa parte dos surtos alimentares resulta da associação entre o consumo de alimentos contaminados através da manipulação inadequada e conservação ou distribuição em condições impróprias (GREIG e RAVEL, 2009).

Mesmo que a dificuldade de registro das DTA seja um problema mundial, os relatos oficiais demonstram um aumento significativo dessas doenças devido a vários fatores, como: a produção e o consumo de alimentos em condições inadequadas; a

mudança de hábitos alimentares; a redução do tempo para o preparo e consumo do alimento; a maior exposição do alimentos destinados ao pronto consumo; más condições higiênico-sanitárias durante o processamento (BRASIL, 2010; EBONE et al., 2011; RODRIGUEZ; SUAREZ, 2014; SILVA et al., 2010).

Diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias, protozoários, vírus e fungos filamentosos, podem ser agentes causadores de doenças de origem alimentar (BRASIL, 2005). As bactérias constituem o grupo microbiano mais associado às doenças transmitidas por alimentos. Dentre essas, as *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são importantes patógenos responsáveis por doenças alimentares (AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006).

Dados epidemiológicos disponibilizados por órgãos de controle sanitário dos Estados Unidos (EUA) e do Brasil demonstram esses fatos. Por exemplo, dentre os 2.953 surtos registrados, com etiologia conhecida, nos EUA, de 2009 a 2015, 55% foram causados por bactérias, 40% por vírus e 5% por parasitos (CDC, 2018). No Brasil, entre os anos 2007 a 2017, as bactérias foram identificadas como o agente etiológico responsável de 95,9% dos surtos, enquanto que os vírus foram implicados em 7,7% do total de casos (BRASIL, 2017). Porém, ainda há uma dificuldade do registro da maioria dos casos de DTAs no Brasil, representando uma falha do sistema de notificação e a necessidade de melhorias, demonstrado na Figura 8 (BRASIL, 2015; CARMO et al., 2005).

As doenças transmitidas por alimentos são um problema global de saúde pública. Essa situação resulta em despesas médicas e perdas de produtividade, afetando não só a saúde da população como a economia e o comércio. A necessidade por novas tecnologias que possam controlar a proliferação de patógenos em alimentos e sua consequente transmissão aumentaram nos últimos anos (DESSELBERGER, 2000; ESPITIA et al., 2012; JONES et al., 2008; LIU et al., 2009).

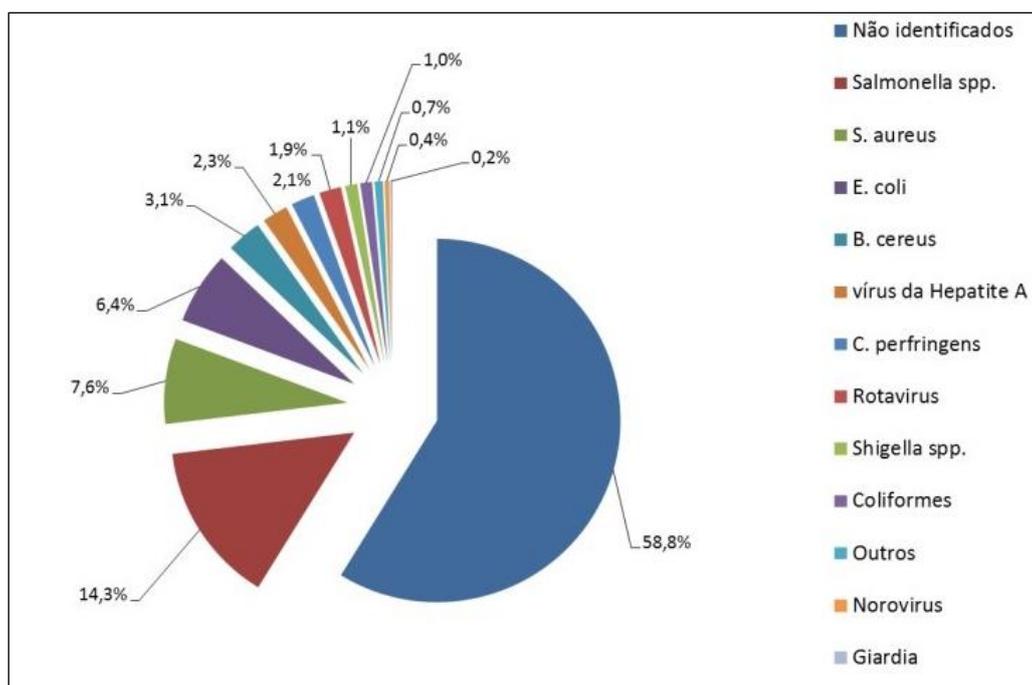


Figura 8: Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil entre 2000 a 2015 (Fonte: BRASIL, 2015).

2.4 Embalagens de alimentos

A embalagem de alimentos possui a função de proteger e assegurar a qualidade do alimento. Com a demanda pelo consumidor por mais segurança e o oferecimento de produtos com maior tempo de prateleira dos alimentos, os estudos de embalagens com novas funções, conhecidas como embalagens ativas, veem crescendo no mercado (ESPITIA et al., 2016).

As embalagens ativas interagem com o produto ou espaço interno de maneira que reduz, inibe ou retarda o crescimento de microrganismos que podem estar presentes nos alimentos (SOARES et al., 2009). Estas embalagens apresentam funções além das tradicionais apresentadas pelas embalagens alimentícias. Esta inovação permite prolongar a vida útil dos alimentos além de manter sua qualidade e sua segurança contra microrganismos (REALINI; MARCOS, 2014). Muitas inovações na indústria das embalagens alimentícias devem-se ao uso de nanotecnologias que permitem melhorar e/ou adicionar propriedades às embalagens.

A incorporação de agentes antimicrobianos, como nanopartículas metálicas, em embalagens permite a difusão gradual destes compostos à matriz alimentar, eliminando a necessidade de elevadas concentrações destes em contato direto com o alimento. O

desenvolvimento destas embalagens desempenham um papel importante para diminuir o risco de contaminações alimentares, além de aumentar o tempo de vida útil (ESPITIA et al., 2016).

As modificações na estrutura e propriedades dos materiais de embalagem, como a resistência mecânica e térmica é um tipo de caracterização relevante no desenho de uma embalagem de alimentos, uma vez que cada característica influencia a integridade física das embalagens desenvolvidas e, portanto, garante a proteção dos alimentos embalados. O impacto toxicológico das nanopartículas deve ser avaliado para determinar os efeitos positivos ou negativos sobre a segurança alimentar (ASSIS, 2012; DOBRUCKA; CIERPISZEWSKI, 2014; ESPITIA et al., 2016; LACOSTE et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e prata e comparar as propriedades antimicrobianas dessas nanopartículas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas associadas a doenças transmitidas por alimentos.

3.2 Objetivos específicos

- (1) Realizar sínteses de nanopartículas de óxido de zinco, óxido de cobre e prata utilizando os métodos de precipitação, hidrotermal e sonoquímica (ultrassom).
- (2) Caracterizar as nanopartículas, do ponto de vista estrutural, morfológico, pureza e estabilidade, por meio das seguintes técnicas: Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia na região Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG) e Potencial Zeta;
- (3) Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas sobre bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* e Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, por meio dos testes de difusão em ágar e de agitação em frasco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Rotas das sínteses das nanopartículas

Nesta subseção serão apresentados os métodos das rotas de sínteses que foram utilizados para a obtenção das nanopartículas de ZnO, CuO e Ag. As rotas de sínteses seguiram como base alguns trabalhos na literatura, mas foram modificadas conforme o método de otimização. O método mais comum foi o de precipitação. Para verificar se haveria alterações estruturais das nanopartículas foram realizados outros métodos como o de ultrassom e hidrotermal. No caso da prata, neste trabalho ela foi utilizada como referência para as demais nanopartículas, já que é considerada um antimicrobiano universal, por isso foi realizado apenas o método de precipitação para a sua síntese.

4.1.1 Sínteses de nanopartículas de óxido de zinco

Dois métodos diferentes para a síntese de nanopartículas de ZnO foram realizados para averiguar quais dos métodos se destacam tanto na caracterização como no potencial antimicrobiano contra as bactérias testadas.

A seguir a descrição das sínteses realizadas:

Síntese 1) Síntese por precipitação

Para a síntese de ZnO foram utilizados o nitrato de zinco como precursor e o hidróxido de potássio como agente mineralizador.

Inicialmente foi preparada uma solução de hidróxido de potássio (KOH- 6M) em um balão volumétrico de 10 ml. Para isso, foi pesado diretamente no béquer (de 50 ml) 3,37 g de KOH e acrescentado água deionizada ultrapura (Mili-Q), aproximadamente 9 ml. Após dissolver a base, a solução foi reservada até esfriar completamente.

Enquanto isso, foi pesado 3,67 g de nitrato de zinco $[Zn(NO_3)_2]$. Em um béquer (de 250 ml) foi colocado 50 ml de água Mili-Q e acrescentado o nitrato de zinco. Esse béquer foi colocado em um agitador com um ímã no interior, e então esperou-se até a solução dissolver por completo. Em seguida, a base que estava no béquer foi colocada no balão volumétrico (de 10ml) e acrescentado água Mili-Q até o menisco.

Na sequência, foi alterado o pH da solução que estava no agitador para 14 usando a solução feita de KOH, que foi sendo colocada aos poucos e medindo o pH. Este foi medido com papel indicador de pH (0-14). Depois de atingir o pH 14 a solução ficou no agitador por 1 hora (Figura 9a).

Após transcorrido o tempo, a mistura foi transferida para 4 tubos de 50 ml. Para que os tubos tivessem o mesmo peso acrescentou-se água Mili-Q. Os tubos foram centrifugados a 7°C, a 11000 rpm por 15 minutos (Figura 9b). O equipamento utilizado nos experimentos foi a Centrífuga Hettich – Rotina 380R. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado branco ficou no fundo. Novamente foi acrescentado água Mili-Q até aproximadamente 40 ml e realizou-se o mesmo procedimento de pesagem dos tubos e centrifugação. Esse processo foi repetido até que a suspensão atingisse o pH 7. Após isso, centrifuga-se mais uma vez nas mesmas condições. No total foram realizadas 3 centrifugações até atingir o pH desejado.

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sólido branco foi disperso com etanol. A suspensão de etanol e ZnO foi transferida para uma placa de Petri coberta com papel alumínio e colocada em uma estufa a 60°C *overnight* – 12 h (Figura 9c). O equipamento utilizado foi a Estufa com Circulação de Ar Quemis.

No dia seguinte a placa de Petri foi retirada da estufa e o sólido (Figura 9d) foi transferido para um almofariz. Com auxílio de um raspador o pó foi desaglomerado (Figura 9e) e em seguida a amostra foi guardada em um microtubo de 2 ml (Figura 9f).

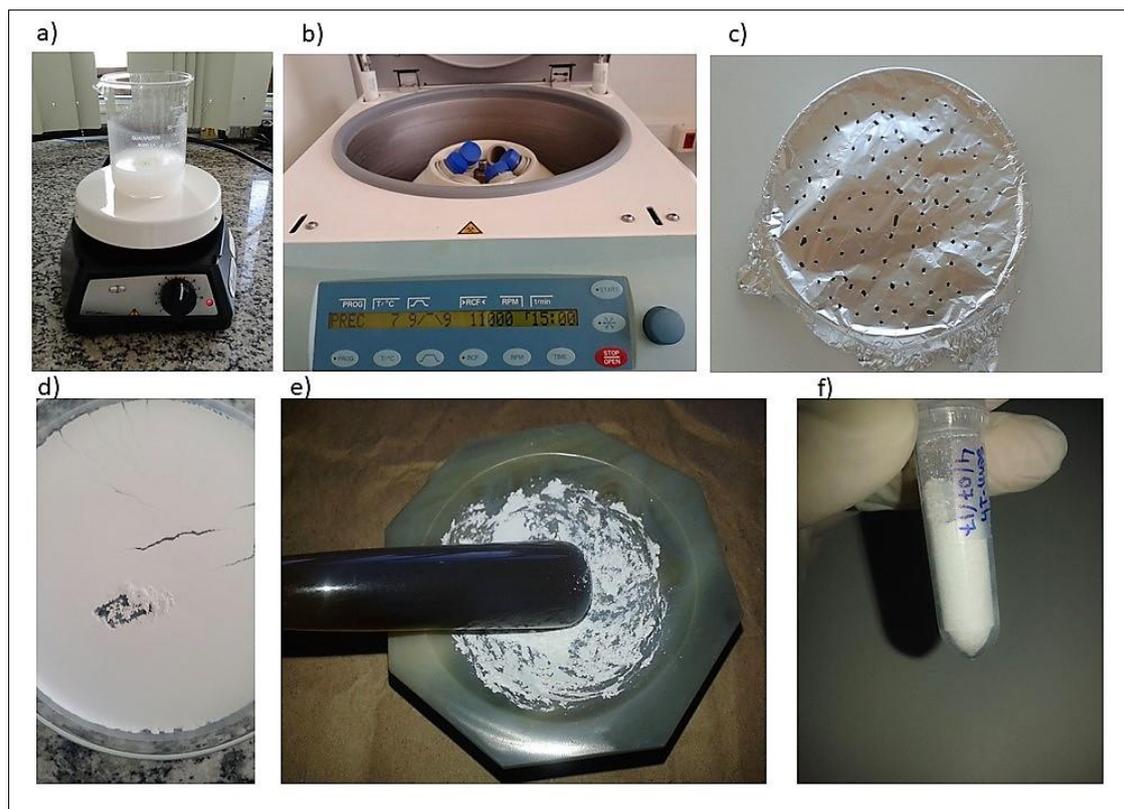


Figura 9: Etapas da síntese de ZnONPs pelo método de precipitação. A) Solução de KOH e $Zn(NO_3)_2$ no agitador. B) Centrifugação da solução após o término da agitação. C) Solução de ZnO e etanol na placa de Petri coberta com o alumínio para ser colocada na estufa. D) Formação de ZnO em pó. E) Desaglomeração do pó no almofariz. F) Amostra guardada em microtubo.

Síntese 2) Síntese por sonoquímica (ultrassom)

A síntese ocorreu da mesma maneira que a anterior até a etapa de agitação por 1h. Após retirar a solução de KOH e $Zn(NO_3)_2$ do agitador, esta foi colocada no ultrassom de ponteira por 1 hora com amplitude de 30%. O béquer no qual estava a solução foi colocado em um isopor e coberto com gelo em volta, como um banho de gelo (Figura 10a). O gelo foi trocado após 30 min e continuou-se a síntese no ultrassom nos mesmos parâmetros por mais 30 min.

Após o término, a solução foi colocada em 4 tubos (Figura 10b) e realizou-se a mesma lavagem que a síntese anterior na centrífuga (Figura 10c). Depois de 3 etapas na centrífuga, o pH estava 7 e então a solução foi centrifugada novamente. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sólido branco foi disperso com etanol (Figura 10d). A suspensão de etanol e ZnO foi transferida para uma placa de Petri coberta com papel alumínio e colocada na estufa a $60^\circ C$ *overnight* (figura 10e).

No dia seguinte a placa de Petri foi retirada da estufa e o sólido (Figura 10f) foi transferido para um almofariz. Com auxílio de um raspador o pó foi desaglomerado (Figura 10g). A amostra foi guardada em um microtubo.

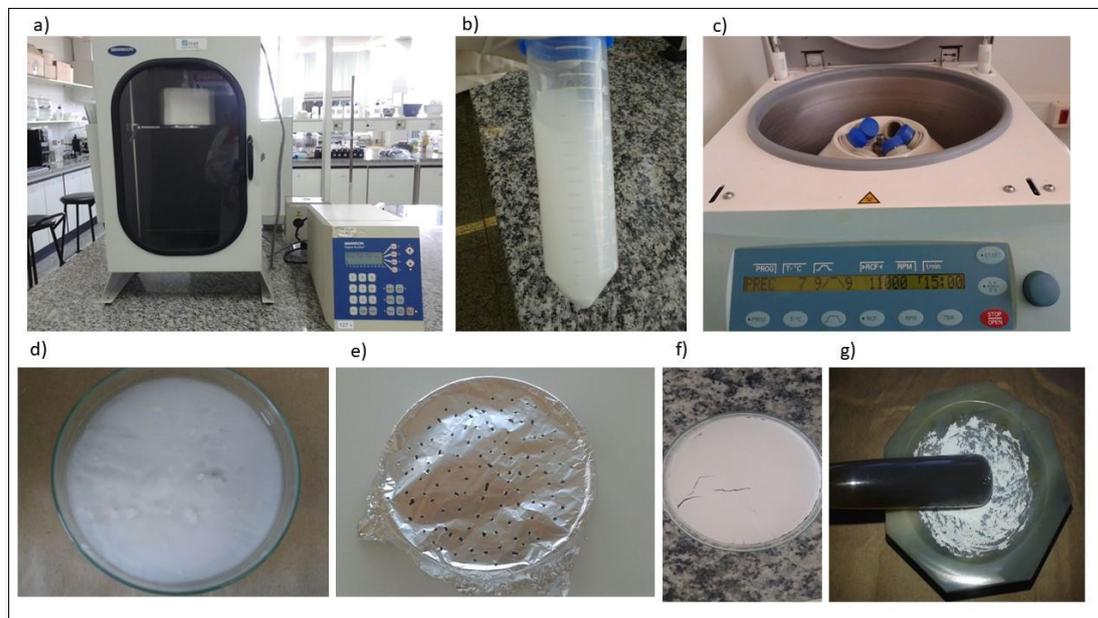


Figura 10: Etapas da síntese de ZnONPs pelo método de sonoquímica. A) O béquer contendo a solução de KOH e $Zn(NO_3)_2$ após a agitação, foi colocado no ultrassom em banho de gelo por 1h. B) A solução foi transferida para os tubos. C) Centrifugação. D) Solução de ZnO e etanol na placa de Petri. E) Solução coberta com papel alumínio e colocada na estufa. F) Formação de ZnO em pó. G) Desaglomeração do pó no almofariz.

4.1.2 Sínteses de nanopartículas de óxido de cobre

Quatro métodos diferentes para a síntese de nanopartículas de CuO foram realizados, como formas de otimização, para averiguar quais dos métodos se destacam tanto na caracterização como no potencial antimicrobiano contra as bactérias testadas.

A seguir a descrição das sínteses realizadas:

Síntese 1) Síntese por precipitação

Para a síntese de CuO foram utilizados o nitrato de cobre como precursor e o hidróxido de sódio como agente mineralizador. Inicialmente foi preparado uma solução de hidróxido de sódio (NaOH - 6M) em um balão volumétrico de 10 ml. Para isso, em

um béquer (de 50 ml) foi pesado 2,4 g de NaOH e acrescentou-se água Mili-Q, não mais de 10 ml. Após dissolver a base, a solução foi reservada até esfriar completamente.

Enquanto isso foi pesado 3,14 g de nitrato de cobre II [Cu (NO₃)₂] (coloração azulada). Em um béquer (de 250 ml) foi colocado 50 ml de água Mili-Q e acrescentado o nitrato de cobre. Esse béquer foi colocado em um agitador com um ímã no interior, e então esperou-se até a solução dissolver por completo. Em seguida, a base que estava no béquer foi colocada no balão volumétrico (de 10ml) e acrescentado água Mili-Q até o menisco.

Na sequência, o pH da solução que estava no agitador foi alterado para 14 usando a solução feita de NaOH 6M, que foi sendo colocada aos poucos e medindo o pH. Este foi medido com papel indicador de pH (0-14). Conforme foi sendo colocado a base, importante misturar bem a solução para ficar um azul homogêneo. Depois de atingir o pH 14 a solução ficou no agitador por 1 hora (Figura 11a).

Depois do tempo transcorrido, a mistura foi transferida para 4 tubos de 50 ml (Figura 11b). Para que os tubos tivessem o mesmo peso foi acrescentado água Mili-Q. Os tubos foram centrifugados a 7°C, a 11000 rpm por 15 minutos. Após centrifugar, o sobrenadante foi descartado e o precipitado azul ficou no fundo. Novamente foi acrescentado água Mili-Q até aproximadamente 40 ml e realizou-se o mesmo procedimento de pesagem dos tubos e centrifugação. Esse processo foi repetido que a suspensão atingisse pH 7. Após isso, centrifuga-se mais uma vez nas mesmas condições. No total foram realizadas 3 centrifugações até atingir o pH desejado.

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sólido azulado foi disperso em etanol. A suspensão de etanol e CuO foi transferida para uma placa de Petri (Figura 11c) coberta com papel alumínio e colocada em uma estufa a 60°C *overnight* (Figura 11d).

No dia seguinte a placa de Petri foi retirada da estufa (Figura 11e) e o sólido foi transferido para um almofariz. Com auxílio de um raspador o pó foi desaglomerado até desaglomerar (Figura 11f). Após esse processo, a amostra foi colocada em uma placa de cerâmica e então levada para a mufla (Figura 11g). A programação da mufla foi 300°C por 2h e a uma velocidade de 10°C/min. O equipamento utilizado foi a Mufla EDG 3000.

Quando o processo terminou, a amostra, agora com coloração escura, foi retirada da mufla e macerada no almofariz (Figura 11h) e então guardada em um tubo microtubo.

