

# EFEITO ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO E TiO<sub>2</sub> FRENTE AS BACTÉRIAS *S. AUREUS* E *E. COLI*

L. C. MOHR<sup>1</sup>, A. P. CAPELEZZO<sup>1</sup>, T. RIPPEL<sup>2</sup>, R. Z. TERNUS<sup>2</sup>, F. DALCANTON<sup>3</sup>, M. A. FIORI<sup>1,3</sup>, J. M. M de MELLO<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Comunitária da Região de Chapecó - Unochapecó-SC, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais

<sup>2</sup> Universidade Comunitária da Região de Chapecó - Unochapecó-SC, Departamento de Engenharia Química, Área das Ciências Exatas e Ambientais

<sup>3</sup> Universidade Comunitária da Região de Chapecó - Unochapecó-SC, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia e Gestão da Inovação

E-mail para contato: laura\_cmohr@unochapeco.edu.br

**RESUMO** – Infecções ocasionadas por microrganismos patogênicos são um problema de saúde pública que demandam atenção e estudo já há algum tempo. Novos agentes antimicrobianos despertam interesse de estudo, visando o desenvolvimento de materiais que confirmam atividade antimicrobiana. Tendo em vista esta problemática, este trabalho tem como objetivo estudar a atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO) e nanopartículas de dióxido de titânio (NPs-TiO<sub>2</sub>) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*). Para avaliar a atividade antimicrobiana das NPs-ZnO e NPs-TiO<sub>2</sub> realizou-se testes de difusão em meio sólido e Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para as NPs-ZnO, o diâmetro médio do halo de inibição foi de  $1,1 \pm 0,06$  cm e  $0,7 \pm 0,15$  cm para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. A CIM das NPs-ZnO determinada no presente estudo para inibir *S. aureus* varia de  $391,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $783,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto que para *E. coli* não foi possível determinar a CIM em virtude de a solução saturada de NPs-ZnO não ser suficiente para causar inibição efetiva desta bactéria. Já para as NPs-TiO<sub>2</sub>, não houve a formação de halo de inibição, bem como, não foi possível a determinação da CIM para nenhuma das estirpes bacterianas em estudo, reafirmando a incapacidade de inibição bacteriana das NPs-TiO<sub>2</sub>, sem uma fonte fornecedora de luz UV e/ou visível.

Palavras-chave: nanopartículas, óxido de zinco, dióxido de titânio, atividade antimicrobiana.

DOI: 10.5965/24473650312017011

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças causadas por microrganismos patogênicos representam um problema de saúde pública, que se estende desde o fator social até econômico. O aumento de focos e de infecções

patogênicas, resistência bacteriana a antibióticos, mutações bacterianas, falta de vacinas adequadas principalmente em países subdesenvolvidos e infecções hospitalares representam perigo para a saúde humana global (SIRELKHATIM *et al.*, 2015).

Um cuidado especial em relação à contaminação por microrganismos é requerido em dispositivos médicos, drogas, superfícies hospitalares, restauração dental e equipamentos cirúrgicos, produtos de saúde e higiene, sistemas de purificação de água, embalagens, alimentos, entre outros (BONILLA, GARCÍA, 2012).

Tendo em vista este cenário, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de estudar e desenvolver novos agentes antimicrobianos que confirmam esta propriedade. Alguns óxidos, tais como óxido de cálcio (CaO), óxido de magnésio (MgO), dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e óxido de zinco (ZnO) vem ganhando destaque, revelando-se com potencial atividade antibacteriana mesmo em pequena quantidade, podendo ser substitutos dos agentes convencionais como sal de amônio quaternário e cloro, por exemplo (NAFCHI *et al.*, 2012; OHIRA *et al.*, 2008; SAWAI, 2003).