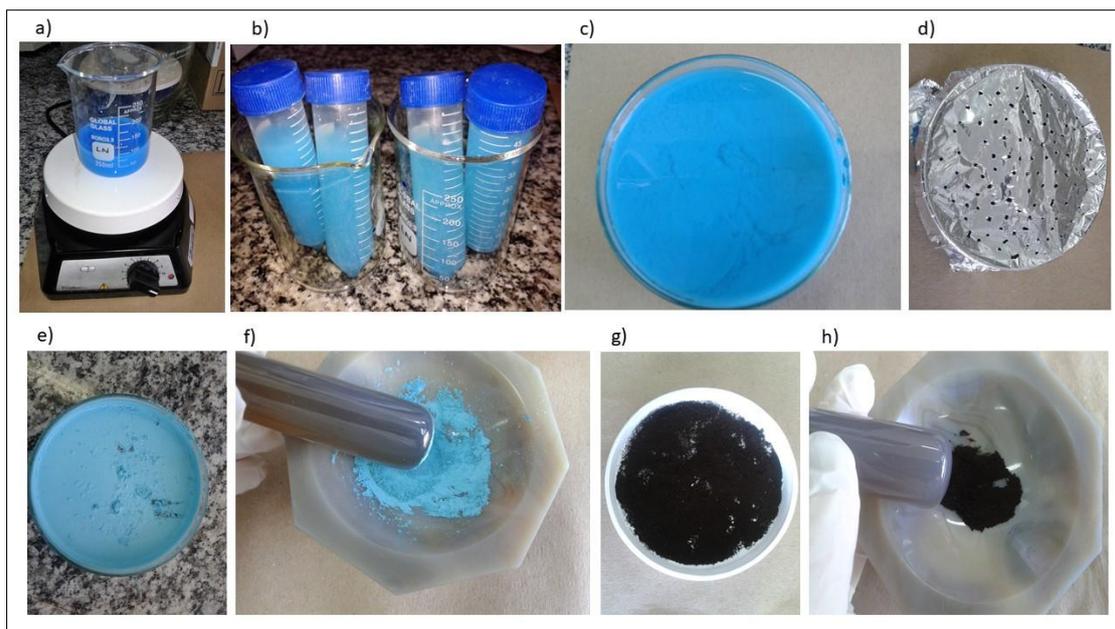


Figura 11: Etapas da síntese de CuONPs por precipitação. A) Solução de NaOH e Cu (NO_3)₂ no agitador. B) A solução foi transferida para tubos Falcon para centrifugar. C) Solução de CuO e etanol na placa de Petri. D) Solução coberta com papel alumínio e colocada na estufa. E) Formação de pó da amostra. F) Maceração do pó no almofariz. G) Formação de CuO após retirar da mufla. H) Desaglomeração da amostra no almofariz.

Síntese 2) Síntese no hidrotermal

A síntese ocorreu da mesma maneira que a anterior até a etapa de agitação por 1h (Figura 12a). Após retirar a solução de NaOH e Cu (NO_3)₂ do agitador (coloração azulada igual a síntese anterior), esta foi transferida para um tubo de teflon (Figura 12b) específico para uso no hidrotermal e acrescentado água Mili-Q até o menisco. Como este tubo ficará no reator do hidrotermal sobre um agitador é necessário colocar uma barra magnética no interior do tubo com a solução. A programação da síntese no hidrotermal foi de 2 h a 150°C (Figura 12c).

Depois de transcorrido esse tempo, a solução (coloração escura) foi transferida para tubos. Em sequência, a etapa de centrifugação ocorreu da mesma maneira que a anterior (Figura 12d). Esse processo foi repetido até que a suspensão atingisse pH 7. No total foram realizadas 3 centrifugações até atingir o pH desejado.

Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado (Figura 12e) e o sólido com coloração marrom escuro foi disperso com etanol. A suspensão de etanol e CuO foi transferida para uma placa de Petri (Figura 12f) coberta com papel alumínio e colocada na estufa a 60°C *overnight*.

No dia seguinte, a placa de Petri foi retirada da estufa (Figura 12g) e o sólido foi transferido para um almofariz. Com auxílio de um raspador o pó foi desaglomerado, e então guardado em um microtubo.

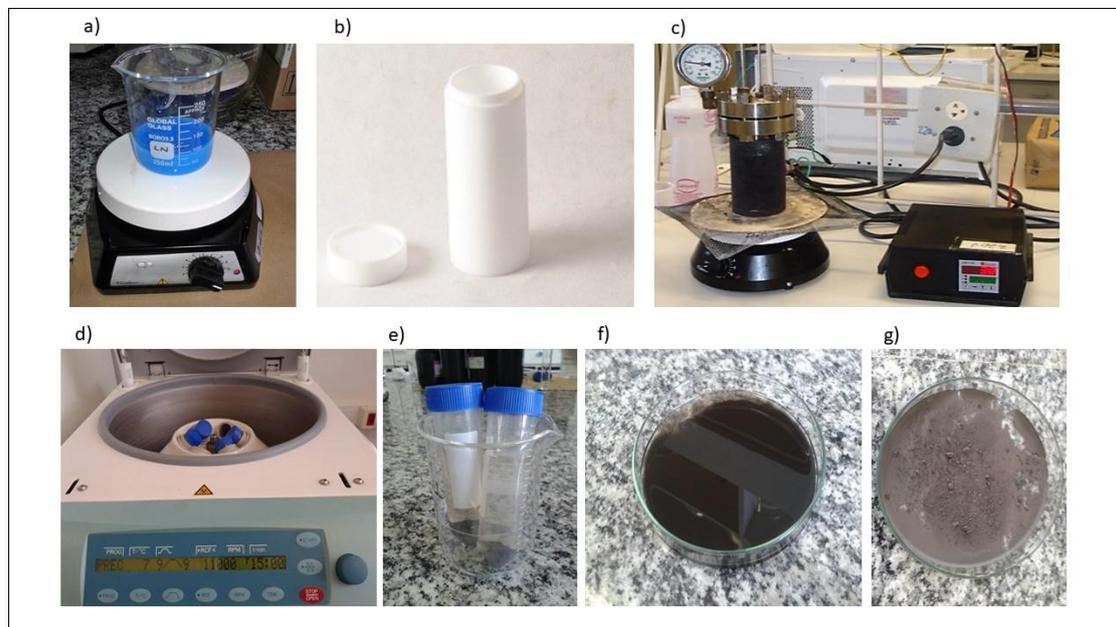


Figura 12: Etapas da síntese de CuONPs pelo hidrotermal. A) Solução de NaOH e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ no agitador. B) A solução foi transferida para o tubo de teflon. C) Suporte do hidrotermal com o tubo de teflon no interior e sobre o agitador. D) Centrifugação após o término da síntese no hidrotermal. E) O precipitado escuro formado no fundo do tubo após o descarte do sobrenadante. F) A suspensão de etanol e CuO foi transferida para uma placa de Petri. G) Formação de CuO após retirar da estufa.

Síntese 3) Síntese por sonoquímica (3h)

A síntese ocorreu da mesma maneira que a anterior até a etapa de agitação por 1h (Figura 13a). Após retirar a solução azulada de NaOH e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ do agitador, esta foi colocada no ultrassom de ponteira por 3h com amplitude de 30% (Figura 13b). O béquer no qual estava a solução foi colocado em suporte de isopor e coberto com gelo em volta, como um banho de gelo. O gelo foi trocado de 30 em 30 min. O equipamento utilizado foi o Ultrassom de Ponteira Branson.

Após o término, a solução de coloração escura (Figura 13c) foi colocada em tubos e foi realizada a mesma lavagem que a síntese anterior na centrífuga. Depois de 3 etapas na centrífuga, o pH estava 7 e então centrifugou-se mais uma vez. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi descartado (Figura 13d) e o sólido marrom escuro foi

disperso com etanol. A suspensão de etanol e CuO foi transferida para uma placa de Petri (Figura 13e) coberta com papel alumínio e colocada na estufa a 60°C *overnight*.

No dia seguinte a placa de Petri foi retirada da estufa (Figura 13f) e o sólido foi transferido para um almofariz. Com auxílio de um raspador o pó foi desaglomerado (Figura 13g) e guardado em um tubo microtubo (Figura 13h).

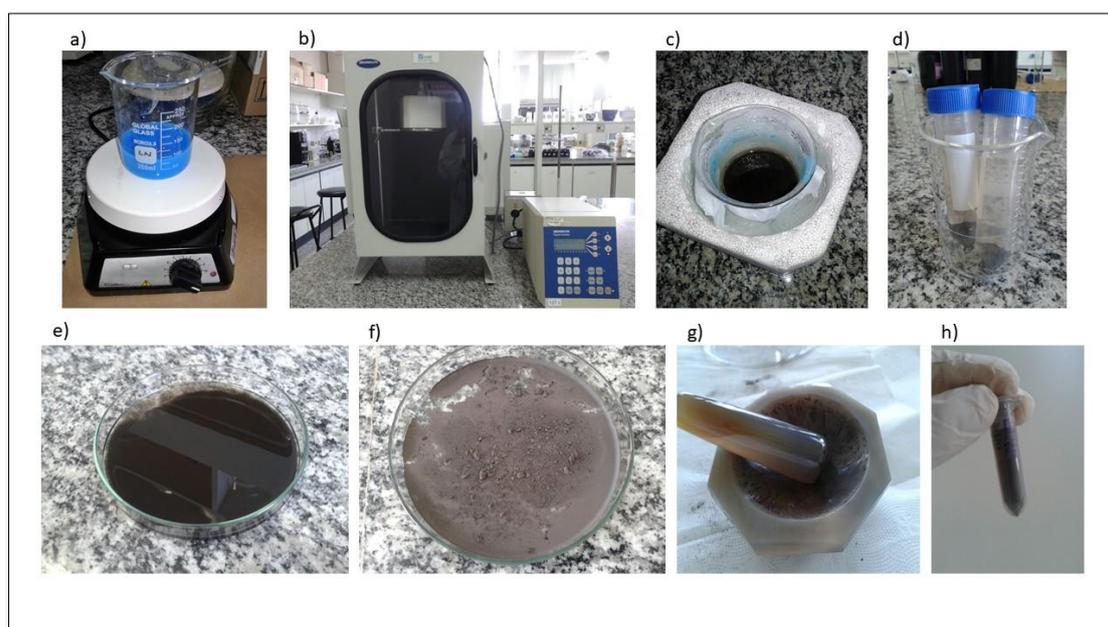


Figura 13: Etapas da síntese de CuONPs pelo método de sonoquímica. A) Solução de NaOH e Cu (NO₃)₂ no agitador. B) O béquer contendo a solução anterior após a agitação, foi colocado no ultrassom em banho de gelo por 3h. C) O béquer com coloração escura foi retirado do ultrassom para posterior centrifugação da solução. D) O precipitado escuro formado no fundo do tubo após o descarte do sobrenadante. E) A suspensão de etanol e CuO foi transferida para uma placa de Petri. F) Formação de CuO após retirar da estufa. G) Desaglomeração da amostra no almofariz. H) A amostra foi transferida para um microtubo.

Síntese 4) Síntese por sonoquímica (2h)

A síntese ocorreu da mesma maneira que a anterior realizada no ultrassom, mas nesse caso o tempo total foi de 2 h. O procedimento foi realizado da mesma forma em toda a síntese. Essa síntese foi realizada para tentar otimizar o tempo, ou seja, verificar se houve a formação de CuONPs em um tempo menor no ultrassom.

4.1.3 Sínteses de nanopartículas de prata

A síntese de nanopartículas da prata foi realizada pelo método de precipitação, no qual foram utilizados o nitrato de prata como agente precursor, o citrato de sódio como

agente redutor e a sílica como carreador. Os reagentes utilizados para esta síntese foram 100 ml de solução de citrato de sódio (0,5 mg/ml); 0,08g de nitrato de prata e 0,54g de sílica. SiO_2

Primeiramente a solução de citrato de sódio ficou em agitação até iniciar a fervura (Figura 14a), em seguida foram acrescentados o nitrato e a sílica, em agitação por 1 minuto (Figura 14b). Em sequência foi realizada a filtração a vácuo da solução (Figura 14c). O papel filtro que reteve o sólido foi colocado em uma placa de Petri e em seguida na estufa a 80°C por 1 hora. Após a secagem, o pó formado foi macerado e guardado.

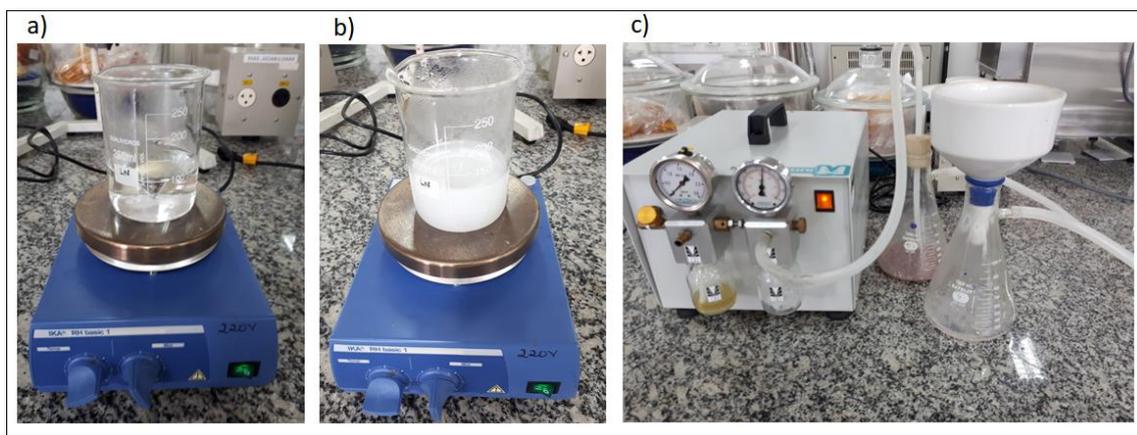


Figura 14: Etapas da síntese de AgNPs pelo método de precipitação. A) Solução de citrato de sódio em agitação. B) Deposição de nitrato de prata e sílica na solução anterior. C) Filtração a vácuo da solução formada.

4.2 Técnicas de caracterização das nanopartículas

Nesta subseção serão apresentadas as técnicas e os parâmetros utilizados para caracterizar os materiais obtidos nos itens anteriores.

4.2.1 Difração de Raios X (DRX)

No presente trabalho, a difração de raios X foi utilizada para determinar a fase dos materiais sintetizados, analisar a cristalinidade dos mesmos e verificar a existência de fases secundárias. As medidas de difração de raios X dos pós foram realizadas no Difratorômetro Shimadzu XRD 6000, que utiliza radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda=1,5488 \text{ \AA}$); voltagem

de 30 kV e corrente de 30 mA. A rotina utilizada foi um intervalo angular varrido de forma contínua entre 5 a 85°, 2 θ , e a velocidade de varredura de 1° min⁻¹.

4.2.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras foram caracterizadas pela medida das absorbâncias na região do infravermelho por espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR). A técnica foi utilizada para verificar a formação de ligações entre Zn-O, Cu-O, presença de grupos fosfatos e carbonatos, além de verificar a presença de espécies adsorvidas na superfície dos materiais. As análises foram conduzidas em espectrofotômetro da marca Bruker, modelo Vertex 70. As leituras foram realizadas na faixa espectral de 4.000 – 400 cm⁻¹, no modo transmitância.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG)

Para a verificação da forma e distribuição de tamanhos das nanopartículas obtidas foi realizada a microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG). Para a análise foi utilizado o equipamento JEOL JMS 6701F com um canhão de emissão operando com voltagens de extração de corrente de 2 à 10 kV.

4.2.4 Potencial Zeta

Segundo o trabalho de Schaffazick e colaboradores (2003), o potencial zeta é considerado de extrema importância no estudo da estabilidade de suspensões coloidais. Admite-se que elevados valores de potencial zeta são característicos de suspensões estáveis.

Neste trabalho as medidas de potencial zeta foram realizadas para verificar a estabilidade em solução das partículas sintetizadas. A medida do potencial zeta das suspensões foi realizada utilizando-se o equipamento Malvern Instruments - Zetasizer Nano ZS90.

Para a medição do potencial zeta foi utilizado 0,001 g da nanopartícula em 10ml de água Mili Q e a solução foi colocada no ultrassom por 2 min (10% de amplitude) antes da medição.

4.3 Atividade antimicrobiana

Nesta subseção será apresentado os ensaios microbiológicos que foram realizados para avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas sintetizadas.

4.3.1 Teste de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi realizado com o intuito de avaliar qualitativamente o potencial antimicrobiano das nanopartículas sintetizadas contra cepas bacterianas. O teste foi realizado com duas bactérias Gram-positivas, a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Enterococcus faecalis* (CCCD-E002); e duas Gram-negativas, a *Escherichia coli* (ATCC 25922) e a *Salmonella typhimurium* (CCCD-S004). As cepas padrões foram utilizadas por serem consideradas potenciais patógenos aos alimentos.

Para garantir a esterilidade do material utilizado (meio de cultura, vidraria, ponteiros), os procedimentos padrões prévios de esterilização em autoclave foram realizados.

Inicialmente, foram preparados os meios de cultura: 1) Ágar Müller-Hinton (MH) para as placas de Petri; 2) Caldo Müller-Hinton. Ambos os meios foram esterilizados na autoclave vertical por 15 min, a 121°C e pressão 1 atm.

Ainda no fluxo laminar, as bactérias foram inoculadas no caldo MH que haviam sido preparados em tubos com auxílio da alça de platina. Sendo assim foi utilizado um tubo para cada bactéria inoculada. Estes foram incubados *overnight* (12 h), em temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Posteriormente, com base na escala McFarland 0,5 a concentração de células bacterianas de cada tubo foi ajustada por diluições sequenciais até uma concentração final de 10^5 UFC/ml. Para a leitura da turbidez (600nm) foi utilizada a técnica de UV-Visível pelo equipamento Shimadzu UV-1601PC.

Em sequência, 100 µL das amostras diluídas foram colocadas na superfície do ágar MH espalhando com o auxílio da alça de Drigalski. Para cada bactéria foram utilizadas 8 placas de Petri, ou seja, 7 para cada síntese realizada e 1 controle (sem as nanopartículas, só com as bactérias). Na etapa seguinte as nanopartículas foram depositadas nas placas com auxílio de uma espátula. Todos os pontos foram feitos em triplicata, ou seja, foi depositado 3 pontos das nanopartículas em cada placa com a

bactéria, a quantidade utilizada foi 0,4 mg de amostra. Esse procedimento foi realizado para cada bactéria.

Ao terminar essa etapa, as placas foram incubadas na estufa própria para microrganismos em temperatura de $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$, por um período de aproximadamente 24 h. Após esse período os resultados da formação dos halos de inibição foram visualizados. Os halos de inibição foram medidos em relação ao seu diâmetro com o auxílio de paquímetro (Figura 15).

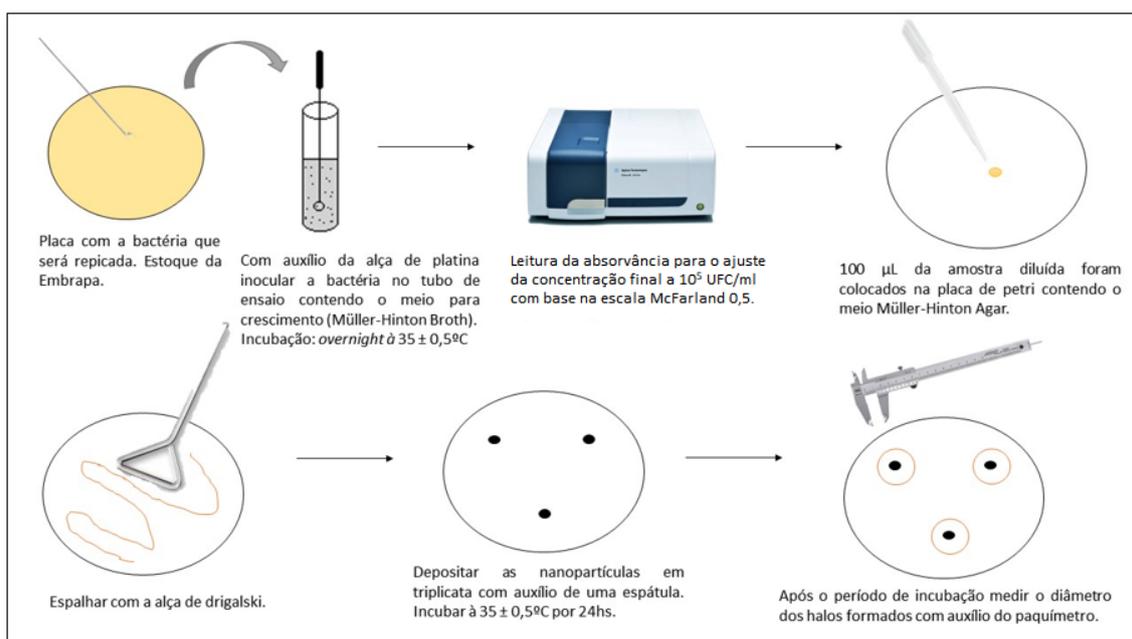


Figura 15: Teste de difusão em ágar realizado para as bactérias *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *Salmonella*. Ilustração das seguintes etapas: Repique e inoculação da bactéria; leitura da absorbância e ajuste para uma concentração de 10^5 UFC/ml; 100 μL da amostra diluída colocados na placa de Petri com meio MH e espalhados com a alça de Drigalski; deposição das nanopartículas e incubação; por fim, a medição do diâmetro dos halos de inibição com auxílio do paquímetro.

4.3.2 Teste de agitação em frasco

Além do teste de difusão (em meio sólido), foi realizado o teste de agitação em frasco (em meio líquido) seguido do plaqueamento das amostras e a contagem das colônias de bactérias após 24 h (UFC/ml). Para esse teste foram utilizadas as cepas bacterianas que apresentaram maior inibição no teste anterior, ou seja, *Staphylococcus aureus* como Gram-positiva e *Escherichia coli* como Gram-negativa, e as sínteses que obtiveram nanopartículas menores e que ao mesmo tempo formaram halos em mais

bactérias no teste de difusão, sendo a de ultrassom para ZnO, ultrassom 2 h para CuO e precipitação para Ag.

Neste experimento foram testadas 3 concentrações diferentes das nanopartículas, além do controle contendo somente a bactéria (C0). Essas concentrações utilizadas foram 100 µg/ml (C1), 250 µg/ml (C2) e 500 µg/ml (C3), sendo todas realizadas em triplicatas. Esse teste foi dividido em 4 dias.

No primeiro dia foi feito o meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) tanto para os frascos onde as nanopartículas foram depositadas para agitação no segundo dia quanto para os tubos nos quais as bactérias cresceram. Com uma alça de inoculação, cada bactéria foi repicada a partir de uma cultura estoque para tubos contendo meio TSB e incubados *overnight* (12 h) à $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

No segundo dia, com base na escala McFarland 0,5 (estimada a 10^8 UFC/ml) a concentração de células bacterianas foi ajustada por diluições até uma concentração final de 10^5 UFC/ml. Para a leitura da turbidez (600 nm) foi utilizada a técnica de UV-Visível pelo equipamento Shimadzu UV-1601PC. No fluxo laminar foram depositados em cada frasco (já preparados no primeiro dia com o meio) 100 µl da suspensão bacteriana ajustada e as nanopartículas pesadas de acordo com as concentrações mencionadas. Em sequência foram colocados em agitação a 165 rpm, 35°C por 24 horas.

No terceiro dia foi preparado o meio PCA (*Plate Count Agar*). As amostras que estavam em agitação foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato. Para *S. aureus* as diluições decimais da C0 plaqueadas foram 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} ; para as C1, C2 e C3 foram a 10^{-2} a 10^{-7} . Para *E. coli*, as diluições da C0 foram as mesmas; já para as C1, C2 e C3 foram de maneira geral da 10^{-5} a 10^{-8} .

O plaqueamento foi realizado pela técnica de *pour plate*, adicionando uma alíquota de 1 ml da diluição na placa de Petri, vertendo 35 ml do meio de cultura PCA sobre o inóculo e homogeneizando adequadamente (Figura 16). Após o meio solidificar as placas invertidas foram incubadas a 35°C por 24 horas.

No último dia (quarto dia) foi realizado a contagem das colônias nas placas com auxílio do contador de colônias Manual Modelo CP 608 da marca Phoenix-Lufenco (Figura 17). A contagem foi após o tempo de incubação, expressa em UFC/ml, foi realizada nas placas que apresentaram de 30 a 300 números de colônias e esse valor foi multiplicado pelo inverso da diluição.

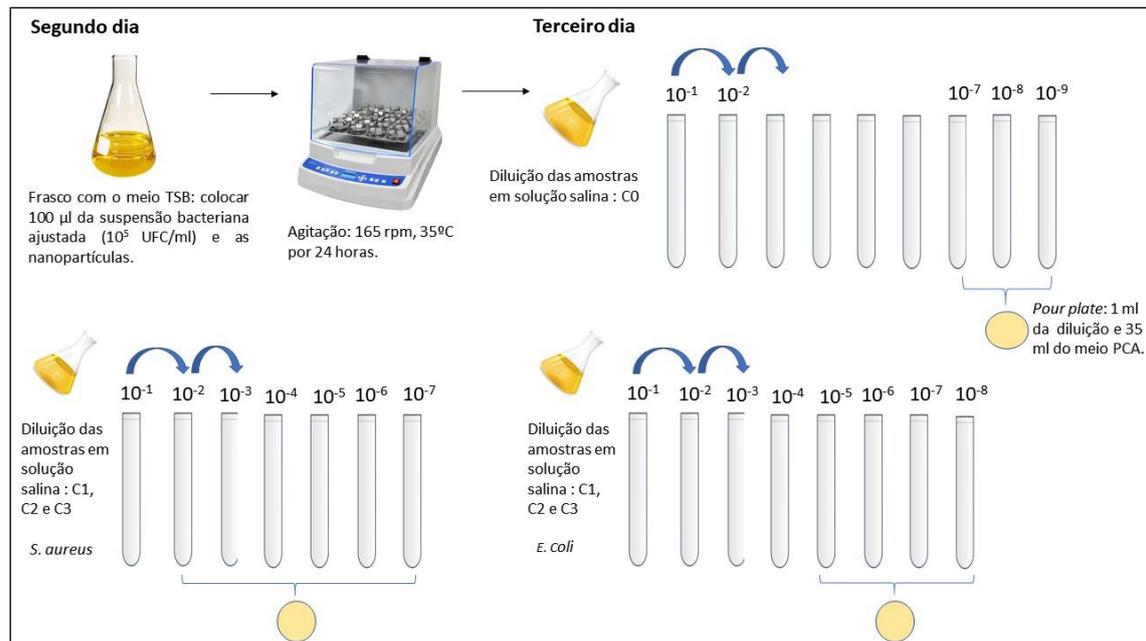


Figura 16: Segundo e terceiro dia do teste de agitação em frasco realizado para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. No segundo dia foram acrescentados aos frascos com o meio TSB, já preparados no primeiro dia, 100 µl da suspensão bacteriana e as nanopartículas; em seguida os frascos ficaram sob agitação a 165 rpm, 35°C por 24 horas. No terceiro dia as amostras que estavam em agitação foram diluídas em solução salina tamponada com fosfato; em sequência foi realizada a técnica de *pour plate*.

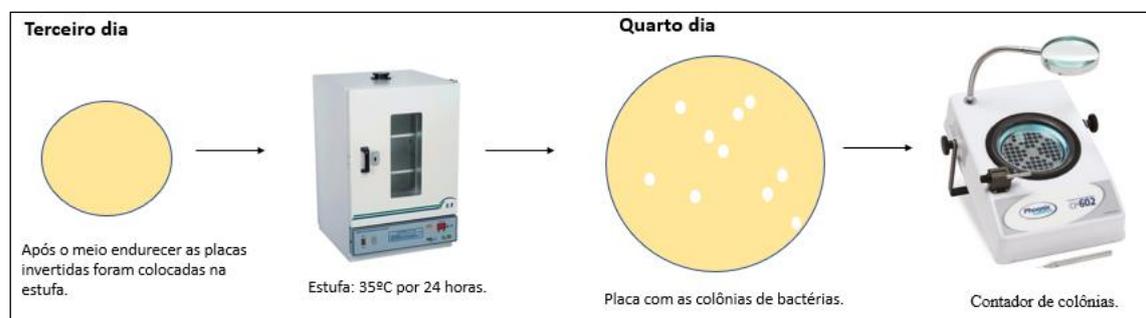


Figura 17: Últimas etapas do teste de agitação em frasco. No final do terceiro dia após o meio solidificar as placas invertidas foram incubadas a 35°C por 24 horas. No quarto dia foi realizada a contagem das colônias nas placas com auxílio do contador de colônias.

4.4 Análise estatística

Para avaliar o efeito da concentração das nanopartículas de ZnO, CuO e Ag na % de inibição das bactérias utilizou-se uma análise de regressão não linear. Intervalos com

95% de confiança foram calculados para os parâmetros estimados do modelo. O software utilizado foi o R 3.5.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterizações das nanopartículas

5.1.1 Nanopartículas de ZnO

As nanopartículas de ZnO após serem sintetizadas foram caracterizadas pelos métodos citados, dos quais serão mostrados os resultados. O primeiro deles foi o DRX, como mostrado na Figura 18. Os picos de difração marcados com asterisco na figura que foram observados em ângulos de $31,6^\circ$, $34,2^\circ$, $36,1^\circ$, $47,3^\circ$, $56,3^\circ$, $62,7^\circ$, $66,2^\circ$, $67,5^\circ$ e $68,8^\circ$ pertencem aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) e (201), respectivamente, de ambos os métodos de síntese. Estes dados estão de acordo com os valores correspondente da ficha cristalográfica (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards data JCPDS 01-075-0576*) referente ao ZnO puro. Não foram detectados picos que possam corresponder a impurezas, o que implica que uma pureza relativamente elevada de nanopartículas de ZnO foi obtida. Além disso, picos de difração fortes e estreitos indicam que a amostra apresenta uma boa cristalinidade (GHOMI; GHASEMZADEH; ZAHEDI, 2013; MAIA et al., 2016; MOAZZEN; BORGHEI; TALESHEI, 2013; NAVALE et al., 2015; POOKMANEE et al., 2010).

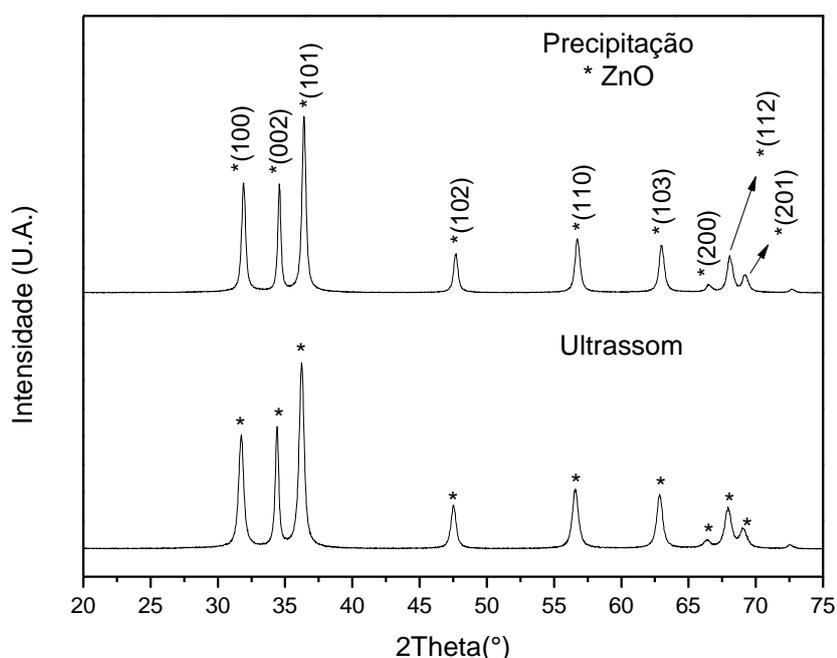


Figura 18: Difratogramas de raios X das amostras de ZnO sintetizadas pelo método de precipitação e por

ultrassom. Os valores entre parênteses correspondem aos planos pertencentes aos ângulos de difração. O asterisco se refere aos planos que foram repetidos nas duas sínteses.

As amostras também foram analisadas por meio de microscopia eletrônica de varredura, podendo observar o tamanho, a forma e a distribuição em ambas as sínteses nas imagens a seguir (Figura 19 e 20). O tamanho das nanopartículas foram analisados por medições diretas da espessura das partículas a partir da contagem de 100 partículas utilizando-se as imagens. Como mostrado nos histogramas, a síntese 1 das ZnONPs (síntese por precipitação) apresentou nanopartículas com espessura por volta de 25 a 30 nm, enquanto a síntese 2 (síntese por ultrassom) por volta de 15 nm. Apesar do aspecto diferente de ambas as morfologias, pode-se observar a formação de placas de formatos irregulares. Mas, na síntese por ultrassom as nanoplacas apresentaram espessuras menores, exibindo tamanho médio de 15 nm e não ultrapassando 25 nm. A medida que as nanopartículas tornam-se menores, a proporção superfície/volume aumenta, assim como sua reatividade química (MOAZZEN; BORGHEI; TALESCHI, 2013). No trabalho de Navale et al. (2015), os tamanhos de ZnONPs de 20-25nm apresentaram propriedades antibacterianas significativas contra *S. aureus*.

A área superficial elevada e uma melhor dispersão de nanopartículas são razões para melhores atividades de ZnONPs (SAFAEI-GHOMI; GHASEMZADEH; ZAHEDI, 2013).

Concentração das NPs, tamanho e forma são fatores importantes que afetam a eficácia inibitória de ZnONPs. Durante a síntese de processamento de ZnONPs, elas podem apresentar-se sob a forma de aglomerados, necessitando algumas vezes do uso de dispersantes (ZHANG et al., 2007). A atividade das nanopartículas de ZnO aumenta com a redução do tamanho da partícula (BRAYNER et al., 2006; LIU et al., 2009; NAIR et al., 2009; REDDY et al., 2014). Com o aumento da temperatura no qual o método de síntese é realizado, a natureza cristalina da amostra pode incrementar (REDDY et al., 2014).

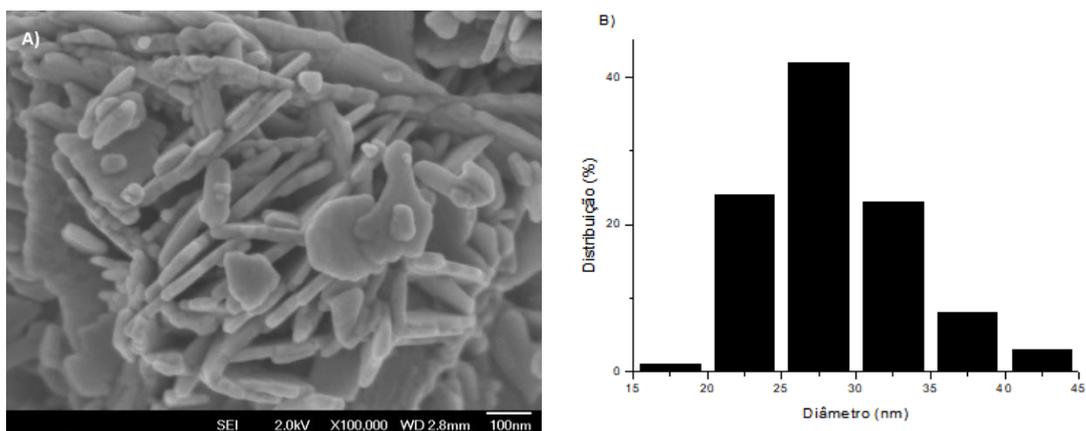


Figura 19: Síntese por precipitação de ZnONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.

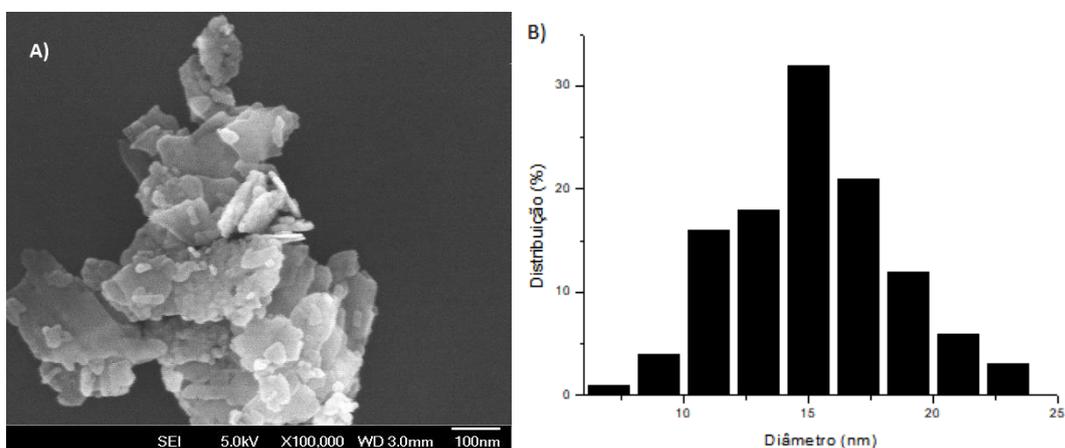


Figura 20: Síntese por ultrassom de ZnONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.

A seguinte caracterização realizada foi o FTIR, com o intuito de confirmar a formação de ZnO e verificar as espécies adsorvidas na superfície das amostras, cujos resultados estão na Figura 21 e em seguida a Tabela 1 com as atribuições das bandas. Pode encontrar-se uma série de picos de absorção de 4000 a 400 cm^{-1} correspondendo aos modos de vibração de diversos grupos funcionais, tais como, hidroxila, carboxilato, carboxila e alceno presentes nas nanopartículas. Verifica-se que ambas as sínteses apresentaram a banda característica do estiramento da ligação Zn-O na região correspondente ao #1 no gráfico; assim como a banda #5 que representa o estiramento do grupo O-H correspondente a vibração da água a partir de KOH (usado como precursor); ao ponto correspondente ao #4, que representa as vibrações do estiramento de CH de grupos alcanos; e também a banda em #2 que representa o grupo carboxilato (COO^-). Já a banda em #3 foi observada na síntese por precipitação que corresponde provavelmente

a ligação C=O. Deste modo, de acordo com as análises, a síntese de ZnO por ultrassom representa menos impurezas residuais (CHITHRA; SATHYA; PUSHPANATHAN, 2015; GIRALDI et al., 2011; GHOMI; GHASEMZADEH; ZAHEDI, 2013; LIBANORI, 2011; NAKAMOTO, 2009; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 1994).

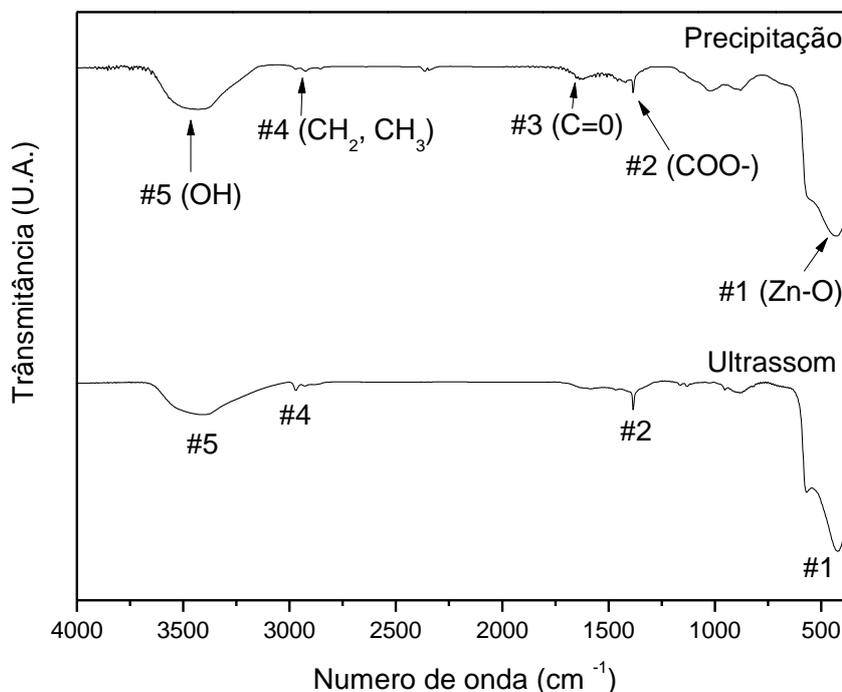


Figura 21: Imagem dos espectros de ZnO obtidos pela espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR), para a síntese 1 (precipitação) e síntese 2 (ultrassom).

Tabela 1: Atribuição das bandas provenientes do FTIR das sínteses de ZnONPs.

#	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição das bandas
1	480-490	Estiramento da ligação Zn-O
2	1320-1460	Grupo carboxilato COO ⁻
3	1691	Ligação C=O
4	2970-2987	Estiramento de CH de grupos alcanos
5	3392-3490	Deformação axial do grupo O-H

Por último, a análise realizada foi do Potencial Zeta, como mostrado na Tabela 2 a média dos valores obtidos. O equilíbrio no sistema é principalmente influenciado pelo pH. No caso das sínteses realizadas, o pH final foi ajustado para 7, ou seja, um pH neutro. Mas, para a medição do potencial Zeta preparou-se uma solução com as nanopartículas (0,001g de amostra para 10 ml de água). A estabilidade das suspensões de ZnO pode ser influenciada de várias maneiras. Nas duas sínteses os valores do Potencial Zeta foram bem próximos, apresentando um valor positivo em torno de 23 mV para a síntese 1 (precipitação) e em torno de 26 mV para a síntese 2 (ultrassom). A estabilidade de partículas ocorre quando o valor do potencial Zeta é ≤ -30 mV ou ≥ 30 mV, caso o valor se encontre entre -30 mV e 30 mV indica a possibilidade de aglomeração de partículas, sendo a velocidade de aglomeração aumentada quanto mais próximo de zero for o valor do potencial Zeta. Logo, o valor médio obtido para a síntese pelo método de ultrassom, apesar de menor que 30mV, encontra-se mais próximo a este valor e mais distante de zero. Os dados obtidos do método de precipitação indicam maior aglomeração das partículas (DUKHIN, 2010; MARSALEK, 2014).

Tabela 2: Média dos valores e o desvio padrão do Potencial Zeta (mV) obtidos em ambas as sínteses de ZnONPs.

	Precipitação	Ultrassom
Potencial Zeta ZnONPs (mV)	26,6 ± 0,2	23,6 ± 0,2

5.1.2 Nanopartículas de CuO

As nanopartículas de CuO após serem sintetizadas foram caracterizadas. O primeiro dos métodos de caracterização foi o DRX, como mostrado na Figura 22, confirmando a presença das fases desejadas em todos os casos. Os difratogramas obtidos indicam a obtenção de CuO de acordo com a ficha cristalográfica JPDS 00-048-1548. Todos os métodos apresentaram a formação de CuO puro, com ausência de fases indesejadas (SAHAY et al., 2012; YU et al., 2007).

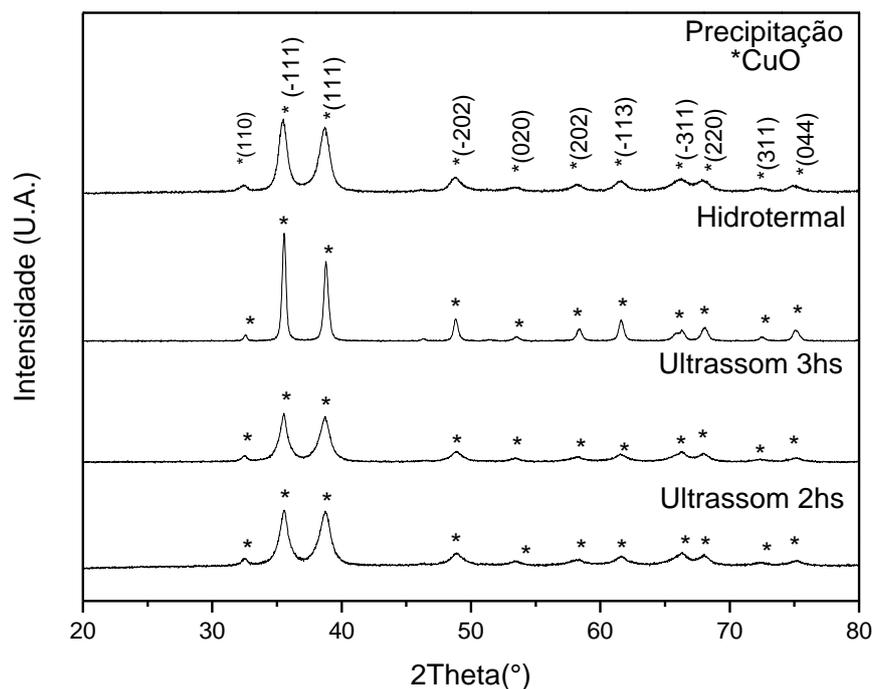


Figura 22: Difratomogramas de raios X das amostras de CuO que foram sintetizadas por 3 métodos diferentes (Precipitação, Hidrotermal, Ultrassom). Os valores entre parênteses correspondem aos planos pertencentes aos ângulos de difração. O asterisco se refere aos planos que foram repetidos nas duas sínteses.