De acordo com a *Food and Drug Administration*, o ZnO, é considerado um material seguro e atóxico aos seres humanos. Além disso, a ascensão e fabricação de NPs-ZnO abrem um leque de possibilidades para que as mesmas possam ser incorporadas em diferentes matrizes conferindo propriedades diversas, como capacidade de absorver tanto raios UV-A quanto raios UV-B, propriedade antimicrobiana, melhora de algumas propriedades de empacotamento tais como resistência mecânica, estabilidade e propriedades de barreira (MIRZA *et al.*, 2015; ESPITIA *et al.*, 2012; KUMARI *et al.*, 2011). Dentre os possíveis mecanismos de ação antimicrobiana das NPs-ZnO, destacam-se a liberação de íons de zinco (Zn<sup>2+</sup>) e a geração de espécies reativas de oxigênio (DIZAJ *et al.*, 2014, BRAYNER *et al.*, 2006, YAMAMOTO, 2001).

O dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) além de apresentar elevada atividade fotocatalítica também possui a propriedade de matar e/ou inibir o crescimento de bactérias. Além disso, apresenta algumas outras vantagens como alta estabilidade, custo relativamente baixo, atóxico (para seres humanos ou ambiente) e possibilidade de ser suportado em vários substratos (SINGH *et al.*, 2013; FU *et al.*, 2005). Sua atividade fotocatalítica e antimicrobiana está associada a propriedades como: obtenção de partículas e/ou compósitos de TiO<sub>2</sub> estáveis, geração pares elétron/buraco, estendendo a excitação para além do comprimento de onda UV, mas também região da luz visível e ainda, obtenção de uma reduzida taxa de recombinação do par elétron/buraco recém-criado, pois eles são os responsáveis pela geração de radicais reativos, que atingem as membranas celulares e levam à morte dos microrganismos (FU *et al.*, 2005).

As nanopartículas destes óxidos metálicos estão sendo amplamente estudadas em virtude de resistirem a rigorosas condições de processamento, possuem elevada área superficial em relação ao volume e apresentam propriedades químicas e físicas únicas (RAI *et al.*, 2009). Neste trabalho, objetivou-se estudar a atividade antimicrobiana de NPs-ZnO e NPs-TiO<sub>2</sub> frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Escherichia coli* (*E. coli*).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

As nanopartículas de óxido de zinco (NPs-ZnO), gentilmente cedidas pela *Kher Group*, possuíam área superficial de  $85 \pm 11 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . As NPs-TiO<sub>2</sub>, utilizadas constituíram na formulação

comercial Degussa P25 (70% anatase e 30% rutilo) na forma de pó com área superficial de  $50\pm 15 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , sintetizadas pela empresa alemã *Evonik Industries*, respondendo pelo nome comercial AEROXIDE®.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Técnica de difusão em meio sólido a partir de orifício

A difusão em meio sólido a partir de orifício foi realizada seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012a) utilizando-se as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 8739). Primeiramente, as suspensões bacterianas foram cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, marca Himedia) por 24 h a  $37\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa bacteriológica (marca Quimis, modelo Q316m5). Em seguida, isolou-se as colônias bacterianas e após 24 h estas foram ajustadas em solução salina estéril (0,85%) (NaCl, marca Merck) para uma concentração de  $10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$  (Unidades Formadoras de Colônia por mL) utilizando-se um espectrofotômetro (marca Bel photonics, modelo 1105) no comprimento de onda de 619 nm. Verteu-se meio de cultura *Mueller Hinton* (marca Merck) nas placas de petri, deixando solidificar. As bactérias em estudo foram semeadas nas placas de petri com o auxílio de um *swab* estéril, realizando-se a semeadura em três direções garantindo a total deposição dos mesmos sobre o meio de cultura. Em cada placa, foram feitos três orifícios equidistantes, com diâmetro de aproximadamente 0,8 cm, sendo depositado nestes NPs-ZnO e NPs-TiO<sub>2</sub>. Incubou-se a  $37\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 h e, após decorrido este período, mensurou-se o halo de inibição de crescimento microbiano formado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Halo de inibição} = \text{Dex} - \text{Din} \quad (1)$$

Onde: Dex: diâmetro externo formado pela ação do agente antimicrobiano sobre os microrganismos (cm) Din: diâmetro ocupado pelo agente antimicrobiano (cm). O ensaio foi realizado em triplicata, sendo considerado como resultado a média do valor dos halos de inibição.