As amostras foram analisadas por meio de microscopia eletrônica, podendo observar o tamanho, a forma e a distribuição das nanopartículas em todas as sínteses (Figuras 23, 24, 25 e 26). O tamanho das nanopartículas foram analisados por medições diretas do diâmetro das partículas a partir da contagem de 100 partículas utilizando-se as imagens. Como mostrado nos histogramas, a síntese 1 das CuONPs (síntese por precipitação) apresentou nanoplacas com espessura entre 20 e 15 nm, a síntese 2 (síntese por hidrotermal) entre 30 e 40 nm, a síntese 3 (síntese por ultrassom 3 h) entre 25 e 30 nm e a síntese 4 (síntese por ultrassom 2 h) foi por volta de 10 nm. De forma geral, as nanopartículas apresentaram formato de bastões, porém há uma aglomeração maior na síntese por precipitação. Todavia, na síntese que utilizou o método da hidrotermal, as nanopartículas apresentaram um formato diferente das demais, parecendo nanoplacas.

As nanopartículas de CuO menores (tamanho de partícula $20 \pm 1,24$ nm) mostraram um efeito inibitório significativo contra bactérias Gram-negativas e positivas nos estudos de Azam e colaboradores (2012) e de Ahamed et al. (2014).

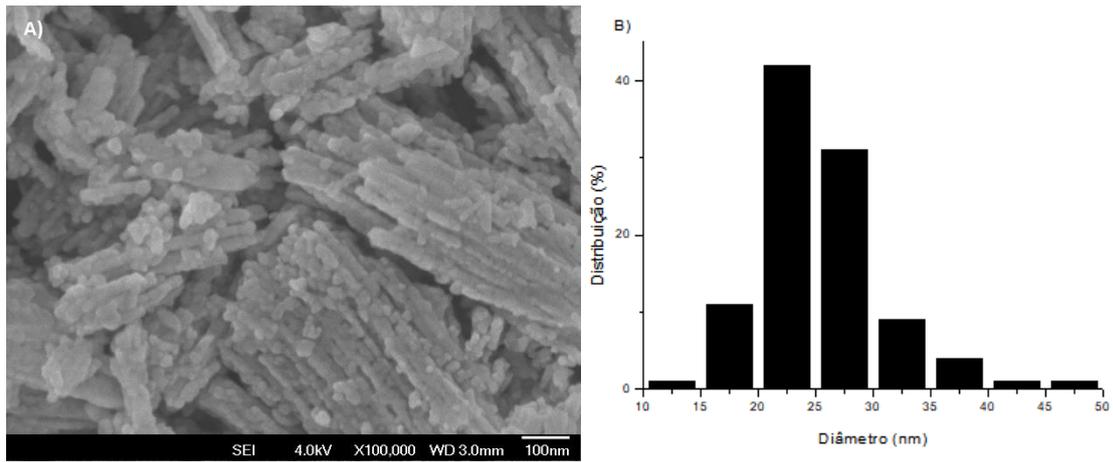


Figura 23: Síntese por precipitação de CuONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.

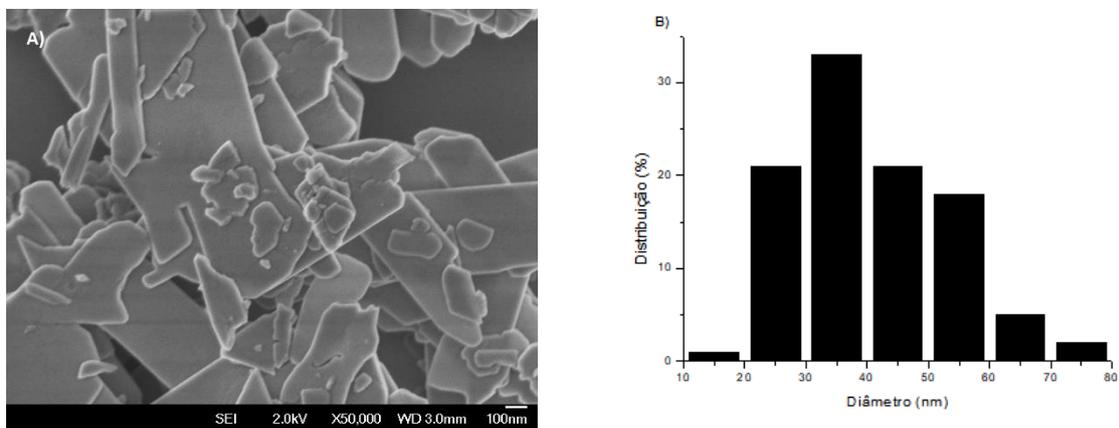


Figura 24: Síntese por hidrotérmica de CuONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.

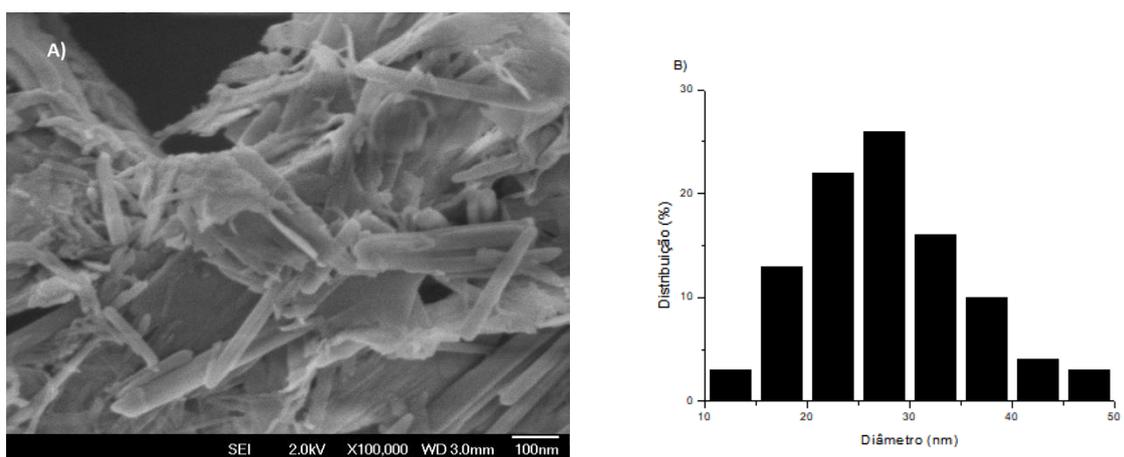


Figura 25: Síntese por ultrassom (3 h) de CuONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.

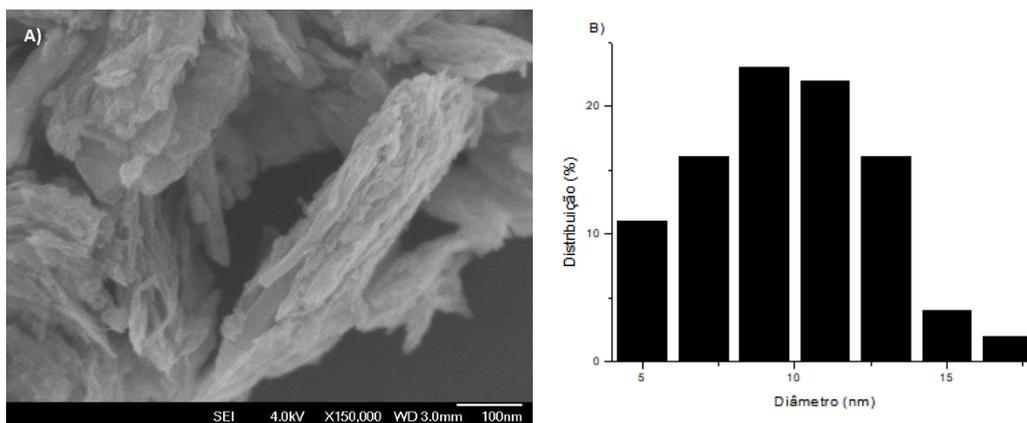


Figura 26: Síntese por ultrassom (2 h) de CuONPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.

A próxima caracterização realizada foi através do FTIR, na qual podemos observar os espectros obtidos (Figura 27 e Tabela 3). A análise dos espectros apresentados na imagem abaixo, confirma a ligação Cu-O devido à presença das bandas na região de 650 a 400 cm^{-1} . As bandas correspondentes ao #3 e #4 são resultantes do estiramento da ligação Cu-O em direção (-202) e no ponto #5 para a direção (202). As formações dessas bandas confirmam a obtenção do CuO com estrutura cristalina. A banda no ponto #1 está relacionada ao estiramento do grupo OH da água adsorvida, já o ponto #2 corresponde a deformação angular de OH (DAR et al., 2008; EL-TRASS et al., 2012; SANTOS, 2015).

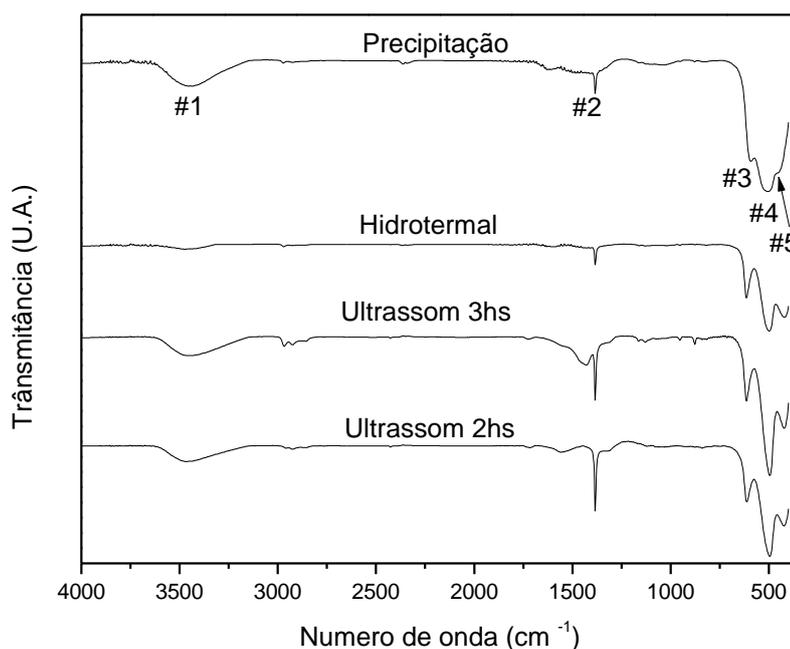


Figura 27: Imagem dos espectros de CuO obtidos pela espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR) sintetizadas por 3 métodos diferentes (Precipitação, Hidrotermal, Ultrassom).

Tabela 3: Atribuição das bandas provenientes do FTIR das sínteses de CuONPs.

#	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição das bandas
1	3490-3450	OH absorvido
2	1397-1430	Deformação angular da água absorvida
3,4,5	650-400	Estiramento da ligação Cu-O

Por último, a análise realizada foi do Potencial Zeta, como mostrado na Tabela 4 a média dos valores obtidos. De acordo com os valores obtidos, apenas o método de ultrassom 2 h exibiu estabilidade, valor igual/ superior a 30mV. As demais sínteses apresentaram valores inferiores, não mostrando estabilidade em suspensão (ANANTH et al., 2015).

Tabela 4: Média dos valores do Potencial Zeta obtidos em todas as sínteses de CuONPs.

	Precipitação	Hidrotermal	Ultrassom 3h	Ultrassom 2h
Potencial Zeta (mV)	26 ± 0,2	28 ± 0,2	28,1 ± 0,2	30,2 ± 0,2

5.1.3 Nanopartículas de Ag

Os resultados obtidos no DRX com a síntese das nanopartículas de Ag são mostrados na Figura 28. Os picos de difração marcados na figura e que foram observados em ângulos de 38°, 44,1°, 64,39° e 77,51° pertencem aos planos (111), (200), (220), (311), respectivamente. Estes dados estão de acordo com os valores correspondente da ficha cristalográfica (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards file no. 04-0783*) (EPIFANI et al., 2000; SUN; XIA, 2002). Já o primeiro pico a 22° confirma a presença da Sílica (SiO₂) na matriz polimérica em seu estado amorfo, indicando que o método utilizado promoveu uma alta dispersão da prata em sua matriz. A sílica pode ser usada como suporte (carreador) para as NPs metálicas, devido a sua estrutura estável, elevada

superfície de contato, permitindo maior aproveitamento das propriedades específicas das NPs (ESPINOSA et al., 2004; NALLATHAMBI et al., 2011; SANTOS; LÔBO; CRUZ, 2014).

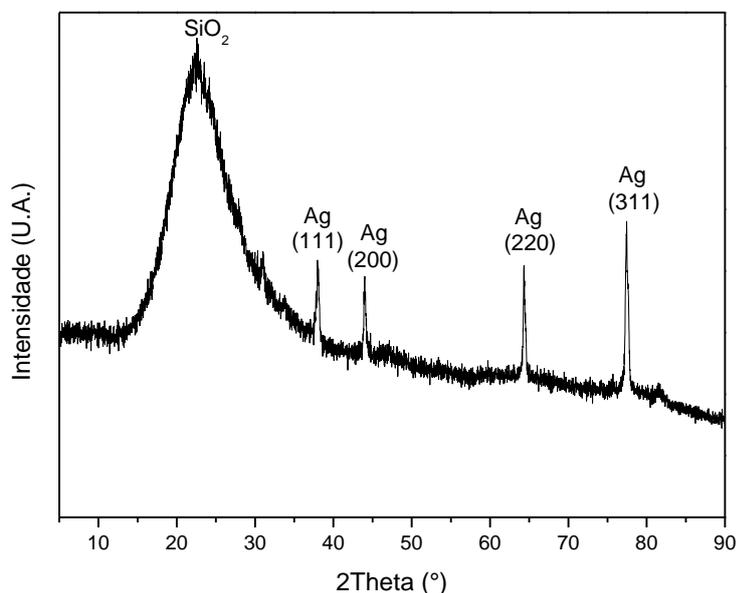


Figura 28: Difratograma de raio X da amostra de Ag sintetizada pelo método de precipitação. Os valores entre parênteses correspondem aos planos pertencentes aos ângulos de difração.

Em sequência a amostra foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura (Figura 29). Como mostrado na imagem a seguir (item A), as AgNPs apresentaram formas esféricas definidas. No histograma (item B) observou-se que as espessuras foram por volta de 30 a 40 nm. Os dados corroboram com a literatura, no qual assim como o formato circular encontrado nas imagens, o padrão da distribuição da espessura foi menor que 100 nm e com maior incidência por volta de 30 nm (ALMEIDA, 2016; GARCIA; LÓPEZ; MONGE, 2011; SOLOMON et al., 2007). Além disso, pode ser visto que as nanopartículas estão bem dispersas, sem agregação (BECARO et al., 2015).

No trabalho de Shahverdi et al. (2007) o histograma do tamanho das nanopartículas de prata mostrou tamanhos entre 5 e 32 nm, sendo que o tamanho com maior frequência foi 22,5 nm.

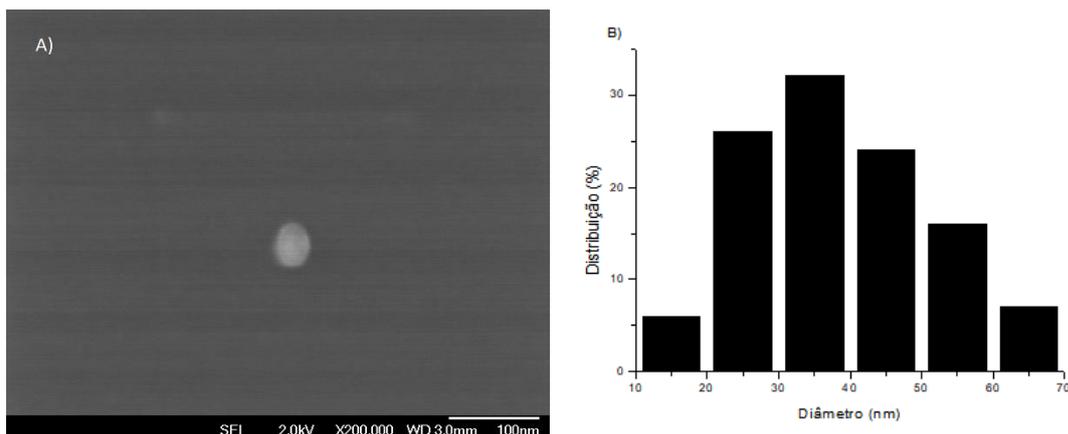


Figura 29: Síntese por precipitação de AgNPs. A) Imagem obtida pelo FEG. B) Distribuição das espessuras.

A seguinte caracterização realizada foi o FTIR para compreender melhor as interações moleculares da nanopartícula (Figura 30 e Tabela 5). Os picos de absorção relacionam-se aos modos de vibração de alguns grupos funcionais presentes nas nanopartículas. A banda #1 correspondente ao intervalo $3416 - 3338 \text{ cm}^{-1}$ é atribuída às vibrações de estiramento C-H e o O-H absorvido. Os picos em 1097 e 804 (#2 / #4) se referem à ligação Si-O. A banda #3 referente ao pico 952 cm^{-1} está relacionada ao modo de estiramento N-H dos grupos aminos. Enquanto a banda #5 (476 cm^{-1}) é característica da ligação Si-O-Si, evidenciando a absorção de SiO_2 e sua respectiva ligação à prata (MARCATO et al., 2013; NALLATHAMBI et al., 2011; NETO; RIBEIRO; ZUCOLOTTO, 2008; VELMURUGAN et al., 2011;). As análises do FTIR confirmam os resultados do DRX, sugerindo a formação de materiais cristalinos amorfos e a incorporação de Ag na matriz da sílica (SANTOS; LÔBO; CRUZ, 2014).

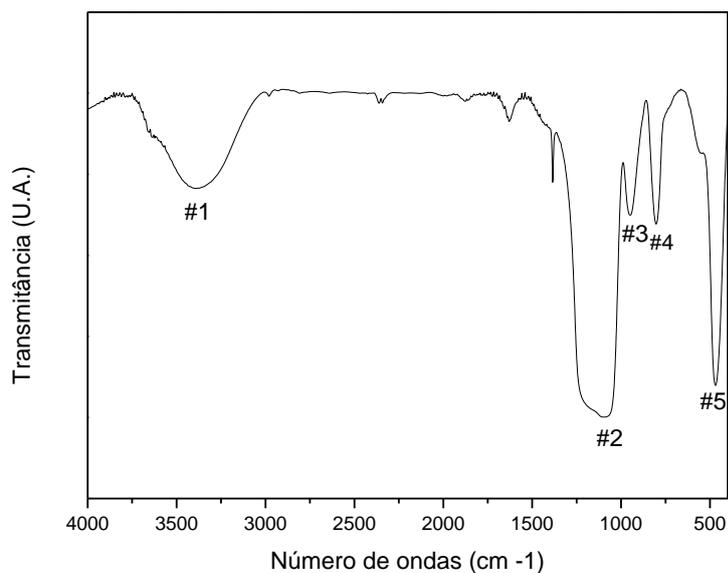


Figura 30: Imagem dos espectros de Ag obtidos pela espectroscopia com transformada de Fourier (FTIR).

Tabela 5: Atribuição das bandas provenientes do FTIR da síntese de AgNPs.

#	Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição das bandas
1	3416-3338	Estiramento C-H / O-H
2/4	1097 e 804	Ligação Si-O
3	952	Estiramento N-H
5	476	Si-O-Si / Ag

Por fim, a análise realizada foi do potencial Zeta, sendo que a média dos valores obtidos foi $29,6 \pm 0,2$ mV. O valor não foi igual/ superior a 30mV, porém próximo. De acordo com outros trabalhos isso demonstra uma amostra quase estável sem agregação de nanopartículas, fato que pode ser observado na imagem obtida pelo FEG (NETO, 2010; KIM et al., 2007; SADOWSKI et al., 2008).

5.2 Atividade antimicrobiana

5.2.1 Nanopartículas de ZnO

Teste de difusão em ágar

As nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas foram avaliadas quanto aos seus potenciais antimicrobianos. Para isso foi realizado o teste de difusão com todas as amostras e observados se houve ou não a formação dos halos de inibição, e se houve, qual foi o valor de seu diâmetro. Nas figuras a seguir pode-se visualizar a imagem das placas após serem incubadas na estufa $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por um período de 24 h (Figuras 31 e 32).

A síntese realizada pelo método de precipitação mostrou inibição de *S. aureus*; enquanto que a síntese realizada pelo método de ultrassom, a formação do halo de inibição ocorreu na *S. aureus*, todavia, apareceu um pequeno halo na *E. faecalis*. Ou seja, para as ZnONPs a formação da zona de inibição ao redor das nanopartículas ocorreu para a bactéria Gram-positiva, sendo que no método de ultrassom ocorreu para ambas as Gram-positivas, confirmando uma eficiência maior deste último método, provavelmente devido ao tamanho menor das nanopartículas obtidas. Segundo sugerido no trabalho de Azam et al. (2012), a atividade antimicrobiana dos nanomateriais aumentaram com o aumento da relação superfície/volume, devido à diminuição do tamanho das NPs.

Uma maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas para as nanopartículas de ZnO também foi constatado em outros trabalhos sugerindo uma forte afinidade entre as ZnONPs e as células bacterianas de *S. aureus* e *E. faecalis* (ADAMS et al., 2006; PREMANATHAN et al., 2011; REDDY et al., 2007; SAWAI, 2003).

Quanto as bactérias Gram-negativas não foi possível visualizar a formação de halos para essas nanopartículas nesse estudo realizado. Assim como constatado no estudo de Azam et al. (2012) e Premanathan et al. (2011), esse resultado pode ser indicativo de que as cepas Gram-negativas apresentam uma maior resistência/tolerância contra nanomateriais, como o ZnO. A influência do tamanho da partícula para *S. aureus* é menor do que para *E. coli*, reforçando o fato da maior resistência da bactéria Gram-negativa à ação da nanopartícula (YAMAMOTO, 2001).

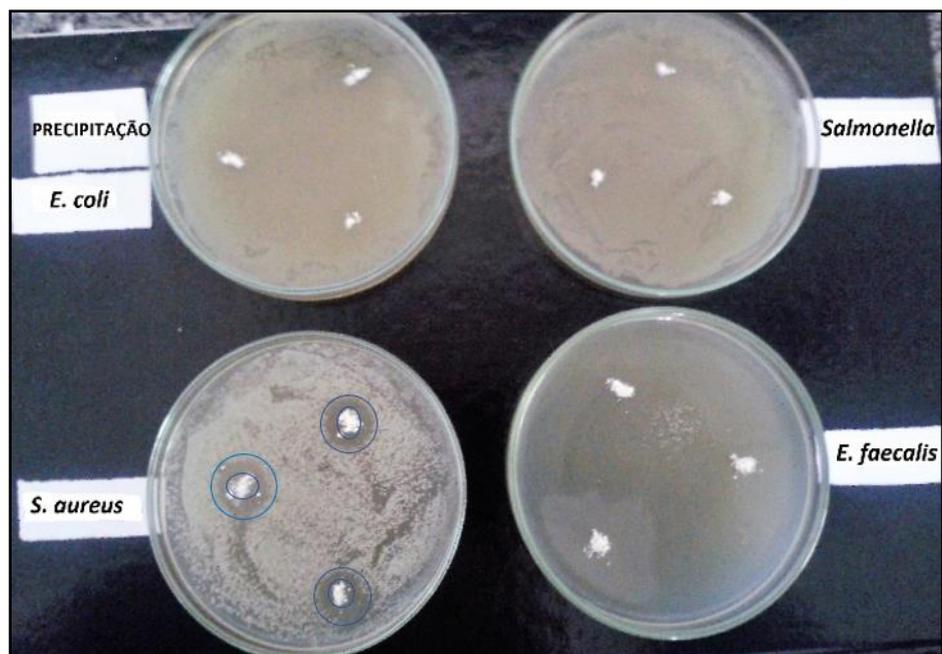


Figura 31: Teste do halo de inibição para a síntese 1 das ZnONPs (precipitação), evidenciando a formação do halo para bactérias *S. aureus*.

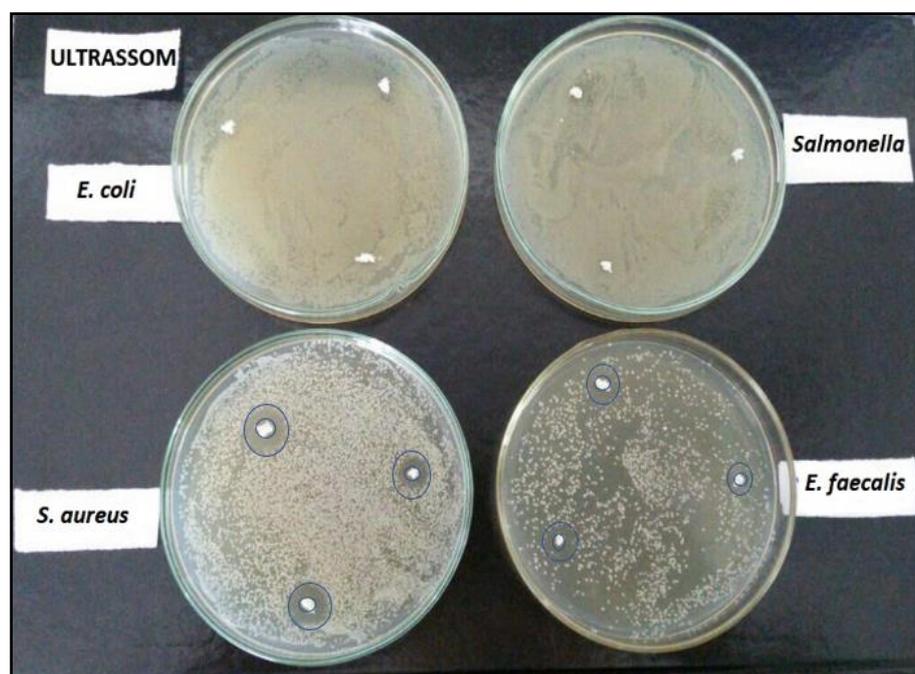


Figura 32: Teste do halo de inibição para a síntese 2 das ZnONPs (ultrassom), evidenciando a formação do halo para bactéria *S. aureus* e para *E. faecalis*.

Na Tabela 6 consta a média dos valores obtidos dos diâmetros nas bactérias que formaram os halos de inibição.

Tabela 6: Média dos diâmetros (mm) dos halos de inibição das sínteses de ZnONPs. O símbolo (-) significa ausência (não foi possível visualizar).

Síntese	Bactérias			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
Precipitação	14 mm ± 0,05	-	-	-
Ultrassom	12 mm ± 0,05	5 mm ± 0,05	-	-

Teste de agitação em frasco

O teste de agitação em frasco foi realizado com as nanopartículas de ZnO sintetizadas pelo método de ultrassom. A contagem das colônias de bactérias para o controle (C0) foi realizada na diluição 10^{-8} ; para C1 (100 $\mu\text{g/ml}$) foi na diluição 10^{-6} ; para C2 (200 $\mu\text{g/ml}$) na diluição 10^{-4} ; enquanto para C3 (500 $\mu\text{g/ml}$) na 10^{-3} . Ou seja, podemos observar uma diminuição gradativa da diluição em que houve a contagem em relação ao aumento da concentração de nanopartícula.

Na Figura 33 segue o gráfico gerado por meio da análise estatística dos resultados obtidos com a contagem das colônias da bactéria *S. aureus* sob ação das nanopartículas de ZnO. Por meio da análise do gráfico é possível interpretar em dados o que foi visualizado no plaqueamento a cima. A porcentagem de inibição na concentração C1 em relação ao controle foi em torno de 99 %, chegando a aproximadamente 100% na C3, porém, um pouco menos que 350 $\mu\text{g/ml}$ já era possível chegar nessa porcentagem máxima. Ou seja, o teste de agitação em frasco com nanopartículas de ZnO para a bactéria *S. aureus* foi possível obter resultados satisfatórios de inibição, compatível com os resultados de Jones et al. (2008).

De acordo com os estudos de Jones e colaboradores (2008), nanopartículas de ZnO com tamanho de partículas menores (por volta de 8 nm de diâmetro) apresentaram mais de 95% de inibição do crescimento de *S. aureus* a uma concentração de 80 $\mu\text{g/ml}$; enquanto que nanopartículas maiores (50-70 nm) mostraram apenas 40% de inibição a uma concentração de 400 $\mu\text{g/ml}$. Ou seja, apesar da concentração de nanopartículas interferirem na atividade antimicrobiana, o tamanho das nanopartículas também afetam.

No trabalho de Navale et al. (2015) no teste para verificar a atividade antimicrobiana, a bactéria *S. aureus* foi incubada por um período de 4 h com diferentes concentrações de ZnO. De acordo com a contagem de células viáveis, a *S. aureus* perdeu

sua viabilidade a 60 e 100 µg/ml de ZnONPs, apresentando uma perda de 95% de sua viabilidade em relação ao controle.

Nos estudos de Raghupathi e colaboradores (2011), as células viáveis de *S. aureus* foram determinadas por plaqueamento de culturas das células na concentração de 480 µg/ml de ZnONPs de tamanhos diferentes de NPs. Conforme o tamanho das nanopartículas diminuem, a porcentagem de células viáveis também decresce. Quando a NP tem um diâmetro de 12 nm, a redução das células viáveis chega a quase 90% em relação ao controle.

Existem duas condições para a interação entre ZnO e *S. aureus*: a afinidade da nanopartícula com a membrana da bactéria e a sensibilidade desse microrganismo ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂. Alguns trabalhos indicam que nanopartículas de ZnO geram água oxigenada, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ROS), e uma área de superfície maior da NP resultará em mais ROS na superfície do ZnO e, portanto, uma maior atividade antimicrobiana (OHIRA et al., 2008). Segundo Russel (2003), bactérias Gram-negativas mostraram menor sensibilidade a espécies reativas de oxigênio (ROS) quando comparado a bactérias Gram-positivas. Uma das principais razões para esta maior resistência é a diferença estrutural na membrana de ambas as bactérias (PADMAVATHY E VIJAYARAGHAVAN, 2008; YAMAMOTO, 2001).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produtos naturais do metabolismo de organismos respiradores. Enquanto níveis pequenos podem ser controlados pelas defesas antioxidantes das células, um excesso da produção de ROS pode conduzir a um estresse oxidativo. A adição de radicais livres pode atacar lipídios da membrana e ocasionar uma ruptura desta e prejudicar a função mitocondrial ou causar danos ao DNA (GOMAA, 2016; KIM et al., 2007; NEL et al., 2006).

Baseando-se nos estudos de Raghupathi et al. (2011) e Roseli et al. (2003), tanto a produção de ROS como a acumulação ou deposição de ZnONPs na superfície de *S. aureus* ou no citoplasma leva a inibição do crescimento bacteriano ou a morte celular.

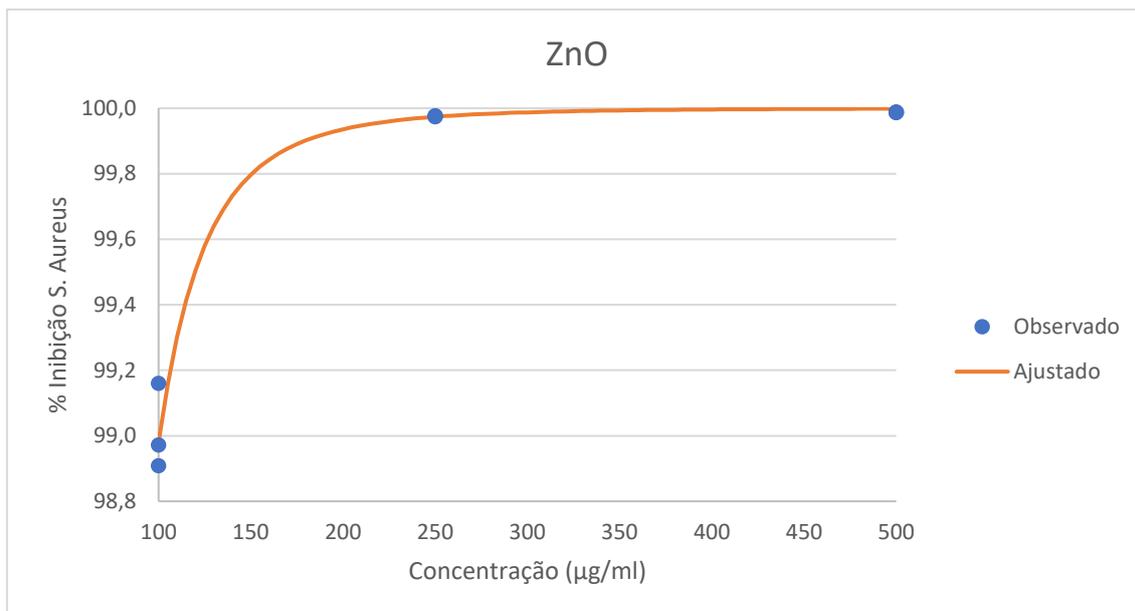


Figura 33: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria *S. aureus* em relação ao controle nas diferentes concentrações de ZnONPs utilizadas no experimento.

Para bactéria *E. coli*, a contagem de colônias no controle (C0) foi realizada na diluição 10^{-8} , assim como para a C1. Na C2 e na C3 a contagem foi na diluição 10^{-7} . Já é possível observar uma grande diferença entre os resultados obtidos com o plaqueamento da *S.aureus*, evidenciando uma menor inibição com a *E. coli*.

Segundo o estudo de Zhang et al. (2008) e Stoimenov et al. (2002) a interação entre as ZnONPs e a *E. coli* são causadas por forças eletrostáticas. A carga das células bacterianas é negativa, devido ao excesso de grupos carboxílicos que são dissociados e fornecem uma carga negativa para a superfície da célula. Por outro lado, as nanopartículas de ZnO têm uma carga positiva, com Potencial Zeta entre 26 e 14 mV. Como resultado, cargas opostas entre a bactéria e a nanopartícula geram forças eletrostáticas levando a uma forte ligação e conseqüentemente ocasionando danos na membrana celular. Além disso, após a interação há uma ruptura da parede celular e a internalização das nanopartículas nas células bacterianas, causando danos como paredes celulares desorganizadas, morfologia alterada, vazamento intracelular, indução do estresse oxidativo, resultando na inibição do crescimento e eventualmente, na morte celular em alguns casos (BRAYNER et al., 2006; HUANG et al., 2008; XIE et al., 2011).

O gráfico gerado por meio da análise estatística dos resultados obtidos com a contagem das colônias da bactéria *E. coli* sob ação das nanopartículas de ZnO pode ser visualizado a seguir (Figura 34). A porcentagem de inibição para a C1 em relação ao

controle foi em torno de 55%, para a C2 70% e para a C3 não chega a 90%. Ou seja, baseando no valor ajustado, para chegar a uma inibição de aproximadamente 100% é necessária uma elevada concentração de nanopartícula, a cima de 500 µg/ml.

Os resultados são consistentes com outros estudos nos quais as nanopartículas de ZnO exibiram uma crescente atividade antimicrobiana contra a *E. coli* conforme o aumento da concentração de NPs. No estudo de Liu et al. (2009) concentrações superiores a 240 µg/ml pode inibir significativamente o crescimento da bactéria *E. coli* por volta de 80%. A eficácia inibitória das ZnONPs está relacionada diretamente com as concentrações de NP, assim como com o seu tamanho diminuto (BRAYNER et al., 2006; LIU et al., 2009; ZHANG et al., 2007).

Uma outra possível explicação para o aumento da resistência à atividade do ZnO observada na *E. coli* quando comparada com a *S. aureus* é devido a diferenças na polaridade da membrana celular, uma vez que a *S. aureus* tem menos carga negativa do que a *E. coli*. Logo, isso permitiria um maior nível de penetração de radicais livres carregados negativamente, como íons de peróxido, que causam danos e morte celular em *S. aureus* em concentrações abaixo da necessária para causar o mesmo efeito na *E. coli* (SONOHARA et al., 1995; GORDON et al., 2011).

A não inibição das bactérias Gram-negativas observado nos resultados, pode ser influenciada pela concentração das nanopartículas. No estudo de Reddy et al. (2007) sobre a toxicidade das nanopartículas de ZnO em *E. coli* e *S. aureus*, os resultados mostraram que para a inibição do crescimento da *E. coli* foi necessário concentrações maiores que 3,4 mM, enquanto que o crescimento de *S. aureus* foi completamente inibido em concentrações maiores que 1mM. No trabalho de Xie et al. (2011), para *E. coli* e *Salmonella*, concentrações maiores das nanopartículas ZnO foram necessárias para redução de células viáveis.

Segundo Raghupathi e colaboradores (2011), as nanopartículas de ZnO são capazes de retardar o crescimento da *E. coli* devido à desorganização da membrana bacteriana que aumenta a sua permeabilidade levando ao acúmulo de NPs na região intracelular.

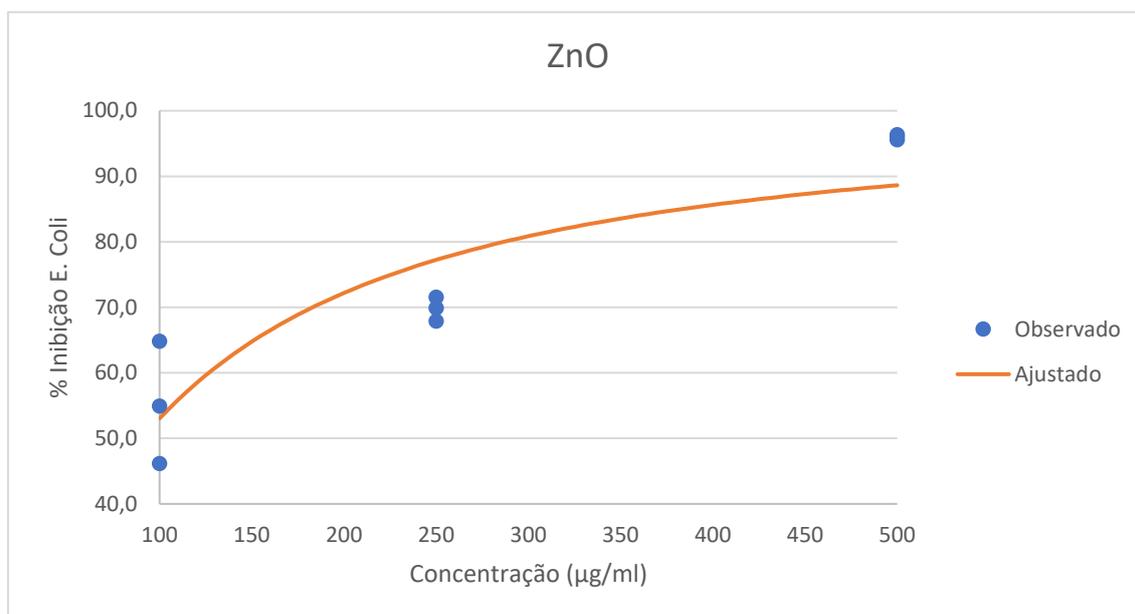


Figura 34: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria *E. coli* em relação ao controle nas diferentes concentrações de ZnONPs utilizadas no experimento.

5.2.2 Nanopartículas de CuO

Teste de difusão em ágar

Da mesma forma que para as nanopartículas de óxido de zinco, a seguir são apresentados os resultados do teste de difusão para avaliação do potencial antimicrobiano das nanopartículas de CuO. As imagens abaixo se referem às sínteses realizadas (precipitação, ultrassom 2 h e 3 h e hidrotérmal) mostrando o resultado das placas de Petri após a incubação (Figuras 35 a 38).

A síntese realizada pelo método de hidrotérmal mostrou inibição nas bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*, ou seja, em ambas Gram-positivas. Já as sínteses realizadas pelo método de precipitação e ultrassom (3 h e 2 h) mostraram a formação do halo de inibição nas bactérias Gram-positivas e levemente na *E. coli*, uma Gram-negativa. Dessa maneira, dentre os métodos, os que mais se destacam foram os realizados por precipitação e ultrassom.

Os resultados foram similares com os encontrados para as nanopartículas de ZnO, no qual o tamanho das nanopartículas estão diretamente relacionados com o aumento da atividade antimicrobiana, destacando que os métodos de ultrassom obtiveram nanopartículas menores em relação aos demais (AZAM et al., 2012). O efeito foi mais

pronunciado para as bactérias Gram-positivas, assim como nos experimentos de Azam et al. (2012) sugerindo uma maior sensibilidade dessas bactérias em comparação as Gram-negativas com os nanomateriais testados.

A presença de uma zona de inibição indica que o mecanismo de ação das nanopartículas de CuO envolve a interação eletrostática e a ruptura da integridade da membrana bacteriana (HARIKUMAR; ARAVIND, 2016; THILL et al., 2006).

No trabalho de Ahamed (2014), as nanopartículas de CuO foram testadas sobre uma gama de bactérias para o teste de difusão e alguns mostraram mais sensibilidade do que outras, como a *E. faecalis*.

Para Azam e colaboradores (2012), o tamanho da nanopartícula está estritamente relacionado com a formação da zona de inibição e seu respectivo diâmetro. Em seu trabalho nanopartículas menores (tamanho de partícula $20 \pm 1,24$ nm), obtiveram halos de inibição maior, em destaque para a bactéria *S. aureus*. Semelhante ao que foi obtido neste trabalho, as nanopartícula de menores tamanhos obtidas pelo método de ultrassom mostraram uma zona de inibição maior e também um efeito sobre mais bactérias.

A variação na sensibilidade ou resistência entre as bactérias Gram-positivas e negativas devem estar relacionados às diferenças na estrutura celular, a fisiologia, metabolismo, assim como ao grau de contato dos microrganismos com as nanopartículas. Por exemplo, a maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas as CuONPs tem sido atribuída à maior abundância de aminas e grupos carboxila na superfície celular e maior afinidade do cobre por esses grupos. As bactérias Gram-negativas, como no caso a *E. coli* e a *Salmonella*, tem uma membrana externa à parede celular que possui uma importante capacidade de resistir a agentes antimicrobianos (BEVERIDGE; MURRAY, 1980; LIANG et al., 2012). Além disso, outros fatores como a taxa de difusão de nanopartículas também podem afetar a deformação bacteriana de forma diferente (AZAM et al., 2012).