### 2.2. 2. Técnica de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação do CIM foi realizada utilizando-se a metodologia descrita pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012b), com algumas modificações. Foram preparadas soluções padrão nas concentrações de  $3133,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para as NPs-ZnO e  $9533,3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  para as NPs-TiO<sub>2</sub> em água ultrapura, com homogeneização feita através do ultrassom (marca Eco-sonics, modelo Q1.8/40 A). Tais concentrações foram determinadas a partir de testes preliminares de modo que a solução ficasse saturada e os compostos em estudo não precipitassem nos micropoços da placa de análise. Analogamente ao ensaio de difusão em meio sólido as bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 8739).

Utilizou-se balões volumétricos de 10 mL para realização da diluição seriada partindo da solução padrão. Foram realizadas 7 diluições conforme mostra a Tabela 1. O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 micropoços (marca INLAB) com fundo em forma de “U”,

distribuídos em 8 linhas nomeadas de A até H e 12 colunas.

Tabela 1 – Soluções com diferentes concentrações de NPs-ZnO e NPs-TiO<sub>2</sub> para a determinação da CIM

Linha	Conc. ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) NPs-ZnO	Conc. ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) NPs-TiO <sub>2</sub>
A	3133,3	9533,3
B	1566,7	4766,7
C	783,3	2883,3
D	391,7	1191,7
E	195,8	595,8
F	97,9	297,9
G	48,9	148,9
H	24,5	74,5

Colocou-se 100  $\mu\text{L}$  de caldo BHI em cada um dos micropoços; em seguida, nas colunas 1, 2 e 3 (caracterizadas como a triplicata de análise) e linha A adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução mais concentrada de NPs-ZnO, diminuindo-a nas linhas posteriores em ordem decrescente. Feito isso, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de suspensão microbiana com  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

Na coluna 6 (controle negativo), foram inseridos 100  $\mu\text{L}$  de BHI, 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura e 5  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), de modo a atestar que a água ultrapura, utilizada como solvente, não estava inibindo o crescimento microbiano.

Na coluna 9 (controle positivo), foram inseridos 100  $\mu\text{L}$  de BHI e 5  $\mu\text{L}$  de suspensão bacteriana ( $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ), de modo a atestar que o caldo utilizado possibilita o crescimento dos microrganismos testados; na coluna 12, deixou-se somente os 100  $\mu\text{L}$  de BHI, de modo a atestar a esterilidade deste (branco). Nas colunas 4, 5, 7, 8, 10 e 11 nada foi adicionado.

As microplacas foram então incubadas em estufa microbiológica, sob temperatura de  $37 \pm 1$  °C por 20 h. Após decorrido este período, foram adicionados em cada micropoço 20  $\mu\text{L}$  de TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico, marca Sigma-Aldrich), agente que promove a coloração, possibilitando a visualização do crescimento bacteriano. As microplacas foram levadas para a estufa bacteriológica por mais 4 h, sendo então, retiradas para visualização da coloração. O mesmo procedimento de análise foi realizado para as NPs-TiO<sub>2</sub>.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Técnica de difusão em meio sólido a partir de orifício

A Figura 1 apresenta o halo médio de inibição para as NPs-ZnO e NPs-TiO<sub>2</sub> frente a *S. aureus* e *E. coli*.