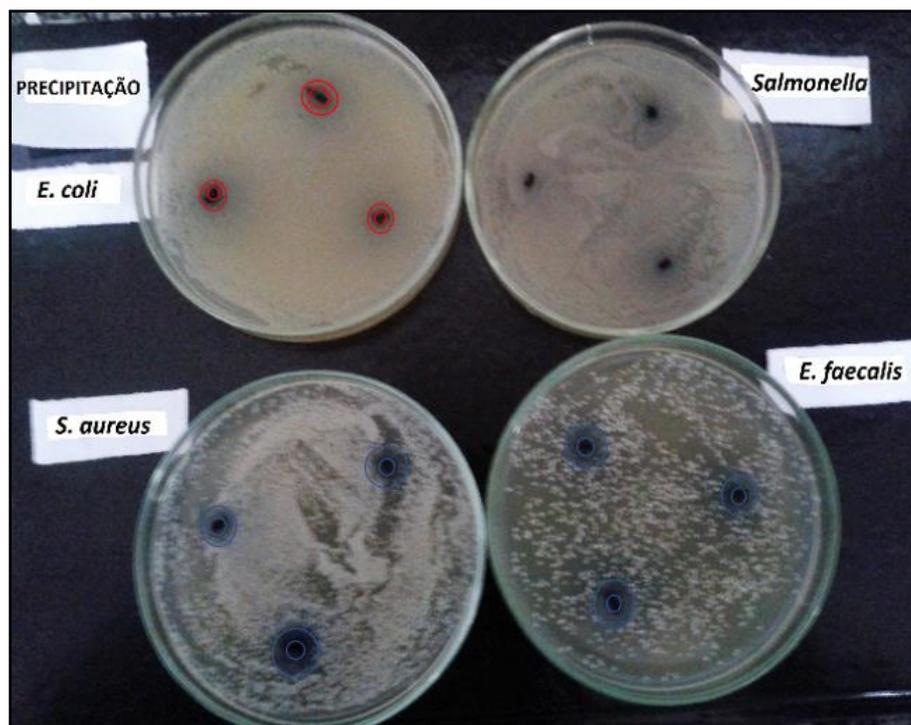


Figura 35: Teste do halo de inibição para a síntese 1 das CuONPs (precipitação), evidenciando a formação do halo para a bactéria *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*.



Figura 36: Teste do halo de inibição para a síntese 2 das CuONPs (hidrotermal), evidenciando a formação do halo para a bactéria *S. aureus* e *E. faecalis*.

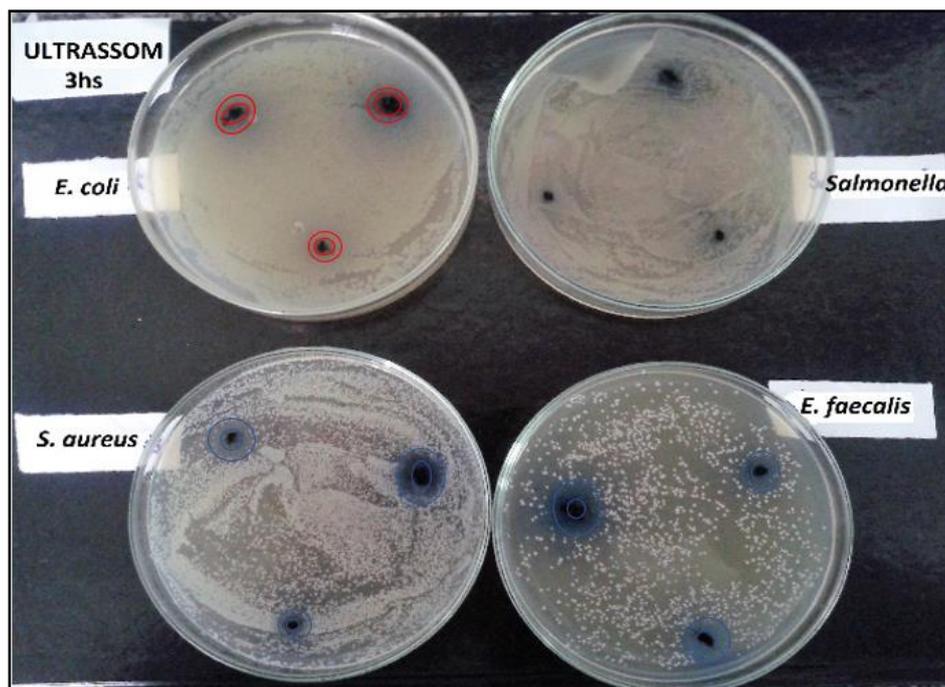


Figura 37: Teste do halo de inibição para a síntese 3 das CuONPs (ultrassom 3 h), evidenciando a formação do halo para a bactéria *S. aureus*, *E. faecalis* e para *E. coli*.

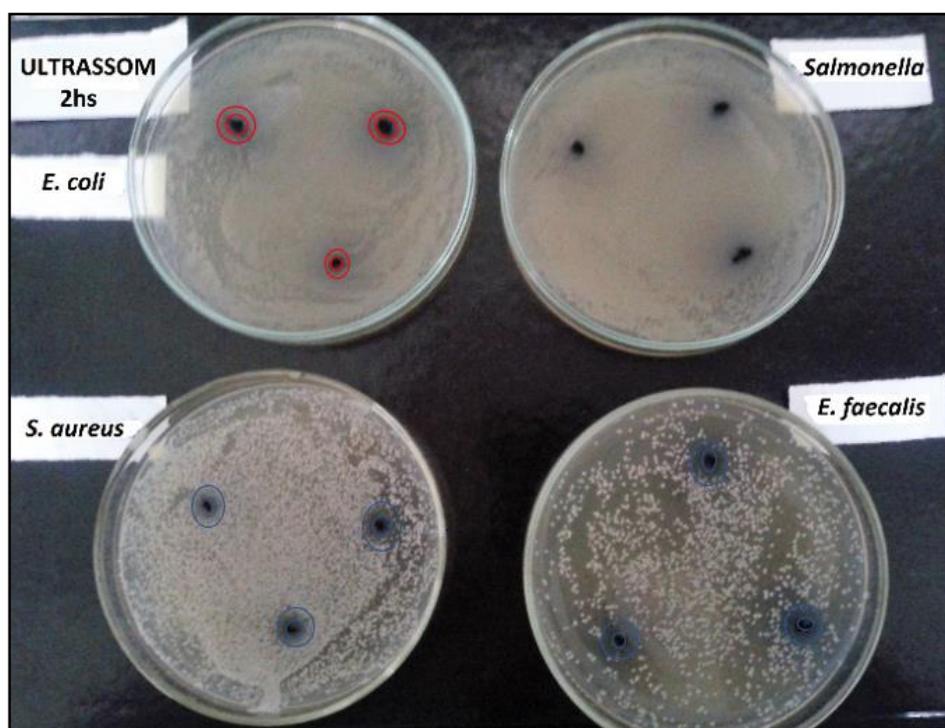


Figura 38: Teste do halo de inibição para a síntese 4 das CuONPs (ultrassom 2 h), evidenciando a formação do halo para a bactéria *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*.

Na Tabela 7 constam os valores obtidos dos diâmetros medidos nas bactérias que formaram os halos de inibição.

Tabela 7: Média dos diâmetros (mm) dos halos de inibição das sínteses de CuONPs. O símbolo (-) significa ausência (não foi possível visualizar).

Síntese	Bactérias			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
Precipitação	8,8 mm ± 0,05	10,8 mm ± 0,05	4,5 mm ± 0,05	-
Hidrotermal	6,8 mm ± 0,05	10 mm ± 0,05	-	-
Ultrassom 3 h	9,6 mm ± 0,05	13 mm ± 0,05	4,8 mm ± 0,05	-
Ultrassom 2 h	6,6 mm ± 0,05	7,8 mm ± 0,05	5,2 mm ± 0,05	-

Teste de agitação em frasco

O teste de agitação em frasco foi realizado com as nanopartículas de CuO sintetizadas pelo método de ultrassom 2 h. Para o controle (C0) as colônias de bactérias foram contadas na diluição 10^{-7} ; para a C1 foi na diluição 10^{-4} ; enquanto que para a C2 e C3 a contagem foi na diluição 10^{-3} . Já é possível observar uma inibição gradativa em relação ao controle.

Na Figura 39 temos o gráfico gerado por meio da análise estatística dos resultados obtidos com a contagem das colônias da bactéria *S. aureus* sob ação das nanopartículas de CuO. Para a concentração inicial utilizada (C1) a inibição em relação ao controle já é elevada; enquanto para C2 e C3, a inibição é aproximadamente 100%.

No trabalho de Das e colaboradores (2013) foi realizado uma curva de crescimento bacteriano para *S. aureus* a concentrações de 1mg/ml, 2,5mg/ml e 4mg/ml de nanopartículas de CuO monitorada de 3 em 3 h. No caso houve um retardo do crescimento bacteriano nessas concentrações após 9h.

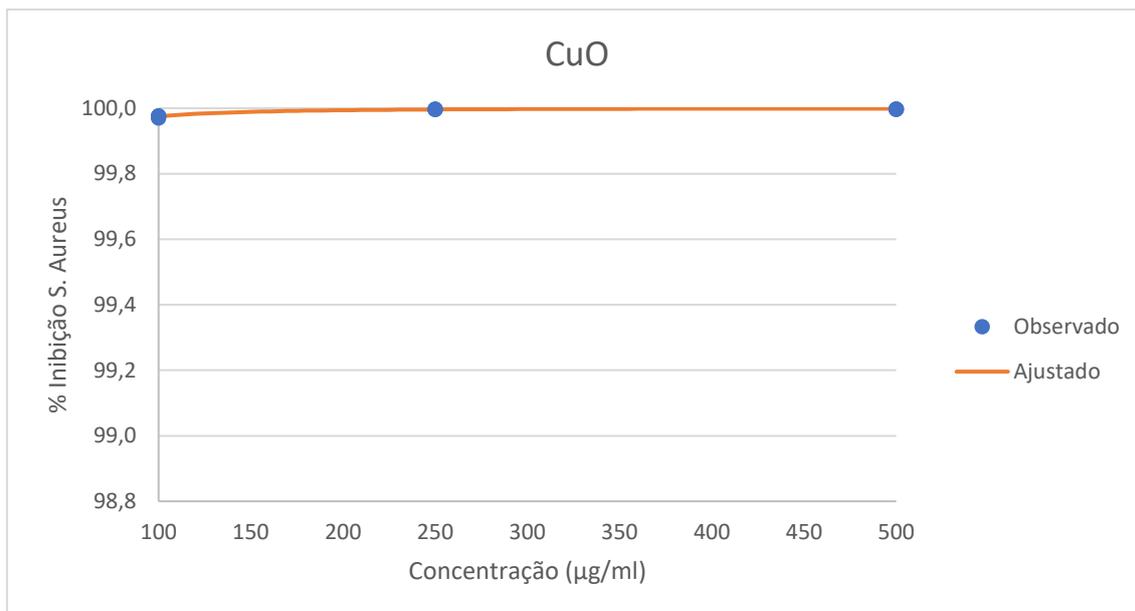


Figura 39: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria *S. aureus* em relação ao controle nas diferentes concentrações de ZnONPs utilizadas no experimento.

Para *E. coli*, a contagem das colônias para o controle (C0) foi na diluição 10^{-8} ; enquanto para as concentrações C1, C2 e C3 a contagem foi realizada na diluição 10^{-7} . Observa-se também, assim como nas nanopartículas de ZnO, uma grande diferença de inibição.

O gráfico gerado por meio da análise estatística dos resultados obtidos com a contagem das colônias da bactéria *E. coli* sob ação das nanopartículas de CuO pode ser visualizado a seguir (Figura 40). Para a concentração inicial de 100 µg/ml a inibição em relação ao controle foi em torno de 75 % (um pouco a mais em relação a nanopartícula de ZnO); para a C2 temos uma inibição de 83% (para ZnONPs foi de 70%); enquanto na C3 observamos uma inibição de 90% (não chegou a 90% para as ZnONPs).

A atividade das nanopartículas de cobre depende da combinação de vários fatores, como a concentração de NPs e a concentração bacteriana. Uma pureza elevada da NP, diminui a aglomeração e aumenta seu efeito antimicrobiano. A menor aglomeração fornece um aumento da área de superfície disponível para a interação com as membranas bacterianas carregadas negativamente e as de íons de cobre. Esta interação leva a ruptura da membrana e a desnaturação de proteínas. Os íons de cobre dentro das células bacterianas podem se ligar as moléculas do DNA, desorganizando a sua estrutura (HOSSEINKHANI et al., 2010; ZARCHI et al., 2010). Os íons estimulam o desenvolvimento de formas reativas de oxigênio que causam mais danos às células

bacterianas (DUPONT; GRASS; RENSING, 2011; KIM et al., 2000; KOCH et al., 2005; STOHS; BAGCHI, 1995; WANG et al., 2011).

A superfície das células bacterianas tem uma abundância de grupos amina e carboxila e o cobre tem uma alta afinidade por estes grupos (PANDIYARAJAN et al., 2013).

No trabalho de Das e colaboradores (2013), o retardo do crescimento bacteriano para *E. coli* ocorreu com uma concentração de 1mg/ml, após 9 h de incubação. E para uma concentração de 4mg/ml aconteceu após 3 h em relação ao controle. Apesar da inibição ocorrer em um período menor de tempo, vale ressaltar que a concentração foi mais elevada em relação as realizadas no atual trabalho. O efeito antibacteriano das nanopartículas de CuO aumenta conforme a concentração se eleva, provavelmente devido a quantidade maior de radicais livres em contato com a membrana bacteriana ocasionado a ruptura (DAS et al., 2013; PANDIYARAJAN et al., 2013; RES et al., 2009).

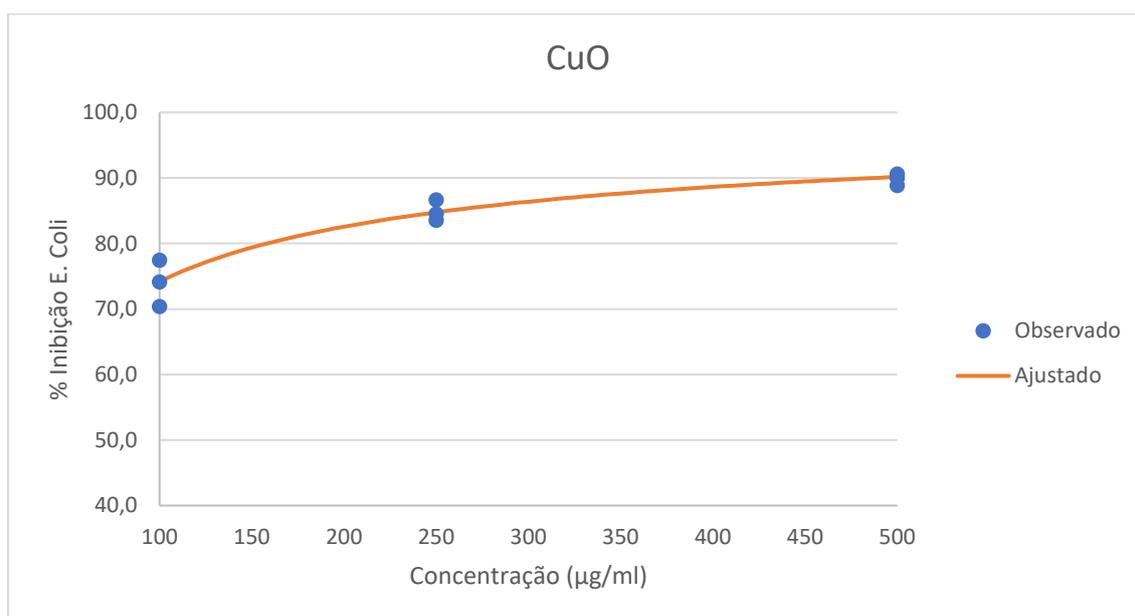


Figura 40: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria *E. coli* em relação ao controle nas diferentes concentrações de CuONPs utilizadas no experimento.

5.2.3 Nanopartículas de Ag

Teste de difusão em ágar

O resultado do teste de difusão para as nanopartículas de prata pode ser visualizado na Figura 41. A síntese realizada mostrou a formação de um nítido halo de

inibição em ambas as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *E. faecalis*. Enquanto para as bactérias Gram-negativas, *E. coli* e *Salmonella*, pode-se observar a formação de um sútil halo de inibição. Em seguida, na Tabela 8, estão os valores da média dos diâmetros dos halos de inibição.

Nos estudos de Gomma (2017) para avaliação da atividade antimicrobiana das AgNPs, a formação do halo de inibição para a bactéria *S. aureus* foi de $17 \text{ mm} \pm 0,16$; enquanto para *E. coli* foi de $15 \text{ mm} \pm 0,3$ e para *Salmonella* $12 \text{ mm} \pm 0,02$. Uma sensibilidade mais elevada foi verificada para a bactéria *S. aureus*. Segundo Gomma (2017) e Pal e colaboradores (2007), a eficácia das nanopartículas de prata pode ser atribuída ao pequeno tamanho da NP e conseqüentemente uma maior área superficial, sendo que a média do tamanho das nanopartículas de prata obtidas foi por volta de 18 nm.

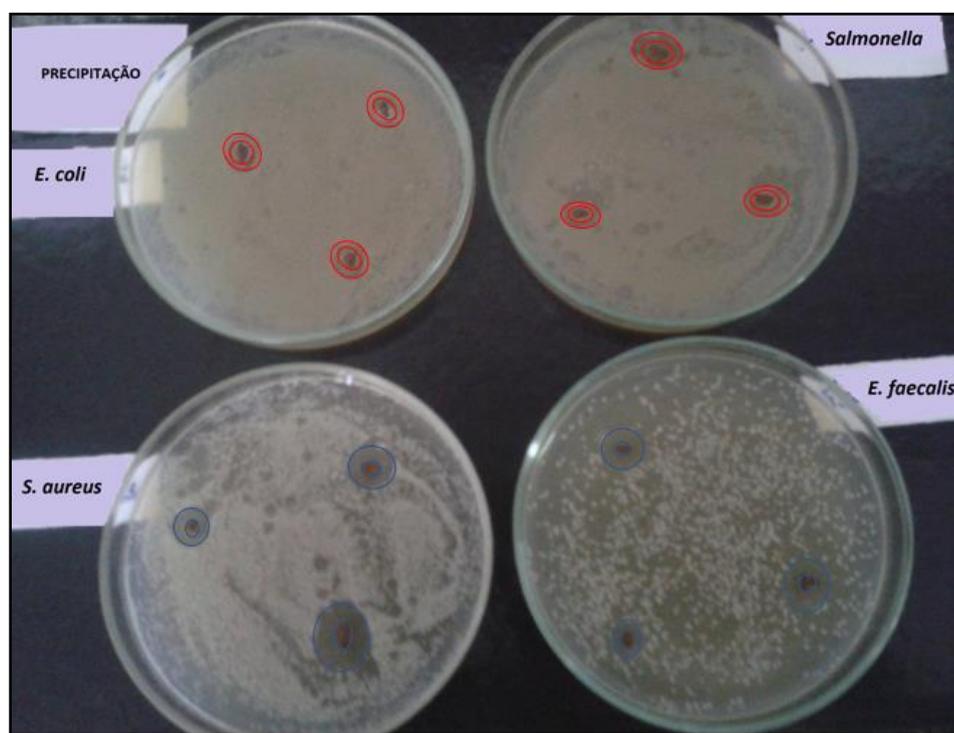


Figura 41: Teste do halo de inibição para a síntese de AgNPs, evidenciando a formação do halo de inibição para as bactérias Gram-positivas (azul) e para as bactérias Gram-negativas (vermelho).

Tabela 8: Média dos diâmetros (mm) dos halos de inibição da síntese de AgNPs.

Síntese	Bactérias			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
Precipitação	$12,4 \text{ mm} \pm 0,05$	$9,7 \text{ mm} \pm 0,05$	$8,6 \text{ mm} \pm 0,05$	$8,1 \text{ mm} \pm 0,05$

Teste de agitação em frasco

O teste de agitação em frasco foi realizado com as nanopartículas de Ag sintetizadas pelo método de precipitação. Para o controle (C0) a contagem das colônias foi realizada na diluição 10^{-8} ; para a C1 foi na diluição 10^{-5} ; já para a C2 e C3, na diluição 10^{-4} . Ou seja, houve também uma inibição gradativa em relação ao controle.

O gráfico gerado por meio da análise estatística dos resultados obtidos com a contagem das colônias da bactéria *S. aureus* sob ação das nanopartículas de Ag pode ser visualizado a seguir (Figura 42). A concentração C1 teve uma elevada inibição em relação ao controle, menos que 100%, enquanto nas outras concentrações, C2 e C3 já obtivemos uma inibição de aproximadamente 100%. Mas com uma concentração em torno de 180 $\mu\text{g/ml}$ já seria possível obter uma inibição máxima.

Nos estudos de Dúran e colaboradores (2010), a atividade inibitória das nanopartículas de prata no crescimento da bactéria *S. aureus* foi significativa em concentrações maiores que 260 $\mu\text{g/ml}$ de NPs. Este estudo também sugeriu que a geração de radicais livres está envolvida com o mecanismo de ação das nanopartículas de Ag, devido ao estresse oxidativo que causa à bactéria (LOK et al., 2006; KIM et al., 2007). A maior eficiência das nanopartículas de prata é devido à maior área de superfície disponível para as interações (DURÁN et al., 2010; GADE et al., 2008). A penetração da nanopartícula na parede celular da bactéria é depende do seu tamanho e essa facilidade da penetração foi observada também em outros estudos, como o de Baker et al. (2005), Choi e Hu (2008), Morones et al. (2005) e Sondi e Salopek-Sondi (2004).

Alguns trabalhos apontam que os possíveis alvos moleculares dos íons de prata podem ser os grupos tiol, principais enzimas respiratórias. A porção fosfolipídica da membrana bacteriana também é um possível local de ação das AgNPs (DURÁN et al., 2010; LOK et al., 2006).

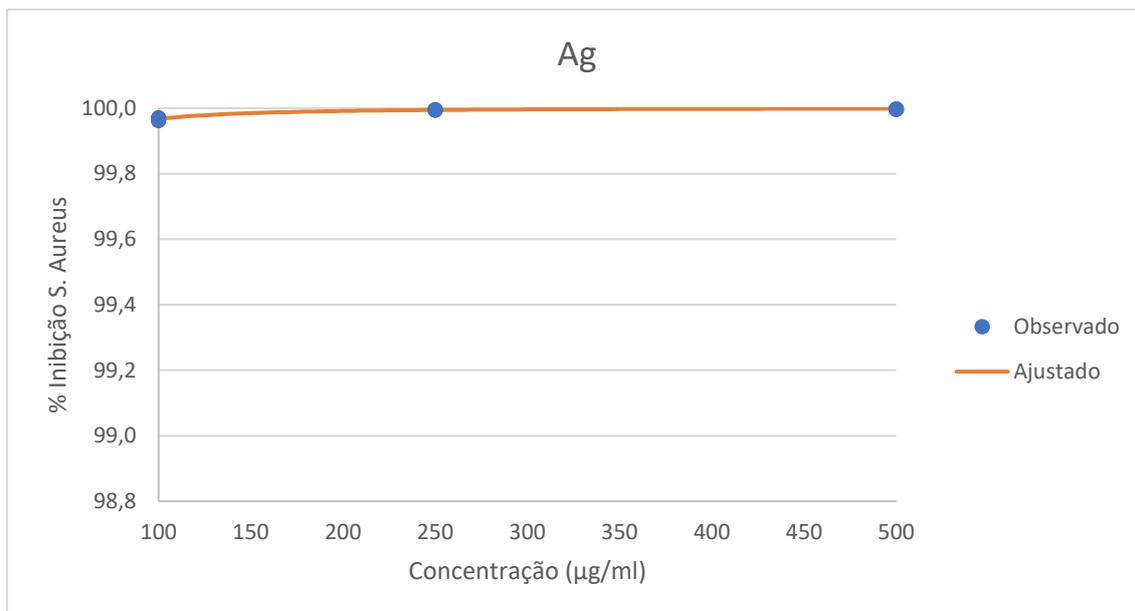


Figura 42: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria *S. aureus* em relação ao controle nas diferentes concentrações de AgNPs utilizadas no experimento.

Com relação a bactéria *E. coli*, para o controle, a contagem das colônias de bactérias foi realizada na diluição 10^{-8} , enquanto para as concentrações C1, C2 e C3 foi na diluição 10^{-7} . Ou seja, uma inibição menor do que o resultado obtido com a bactéria *S. aureus*.

O gráfico da análise estatística dos resultados obtidos com a contagem das colônias da bactéria *E. coli* sob ação das nanopartículas de Ag pode ser visualizado a seguir (Figura 43). Para a C1 foi obtido uma inibição em relação ao controle em torno de 45% (menor do que as demais nanopartículas), para a C2 em torno de 73% de inibição (quase igual à do ZnO) e na C3 uma inibição de quase 90% (mesmo padrão das demais nanopartículas).

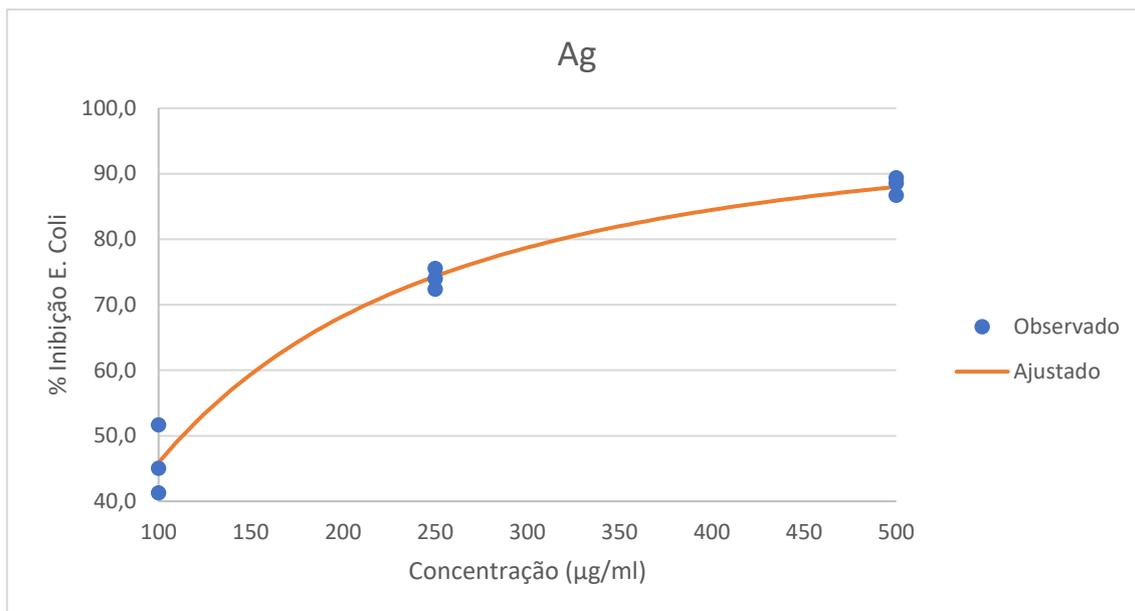


Figura 43: Gráfico da porcentagem de inibição da bactéria *E. coli* em relação ao controle nas diferentes concentrações de AgNPs utilizadas no experimento.

No trabalho de Morones et al. (2005) foi demonstrado que a concentração de nanopartículas de Ag para inibir o crescimento bacteriano varia de acordo com o tipo de bactéria. Mas todas as bactérias utilizadas em seu estudo, dentre elas a *E. coli*, não apresentaram um crescimento significativo em concentrações de NPs acima de 75 µg/ml. Também afirmam que a atividade antimicrobiana das AgNPs é dependente do tamanho, em seu trabalho obtiveram NPs por volta de 10-20 nm.

No trabalho de Gomma (2017) a avaliação da atividade de nanopartícula de Ag mostrou que o crescimento bacteriano tanto da *E. coli* como da *S. aureus* tratadas com 25 µg/ml de AgNPs foi ligeiramente inferior que o controle, enquanto que quando tratadas com 50 e 100 µg/ml de NPs, o crescimento bacteriano foi grandemente inibido.

Nos estudos de Sondi e Salopek-Sondi (2004), diferentes concentrações de nanopartículas de Ag foram avaliadas em relação ao número de colônias formadas pela bactéria *E. coli* e a influência em seu respectivo crescimento. A concentração de 10 µg/ml inibiu 70% do crescimento bacteriano; e uma concentração de 50-60 µg/ml causou 100% de inibição. Em seu estudo as nanopartículas de prata apresentaram um tamanho de 12 nm de diâmetro. Há relatos na literatura que a atração eletrostática entre as bactérias carregadas negativamente e as nanopartículas carregadas positivamente é considerado um mecanismo importante para a atividade antimicrobiana de nanomateriais como a prata. (HAMOUDA; BAKER, 2000; STOHS; BAGCHI, 1995; STOIMENOV et al., 2002).

Quando a *E. coli* é tratada com nanopartículas de óxido de metais a membrana bacteriana mostra um aumento significativo da permeabilidade, sendo que a célula se torna incapaz de regular o transporte. A membrana externa presente na *E. coli* fornece uma barreira de permeabilidade eficaz (SONDI; SALOPEK-SONDI 2004).

Feng e colaboradores (2000) observaram que a membrana celular se destacou da parede celular bacteriana e formou lacunas em sua extensão quando colocou cepas de *E. coli* e *S. aureus* em contato com íons de prata.

A ação antimicrobiana está relacionada com as diferenças estruturais entre as Gram-positivas e Gram-negativas, devido à espessura da camada de peptidoglicano. As bactérias Gram-positivas exibem uma camada de cerce de 30 nm, enquanto as negativas possuem uma camada fina, porém exibem uma membrana externa (BECARO et al., 2015)

Para o mecanismo de ação, Sondi e Salopek-Sondi, verificaram que as AgNPs têm propensão em ancorar na parede celular bacteriana onde em seguida a penetra, causando alterações estruturais na membrana celular, como a permeabilidade e a morte da célula. Esta ação resulta na formação de “poços” na superfície celular, a qual é encontrada acumulação de nanopartículas (PRABHU; POULOSE, 2012).

Danicauk e colaboradores (2006) propuseram que o fato das AgNPs formarem radicais livres também pode ser considerado um mecanismo de ação. Ao entrar em contato com as bactérias a Ag forma radicais livres, e estes têm a habilidade de danificar a membrana celular, tornando-a poroso e conseqüentemente levando a morte celular (KIM et al., 2007).

A liberação dos íons de Ag pela nanopartículas pode interagir com o grupo tiol de várias enzimas vitais as inativando-as, além disso, as células bacterianas ao entrar em contato com a Ag absorvem íons, a qual inibe as funções celulares (PRABHU; POULOSE, 2012; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004).

A membrana das bactérias é conhecida por conter muitas proteínas contendo enxofre, estes podem ser locais preferenciais para as AgNPs. Por outro lado, nanopartículas encontradas no interior também tendem a reagir com outras proteínas contendo enxofre, bem como com compostos contendo fósforo, como o DNA. A interação das NPs com o enxofre e fósforo do DNA pode levar a problemas na replicação e por fim, a morte celular. (FENG et al., 2000; PRABHU; POULOSE, 2012).

As mudanças na morfologia apresentadas na membrana bacteriana, bem como os possíveis danos causado pelas AgNPs que reagem com o DNA afetará processos como a cadeia respiratória, podendo ocasionar a morte celular (MORONES et al., 2005).

Alguns estudos sobre o mecanismo de ação dos íons de prata (Ag^+) em bactérias relatam que o efeito inibitório do Ag^+ está relacionado também com a atração eletrostática entre a parede celular carregada negativamente e a carga positiva dos íons (DIBROV, 2002; KIM et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados na seção anterior, na literatura utilizada e nos objetivos propostos, pode se concluir que:

- As sínteses que apresentaram menores nanopartículas foram: ultrassom para ZnONPs (15 nm); ultrassom 2 h para CuONPs (10 nm) e precipitação para AgNPs (35 nm).
- A atividade antimicrobiana das nanopartículas utilizadas mostraram maior inibição para as bactérias Gram-positivas em relação as Gram-negativas em ambos os testes.
- No teste de difusão (teste qualitativo), apenas as AgNPs formaram halos para todas as bactérias estudadas.
- No teste de agitação em frasco (teste quantitativo) para *S. aureus* as nanopartículas testadas obtiveram uma inibição de aproximadamente 100% em relação ao controle com uma concentração menor para CuO e AgNPs. Para a *E. coli* com a maior concentração estudada das NPs, foi possível uma inibição por volta de 90% em relação ao controle para as três NPs.
- Assim como a Ag, as nanopartículas testadas de ZnO e CuO mostraram-se como potenciais agentes antimicrobianos.
- As NPs testadas podem ser consideradas de grande importância com o propósito de investir em processos que retardam/inibem o crescimento de microrganismos, aplicando no desenvolvimento de embalagens antimicrobianas para o armazenamento de alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMED, M.; ALHADLAQ, H. A.; KHAN, M. A. M.; KARUPPIAH, P.; AL-DHABI, N. A. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of copper oxide nanoparticles. Hindawi Publishing Corporation. **Journal of Nanomaterials**. Volume 2014, Article ID 637858, 2014.

AL-HOLY, M. A.; LIN, M.; CAVINATO, A. G.; RASCO, B.A. The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice. **Food Microbiol.** 23, 162–168. 2006.

ALMEIDA, J. C. B. Nanopartículas de prata: síntese, caracterização e toxicidade a diferentes organismos. **Dissertação para obtenção do título de mestre em Engenharia Química**. Toledo-PR. 2016.

AL-QADIRI, H. M.; LIN, M.; CAVINATO, A. G.; RASCO, B. A. Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice. **Int. J. Food Microbiol.** 111, 73–80. 2006.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

ANANTH, A.; DHARANEEDHARAN, S.; HEO, M. -S.; MOK, Y. S. Copper oxide nanomaterials: Synthesis, characterization and structure-specific antibacterial performance. **Chemical Engineering Journal**, 262, 179, 2015.

ANDERSON, A. C.; JONAS, D.; HUBER, I.; KARYGIANNI, L.; WOLBER, J.; HELLWIG, E.; ARWEILWE, N.; VACH, K.; WITTMER, A.; AL-AHMAD, A. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. **Front Microbiol.** 6(1534): 1-14. 2015.

ARAKHA, M.; SALEEM, M.; MALLICK, B. C.; JHA, S. The effects of interfacial potential on antimicrobial propensity of ZnO nanoparticle. **Scientific Reports**, 5: 9578. 2015.

ARSE`NE, F.; TOMOYASU, T.; BUKAU, B. The heat shock response of *Escherichia coli*. **Int. J. Food Microbiol.** 55:3–9. 2000.

ASHE, B. A Detail investigation to observe the effect of zinc oxide and Silver nanoparticles in biological system, M.Sc. (Roll NO-607bm004), **National Institute of Technology**, 2011.

ASSIS, L. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

AUGUSTIN, M. A.; SANGUANSRI, P. Nanostructured materials in the food industry. **Advances in food and nutrition research**, v. 58, p. 183-213, 2009.

AZAM, A.; AHMED, A. S.; OVES, M.; KHAN, M. S.; HABIB, S. S.; MEMIC, A. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A comparative study. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 6003–6009, 2012.

AZEVEDO, H. Fundamentos de estabilidade de alimentos. 2ed. **Editora técnica**, Brasília, DF: Embrapa, 326p. 2012.

BAKER, C.; PRADHAN, A.; PAKSTIS, L.; POCHAN, D. J.; SHAH, S. I.; Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. **J. Nanosci. Nanotechnol.** 5, 244. 2005.

BECARO, A. A.; PUTI, F. C.; PANOSSO, A. R.; GERN, J. C.; BRANDÃO, H. M.; CORREA, D. S.; FERREIRA, M. D. Postharvest quality of fresh-cut carrots packaged in plastic films containing silver nanoparticles. **Food Bioprocess Technol.** Volume 9, Issue 4, pp 637–649, 2015.

BERRY V.; GOLE A.; KUNDU S.; MURPHY C. J.; SARAF R. F. Deposition of CTAB-terminated nanorods on bacteria to form highly conducting hybrid systems. **J Am Chem Soc** 127: 17600–17601. 2005.

BEVERIDGE T. J.; MURRAY R. G. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** 141(2):876–887, 1980.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999 – 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, n. 6, p. 1, 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - **SVS**. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas Por Alimentos**. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2017.

BRAYNER, R.; FERRARI-ILIOU, R.; BRIVOIS, 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.

BURDA, C.; CHEN, X. B.; NARAYANAN, R.; EL-SAYED, M. A. Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Rev.**, 105(4): p. 1025-1102. 2005.

CARMO, G. M. I. et al. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim eletrônico epidemiológico**, Brasília, ano 5, n.6, 2005.

CAVA, R. J. Structural chemistry and the local charge picture of copper oxide superconductors. **Science**. 247:656–62. 1990.

CAVALCANTI, S. M. M.; FRANÇA, E. R.; CABRAL, C.; VILELA, M. A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A. C. R. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. **Braz. J. Infect. Dis.** vol. 9 n^o.1. 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, - CDC - Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 2009-2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**. July 2018.

CHA, D. S.; CHINNAN, M. S. Biopolymer-based antimicrobial packaging: a review. **Critical Review Food Science and Nutrition**. United Kingdom, v 44, n 4, p 223-37, 2004.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

CHAUDHRY, Q.; CASTLE, L. Food applications of nanotechnologies: An overview of opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 595-603, 2011.

CHITHRA, M. J.; SATHYA, M.; PUSHPANATHAN, K. Effect of pH on Crystal Size and Photoluminescence Property of ZnO nanoparticles prepared by chemical precipitation method. **Acta Metallurgical Sonica (English Letters)**, 28(3): 394-404. 2015.

CHOI, O.; HU, Z.; Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to Nitrifying bacteria. **Environ. Sci. Technol.** 42, 4583. 2008.

CHUNG, Y. C.; SU, Y. P.; CHEN, C. C.; JIA, G.; WANG, H. L.; WU, J. C.; LIN, J. G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **Acta Pharmacol Sin.** Jul; 25 (7): 932-6. 2004.

DAINELLI D.; GONTARD N.; SPYROPOULOS D.; ZONDERVAN-VAN DEN BEUKEN E.; TOBBACK P. Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. **Trends Food Sci. Technol.**, 19, 103–112. 2008.

DANILCAUK M, LUND A, SALDO J, YAMADA H, MICHALIK J. Conduction electron spin resonance of small silver particles. **Acta Mol. Biomol. Spectrosc.** 63:189–191. 2006.

DAR, M. A.; KIM, Y. S.; KIM, W. B.; SOHN, J. M.; SHIN, H. S. Structural and magnetic properties of CuO nanoneedles synthesized by hydrothermal method. **Applied Surface Science** 254 (22): 7477, 2008.

DAS, D.; NATH, B. C.; PHUKON, P.; DOLUI, S. K. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 101. 430– 433. 2013.

- DESSELBERGER, U. Emerging and re-emerging infectious diseases. **J Infect** 40: 3–15. 2000.
- DIBROV, P. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag⁺ in *Vibrio cholera*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2668-2670. 2002.
- DOBRUCKA, R.; CIERPISZEWSKI. Active and intelligent packaging food – research and development – a review. **Pol. J. Food Nutr. Sci.** Vol. 64, n. 1, pp. 7-15. 2014.
- DUKHIN A. S.; GOETZ P. J.; FANG X.; SOMASUNDARAN P. Monitoring nanoparticles in the presence of larger particles in liquids using acoustics and electron microscopy. **J. Colloid Interface Sci.** 342:18–25; 2010.
- DUPONT, C. L.; GRASS, G.; RENSING, C. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance-new insights and applications. **Metallomics**. Oct 10. 2011.
- DURAN, N.; MARCATO, P. D.; DE SOUZA, G. I. H.; ALVES, O. L.; ESPOSITO, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process n textile fabrics and their effluent treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology** Vol.3, 203–208, 2007.
- DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; DE CONTI, R.; ALVES, O. L.; COSTA, F. T. M.; BROCCHI, M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 2010.
- DURAN, N.; DURAN, M.; JESUS, M. B.; SEABRA, A. B.; FAVARO, W. J.; NAKAZATO, G. Silver nanoparticles: a new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. **Nanotechnology, biology and medicine**. 12: 789-799. 2016.
- EBONE, M. V.; CAVALLI, S. B.; LOPES, S. J. Segurança e qualidade higiênico-sanitária em unidades produtoras de refeições comerciais. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 24, n. 5, p. 725-734. 2011.
- EKPERIGIN, H. E.; NAGARAJA, K. V. *Salmonella*. **Microbiology Food Borne Pathogens**. 14:17-29. 1998.
- EL-TRASS, A.; ELSHAMY, H.; EL-MEHASSEB, I.; EL-KEMARY, M. CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. **Applied Surface Science** 258 (7): 2997, 2012.
- EPIFANI, M.; GIANNINO, C.; TAPFER, L.; VASANELLI, L. Sol-gel synthesis and characterization of Ag and Au nanoparticle in SiO₂, TiO₂ and ZrO₂ thin films. **J. Am. Ceram. Soc.**, 83 [10] 2385–93. 2000.
- ESPINOSA, M. et al. Nanoparticles of Pt and Ag supported in meso porous SiO₂: characterization and catalytic applications. **XIV Congresso Técnico Científico ININ-SUTIN**, 2004.

ESPITIA, P. J. P.; BATISTA, R. A. Non-thermal food preservation: control of food borne pathogens through active food packaging nanotechnology. In: Ravishankar KV. *Advances in Food Biotechnology*. Chichester: Wiley Blackwell, 2016.

ESPITIA, P. J. P.; SOARES, N. F. F.; COIMBRA, J. S. R.; ANDRADE, N. J.; CRUZ, R. S.; MEDEIROS, E. A. A. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. **Food Bioprocess Technol.** 5:1447-1464, 2012.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. **Clín. Microbiol. Rev.** 26(2): 308-341. 2013.

FENG, Q. L.; WU, J.; CHEN, G. Q.; CUI, F. Z.; KIM, T. N.; KIM, J. O. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Biomed. Mater. Res.** 52 (4): 662–8. 2000.

FERREIRA, A. J. P.; KNÖBL, T.; COLIBACILOSE, I. N.; BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; DI FABIO, J.; SEST, L.; ZUANAZE, A. F. *Doenças das Aves*, 2 ed. Campinas: FACTA, 2009.

FU, G., VARY, P. S.; LIN, C. T. Anatase TiO₂ nanocomposites for antimicrobial coatings. **J Phys Chem B.** 109, 8889–8898. 2005.

FRANZ, C. M. A.; STILE, M. E.; SHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **Int J Food Microbiol.** 88: 105-122. 2003.

GABALLA, A.; HELMANN, J. D. Identification of a zinc-specific metalloregulator protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. **J Bacteriol.** 180: 5815–5821. 1998.

GADE, A. K.; BONDE, P.; INGLE, A. P.; MARCATO, P. D.; DURÁN, N.; RAI, M. K.; Exploitation of *Aspergillus niger* of synthesis of silver nanoparticle. **J. Biobased Mater. Bioenergy.** 2, 243. 2008.

GARCÍA-BARRASA, J.; LÓPEZ-DE-LUZURIAGA, J. M., MONGE, M. Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. **Cent. Eur. J. Chem.**, v. 9, n. 1, p. 7-199, 2011.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. *Doenças transmitidas por alimentos*. In: Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. *Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel, 2008.

GHOMI, J. S; GHASEMZADEH, M. A; ZAHEDI, S. ZnO nanoparticles: A highly effective and readily recyclable catalyst for the one-pot synthesis of 1,8-dioxo-decahydroacridine and 1,8-dioxooctahydro-xanthene derivatives. **J. Mex. Chem. Soc.** 57(1), 1-7. Sociedad Química de México ISSN 1870-249X. 2013.

GIRALDI, T. R.; SANTOS, G. V. F.; MENDONÇA, V. R.; RIBEIRO, C.; WEBER, I.T. Annealing effects on the photocatalytic activity of ZnO nanoparticles. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 11: 1-6, 2011.

GOESMANN, H.; FELDMANN, C. Nanoparticulate functional materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 8, p. 1362-1395, ISSN 1521-3773. 2010.

GOMAA, E. Z. Silver nanoparticles as an antimicrobial agent: A case study on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* as models for Gram-positive and Gram-negative bacteria. **J. Gen. Appl. Microbiol.** Mar 17;63(1):36-43. 2017.

GREIG J. D.; RAVEL A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**.130:77–87. 2009.

HAMOUDA, T.; BAKER JR, J. R. Antimicrobial mechanism of action of surfactant lipid preparations in enteric Gram-negative bacilli. **Appl. Microbiol.** 89: 397. 2000.

HARIKUMAR, P.S.; ARAVIND, A. Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles and Copper Nanocomposites against *Escherichia Coli* Bacteria. **International Journal of Sciences**. Vol 5. 2016 (2).

HENNEKINNE JÁ, BUYSER ML, DRAGACCI S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS**. 36: 815-836. 2012.

HOSSEINKHANI, A. M.; ZAND, A. M.; IMANI, S.; REZAYI, M.; REZAEI-ZARCHI, S. Determining the antibacterial effect of ZnO nanoparticle against the pathogenic bacterium, *Shigella dysenteries* (type 1). **International Journal of Nano Dimension**. 1(4):279–285; 2010.

HU, X. L.; ZHU, Y. J.; WANG S. W. Sonochemical and microwave-assisted synthesis of linked single-crystalline ZnO rods. **Mater Chem Phys** 88:421–426. 2004.

HUANG, Z.; ZHENG, X.; YAN, D.; YIN, G.; LIAO, X.; KANG, Y.; YAO, Y.; HUANG, D.; HAO, B. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. **Langmuir** 24:4140–4; 2008.

JAIN, D.; KUMAR. D. H.; KACHHWAHA, S.; KOTHARI, S. L. Synthesis of Plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**: 4, 557 – 563. 2009.

JALAL, R.; GOHARSHADI, E. K.; ABARESHI, M.; MOOSAVI, M.; YOUSEFI, A.; NANCARROW, P. ZnO nanofluids: green synthesis, characterization and antibacterial activity. **Materials Chem and Physics**. Vol 121. 198-201. 2010

JONES, N.; RAY, B.; RANJIT, K. T.; MANNA, A. C. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.** 279:71–76. 2008.

KASEMETS, K.; IVASK, A.; DUBOURGUIER, H. C.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicol In Vitro**. 23(6):1116-22. 2009.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanism of bacterial adhesion to biomaterial and of techniques used in estimating bacteria-material interaction. **Eur Cells Mater** 8: 37–57. 2004.

KEISARI, Y.; WANG, H.; MESIKA, A.; MATATOV, R.; NISSIMOV, L.; CROUCH, E.; OFEK, I. Surfactant protein D-coated *Klebsiella pneumoniae* stimulates cytokine production in mononuclear phagocytes. **J Leukoc Biol** 70:135–41. 2001.

KIM, J. H.; CHO, H.; RYU, S. E.; CHOI, M. U. Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu^{2+} ion. **Arch Biochem Biophys**. 382(1):72–80. 2000.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J. H.; PARK, S. J.; LEE, H. J.; KIM, S. H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C. Y.; KIM, Y. K.; LEE, Y. S.; JEONG, D.H.; CHO, M. H. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Journal of Nanomedicine** 3(1): 95-101. 2007.

KOCH, A. M.; REYNOLDS, F.; MERKLE, H. P.; WEISSLEDER, R.; JOSEPHSON, L. Transport of surface- modified nanoparticles through cell monolayers. **Chem bio chem**. 6(2):337–345; 2005.

KOTLOFF, K. L; WINICKOFF, J. P; IVANOFF, B.; CLEMENS, J. D.; SWERDLOW, D. L.; SANSONETTI, D. L.; ADAK, G. K.; LEVINE, M. M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull. World Health Organ** 77(8), 651–666 (1999).

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. **J. Biomed. Mater. Res.**, 62(4): p. 600-612. 2002.

KRISHNA, R. R.; RANJIT, T. K.; ADHAR, C. M. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. **Langmuir**. 27: 4020-4028. 2011.

LACOSTE, A.; SCHAICH, K. M.; ZUMBRUNNEN, D.; YAM, K. L. Advancing controlled release packaging through smart blending. **Packaging Technology and Science**, Inglaterra, v. 18, n. 2, p. 77-87, 2005.

LEWIS, K.; KLIBANOV, A. M. Surpassing nature: rational design of sterile-surface materials. **Trends Biotechnology** 23, 343–348 (2005).

LIANG, X.; SUN, M.; LI, L.; QIAO, R.; CHEN, K.; XIAO, Q.; XU, F. Preparation and antibacterial activities of polyaniline/Cu_{0.05}Zn_{0.95}O nanocomposites. **Dalton Trans**. 41(9):2804–2811. 2012.

LIBANORI, G.S.N. Avaliação da atividade catalítica de óxidos cerâmicos na conversão de óleos vegetais. **Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre**. UFSCar. São Carlos. 2011.

LIN, J.; SMITH, M. P.; CHAPIN, K. C.; BAIK, H. S.; BENNETT, G. N.; FOSTER, J. W. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol** 62, 3094–3100. 1996.

- LIN, Y. E.; VIDIC, R. D.; STOUT, J. E.; MCCARTNEY, C. A.; YU, V. L. Inactivation of *Mycobacterium avium* by copper and silver ions. **Water Res.** 32(7):1997–2000; 1998.
- LINDSAY, J. A.; FOSTER, S. J. Zur: a Zn²⁺ -responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*. **Microbiol** 147: 1259–1266. 2001.
- LIU, Y.; HE, L.; MUSTAPHA, A.; LI, H.; HU, Z. Q.; LIN, M. Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7. The Society for Applied Microbiology, **Journal of Applied Microbiology** 107 ;1193–1201. 2009.
- LOK, C. N.; HO, C. M.; CHEN, R.; HE, Q. Y.; YU, W. Y.; SUN, H.; TAM, P. K.; CHIU, J. F.; CHE, C. M.; Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. **J. Proteome Res.** 5, 916. 2006.
- LOWY, F. D. Medical progress: *Staphylococcus aureus* infections. **N Eng J Med**, v. 339, p. 520-32, 1998.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de BROCK*. 10^a ed. São Paulo: Prentice Hall Brasil, 2004. 624p.
- MAIA, G.A.R.; LARSSON, L.F.G.; VIOMAR, A.; MAIA, E.C.R.; SANTANA, H.; RODRIGUES, P.R.P. Aperfeiçoamento da produção de partículas de óxido de zinco para a aplicação em células solares. **Cerâmica** 62; 91-97. 2016.
- MARCATO, P. D.; PARIZOTTO, N. V.; MARTINEZ, D. S. T.; PAULA, A. J.; FERREIRA, I. R.; MELO, P. S.; DURAN, N.; ALVES, O. L. New hybrid material based on layered double hydroxides and biogenic silver nanoparticles: antimicrobial activity and cytotoxic effect. **J. Braz. Chem. Soc.** vol. 24 no.2. São Paulo. Feb. 2013.
- MARSALEK, R. Particle size and Zeta Potential of ZnO. **APCBEE Procedia** 9; 13 – 17. 2014.
- MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; TSUCHIDO, T. Mode of bacterial action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Appl. Environ. Microbiol.** 69, 4278–4281 (2003).
- MOAZZEN, M.A.A; BORGHEI, S. M.; TALESHEI, F. Change in the morphology of ZnO nanoparticles upon changing the reactant concentration. **Appl. Nanosci.** 3:295-302-2013.
- MORARU, C.; PANCHAPAKESAN, C.; HUANG, Q.; TAKHISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J. Nanotechnology: A new frontier in food science. **Food Technology**, Chicago, v. 57, n. 12, p. 24-29, 2003.
- MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bacterial effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology.** 16(10):2346-53; 2005.
- NAGARAJAN, P.; RAJAGOPALAN, V. Enhanced bioactivity of ZnO nano-particles- an antimicrobial study. *Environ. Sci. Technol.* 9 (035004), 7-15. 2008.

NAIR, S.; SASIDHARAN, A.; DIVYA RANI, V. V.; MENON, D.; NAIR, S.; MANZOOR, K.; RAINA, S. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. **J. Mater. Sci. Mater. Med.** (Suppl. 1): S235–S241. 2009.

NAKAMOTO, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds – **Part B. New Jersey: Wiley**, 6a ed. cap 1. 2009.

NALLATHAMBI, G.; RAMACHANDRAN, T.; RAJENDRAN, V.; PALANIVELU, R. Effect of silica nanoparticle and BTCA on physical properties of cotton fabrics. **Materials Research**. 14(4): 552-559. 2011.

NAVALE, G. R.; THRIPURANTHAKA, M.; LATE, D. J.; SHINDE, S. S. Antimicrobial Activity of ZnO Nanoparticles against Pathogenic Bacteria and Fungi. **JSM Nanotechnology Nanomed** 3(1): 1033. 2015.

NEL, A. E.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysiochemical interactions at the nano-bio interface. **Nat. Mater.** 8, 543–557 (2009).

NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, 311, 622–627 (2006).

NETO, E. A. B. Desenvolvimento de nanobiocompósitos contendo nanopartículas de prata para aplicações bactericidas. **Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciências**. São Carlos-SP. 2010.

NETO, E. A. B.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. **Comunicado Técnico 99. ISSN 1517-4786**. São Carlos, SP. Nov. 2008.

ORTS, W. J.; SHEY, J.; IMAM, H.; GLENN, G. M.; GUTTMAN, M. E.; REVO, J. F. Application of cellulose microfibrils in polymer nanocomposites. **Journal of Polymers and the Environment**, 13(4): 301, 2005.

PADMAVATHY N, VIJAYARAGHAVAN R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles – an antimicrobial study. **Sci Technol Adv Mater** 9: 035004–11. 2008.

PANDIYARAJAN, T.; UDAYABHASKAR, R.; VIGNESH, S.; JAMES, R. A.; KARTHIKEYAN, B. Synthesis and concentration dependent antibacterial activities of CuO nanoflakes. **Materials Science and Engineering C** 33. 2020–2024. 2013.

POOKMANEE, P.; MAKARUNKAMOL, S.; SATIENPERAKUL, S.; KITIKUL, J.; PHANICHPHANT, S. Microwave-assisted synthesis and characterization of zinc oxide micropowder. **Advanced Materials Research** Vols. 93-94; pp 643-646. 2010.

PRABHU, S.; POULOSE, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **Int Nano Lett.** 2(32):1-10. 2012.

- PREMANATHAN M.; KARTHIKEYAN K.; JEYASUBRAMANIAN K.; MANIVANNAN G. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. **Nanomedicine**. 7:184–192. 2011.
- PUTI, F. C.; BECARO, A. A.; CORREA, D. S.; PARIS, E. C.; MARCONCINI, J. M.; FERREIRA, M. D. Polyethylene films containing silver nanoparticles for applications in food packaging: characterization of physico-chemical and anti-microbial properties. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. V 15, 2148-2156, 2015.
- PUI, C. F.; WONG, W. C.; CHAI, L. C.; TUNUNG, R.; JEYALETCHUMI, P.; NOOR HIDAYAH, M. S.; UBONG, A.; FARINAZLEEN, M. G.; CHEAH, Y. K.; SON, R. *Salmonella*: a foodborne pathogen. **Food Res Int**. 18: 465-473. 2011.
- RAGHUPATI, K. R.; KOODALI, R. T.; MANNA, A. C. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles. **Langmuir**. 27:4020–4028. 2011.
- RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, 27(1), 76–83. 2009.
- RASMUSSEN, J. W.; MARTINEZ, E.; LOUKA, P.; WINGETT, D. G. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. **Expert Opin. Drug Deliv**. 7(9), 1063–1077 (2010).
- RAVISHANKAR, R. V.; JAMUNA, B. A. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. Science against microbial pathogens, communicating current research and technological advances. **A. Méndez-Vilas** (Ed.), 197-209. 2011.
- REALINI, C. E.; MARCOS, B. Active and intelligent packaging systems for a modern society; **Meat Science**, v. 98, p. 404-419, 2014.
- REDDY, K. M.; FERIS, K.; BELL, J.; WINGETT, D. G.; HANLEY, C.; PUNNOOSE, A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. **Appl. Phys. Lett**. 90(213902): 213902-1–213902-3. 2007.
- REN, G.; HU, D; CHENG, E. W.; REUS, M. A.; REIP, P. ALLAKER, R. P. Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. **Int. J. Antimicrob. Agents** 33(6) 587-90.2009.
- RODRIGUEZ, D. M.; SUAREZ, M. C. *Salmonella* ssp. in the pork supply chain: a risk approach. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias*. Medellín, v. 27, n. 2, p. 65-75. 2014.
- ROSELLI, M.; FINAMORE, A.; GARAGUSO, I.; BRITTI, M. S.; MENGHERI, E. Zinc oxide protects cultured enterocytes from the damage induced by *E. coli*. **J Nutr** 133: 4077–4082. 2003.
- ROSI, N.L.; MIRKIN, C.A. Nanostructures in biodiagnostics. **Chem Rev** 105: 1547–1562. 2005.

RUPARELIA, J. P.; CHATTERJEE, A. K.; DUTTAQUPTA, S. P.; MUKHERJI, S. Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. **Acta Biomater.** 4(3):707-16, 2008.

RUSSELL, A. D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 52(5), 750–763. 2003.

SADIQ, I. M.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Studies on effect of TiO₂ nanoparticles on growth and membrane permeability of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus subtilis*. **Curr Nanosci** 6:381–7. 2010.

SADOWSKI, Z.; MALISZEWSKA, I. H.; GROCHOWALSKA, B.; POLOWCZYK, I.; KOZLECKI, T. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. **Materials Science-Poland**, Vol. 26, No. 2, 2008.

SAHAY, R.; SUNDARAMURTHY, J.; KUMAR, P.S.; THAVASI, V.; MHAISALKAR, S.G.; RAMAKRISHNA, S. Synthesis and characterization of CuO nanofibers, and investigation for its suitability as blocking layer in ZnO NPs based dye sensitized solar cell and as photocatalyst in organic dye degradation. **Journal of Solid State Chemistry**, 186: 261, 2012.

SAHOO, S. Socio-ethical issues and nanotechnology development: perspectives from India, in 2010 10th IEEE **Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO)**, Seoul, South Korea, USA, 17–20 pp. 1205–1210. 2010.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SANTOS, L.C. Avaliação da atividade fotocatalítica do óxido de cobre imobilizado em suporte magnético nanoestruturado. Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre. UFSCar. São Carlos. 2015.

SANTOS, M. A. F.; LÔBO, I. P.; CRUZ, R. S. Synthesis and characterization of novel ZrO₂-SiO₂ mixed oxides. **Materials Research**. 17(3): 700-707. 2014.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol. 43, n°6, 2007.

SÃO PAULO, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - **SES/SP**, Centro de Vigilância Epidemiológica – **CVE**, Doenças Transmitidas por Alimentos, Estado de São Paulo. 1999-2008. Trabalho apresentado no III Seminário WHO Global Salmonella Surveillance, 29/09 a 03/10/2008, Brasília, DF, Brasil. 2008.

SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. **Journal of Microbiological Methods**, 54(2), 177–182. 2003.

SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T. Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and, ZnO), by an indirect conductimetric assay. **J. Appl. Microbiol.** 96, 803. 2004.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.L.S.U.; FREITAS, L.D.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, 26: 726, 2003.

SHAHVERDI, A. R.; PHARMD, A. F.; SHAHVERDI, H. R.; MINAIAN, S. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine** 3;168– 171. 2007.

SILVA JR. E. A. Manual de Controle Higiênico Sanitário em Serviços de Alimentação. 6 ed. São Paulo: **Ed Varela**. 2008.

SILVA, E. P.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, M. A. Alimentos e agentes etiológicos envolvidos em toxinfecções na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil: 2005 a 2008. *Boletim Epidemiológico Paulista, SP, v. 7, n. 77, p. 4-10.* 2010.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Tradução Ricardo Bicca de Alencastro – Rio de Janeiro: Ed. **Guanabara koogan s.a.**, 5ª ed, cap 3, 1994.

SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A.; KAUS, N. H. M.; ANN, L. C.; BAKHORI, S. K. M.; HASAN, H.; MOHAMAD, D. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. **Nano-Micro Lett.** 7(3):219–242. 2015.

SMITH, J.L.; FRATAMICO, P.M. Look what's coming down the road: potential foodborne pathogens. In *Foodborne Pathogens – Microbiology and Molecular Biology* ed. Fratamico, P.M., Bhunia, A.K. and Smith, J.L. pp. 427–442. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2005.

SOARES, N. F. F.; SILVA, C. A. S.; SANTIAGO-SILVA, P.; ESPITIA, P. J. P.; GONÇALVES, M. P. J. C.; LOPEZ, M. J. G.; MILTZ, J.; CERQUEIRA, M. A.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J.; SILVA, W. A.; BOTREL, D. A. Active and intelligent packaging for milk and milk products. In **J. S. R. Coimbra & J. A. Teixeira (Eds.), Engineering aspects of milk and dairy products** (pp. 155–174). New York, USA: CRC Press Taylor & Francis Group. 2009.

SOLOMON, S. D.; MOZGHAN, B.; JEYARAJASINGAM, A. V.; RUTKOWSKY, S. A.; BORITZ, C. Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 2, 2007.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of Colloid and Interface Science**; 275; 177–182. 2004.

SONOHARA, R.; MURAMATSU, N.; OHSHIMA, H.; KONDO, T. Difference in surface properties between *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* as revealed by electrophoretic mobility measurements. **Biophysical Chem.** vol 55. 273-277. 1995.

SOURABH, D.; RIZWAN, W.; FARHEEN, K.; YOGENDRA, K. M.; JAVED, M.; ABDULAZIZ, A. A. Reactive Oxygen Species Mediated Bacterial Biofilm Inhibition via Zinc Oxide Nanoparticles and Their Statistical Determination. **PLoS One**. 9: 111289; 2014.

SOUSA, C. P. The versatile strategies of *Escherichia coli* pathotypes: a mini review. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 12(3): 363-373. 2006.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radic Biol Med**. 18(2):321–336. 1995.

STOIMENOV, P.K.; KLINGER, R.L.; MARCHIN, G.L.; KLABUNDE, K.J. Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. **Langmuir** 18, 6679–6686. 2002.

SUN, Y.; XIA, Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. **Science** 298, 2176. 2002.

SUNADA, K.; KIKUCHI, Y.; HASHIMOTO, K.; FUJISHIMA, A. Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. **Environ. Sci. Technol.** 32 (5), 726–728. 1998.

THILL A.; ZEYONS O.; SPALLA O.; CHAUVAT F.; ROSE J.; AUFFAN M.; et al. Cytotoxicity of CeO₂ nanoparticles for *Escherichia coli*. Physic-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. **Environ Sci Technol**. 40(19):6151–6. 2006.

TILLER, J. C.; LIAO, C. J.; LEWIS, K.; KLIBANOV, A. M. Designing surfaces that kill bacteria on contact. **Proc Natl Acad. Sci USA** 98: 5981–5985. 2001.

TOM, R.T.; SURYANARAYANAN, V.; REDDY, G. P.; BASKARAN, S.; APRADEEP, T. Ciprofloxacin-Protected Gold Nanoparticles. **Langmuir**; 20:1909-1914. 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TRANQUADA, J. M.; STERNLIEB, B. J.; AXE, J. D.; NAKAMURA, Y.; UCHIDA, S. Evidence for stripe correlations of spins and holes in copper oxide superconductors. **Nature**. 375:561. 1995.

VAN VLIET, A. H.; KETLEY, J.M.; PARK, S.F.; PENN, C.W. The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. **FEMS Microbiol. Rev**. 26:173–186. 2002.

VELMURUGAN P.; SHIM J.; KAMALA-KANNAN S.; et al. Crystallization of silver through reduction process using *Elaeis guineensis* biosolid extract. **Biotechnology Prog**. 27:273–279. 2011.

WANG J.; LIU H.; KURT'AN T.; M'ANDI A.; S'ANDOR A.; JIA L.; ZHANG H.; GUO Y. Protolimonoids and norlimonoids from the stem bark of *Toona ciliata* var. *pubescens*. **Org Biomol. Chem** 9(22):7685–7696. 2011.

XIE, Y.; HE, Y.; IRWIN, P. L.; JIN, T.; SHI, X. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2325–2331 Vol. 77, No. 7, April 2011.

YAMAMOTO, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. **International J. of Inorganic Materials**. Vol 3. Issue 7. Pg 643-646. 2001.

YEH, K.M.; CHANG, F.Y.; FUNG, C.P.; SIU, L.K. Serotype K1 capsule, rather than magA per se, is really the virulence factor in *Klebsiella pneumoniae* strains that cause primary pyogenic liver abscess. **J Infect Dis** 194:403–4. 2006.

YOUSEF, J. M.; DANIAL, E. N. In vitro antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of zinc oxide and nano-particle zinc oxide against pathogenic strains. **International Journal of Health Science**. V. 2, n. 4, p. 38-42, 2012.

YU, H.; YU, J.; LIU, S.; MANN, S. Template-free hydrothermal syntheses of CuO/ Cu₂O composite hollow microspheres. **Chem. Mater.**, 19: 4327, 2007.

ZANDONELLA C. Cell nanotechnology: The tiny toolkit. *Nature*; 423: 10-12. 2003.

ZARCHI, S. R.; JAVED, A.; GHANI, M. J.; SOUFIAN, S.; FIROUZABADI, F. B.; MOGHADDAM, A. B.; MIRJALILI, S. H. Comparative study of antimicrobial activities of TiO₂ and CdO nanoparticles against the pathogenic strain of *Escherichia coli*. **Iranian Journal of Pathology** (2010)5 (2), 83.

ZHANG, H.; CHEN, G. Potent antibacterial activities of Ag/TiO₂ nanocomposite powders synthesized by a one-pot sol-gel method. **Environ Sci Technol**. 43:2905–10. 2009.

ZHANG, L.L.; JIANG, Y.H.; DING, Y.L.; POVEY, M.; YORK, D. Investigation into the antibacterial behavior of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). **J. Nanopart. Res** 9, 479–489. 2007.

ZHU, J.; LI, D.; CHEN, H.; YANG, X.; LU, L.; WANG, X. Highly dispersed CuO nanoparticles prepared by a novel quick-precipitation method. **Mater. Lett.**, 58 (26): 3324, 2004.