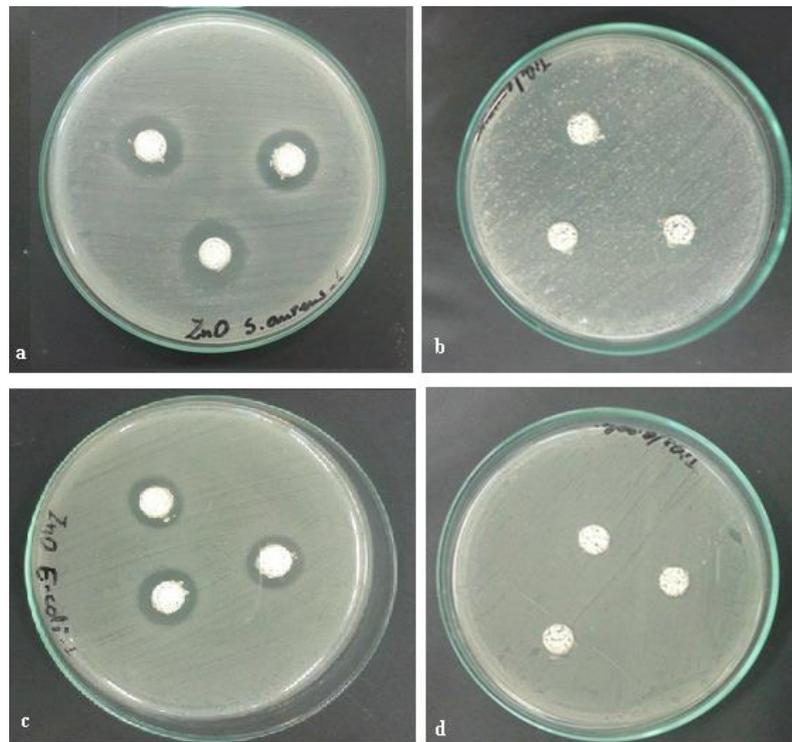


Figura 1 – Resultados do teste de difusão em meio sólido para (a) NPs-ZnO/*S. aureus*; (b) NPs-TiO<sub>2</sub>/*S. aureus*; (c) NPs-ZnO/*E. coli*; (d) NPs-TiO<sub>2</sub>/*E. coli*.

Através da Figura 1(a) e 1(c), pode-se visualizar o halo médio de inibição gerado pelas NPs-ZnO frente a *S. aureus* e *E. coli*. Quando mensurados, estes foram de  $1,1 \pm 0,06$  cm e  $0,7 \pm 0,15$  cm, respectivamente. Analisando-se o tamanho dos halos de inibição gerados pelas NPs-ZnO, é possível verificar que a atividade antimicrobiana é mais intensa contra a bactéria *S. aureus* quando comparado a *E. coli*. Segundo Bonilla e Gárcia (2012), as células bacterianas gram-positivas, que é o caso do *S. aureus*, possuem apenas uma camada exterior, o que facilita a penetração de moléculas externas, promovendo a interação com a membrana citoplasmática e tornando-as mais frágeis quando comparadas às células bacterianas gram-negativas, como por exemplo, *E. coli*. Estas, possuem uma membrana adicional com uma estrutura de bicamada fosfolipídica, responsável pela proteção da membrana citoplasmática interior, em maior grau, o que promove maior resistência à essa classe de bactérias.

Padmavathy e Vijayaraghavan (2008) verificaram que o tamanho do diâmetro médio de partícula é um fator preponderante na atividade antimicrobiana de nanopartículas de óxido de zinco frente a *E. coli* e Quando testadas as NPs-ZnO com tamanho de partícula de 12 nm o halo de inibição foi de  $3,1 \pm 0,01$  cm e para NPs-ZnO de 45 nm o halo de inibição foi de  $2,7 \pm 0,01$  cm. Narayanan *et al.* (2012) verificaram que a quantidade de NPs-ZnO é um fator positivo quando testada a atividade antimicrobiana. Os autores utilizaram 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g}$  de pó e obtiveram os seguintes halos de inibição para *S. aureus* 1,8, 1,9, 2,0, 2,0 e 2,1 cm e 1,3, 1,4, 1,6, 1,6 e 1,7 cm para *E. coli*, respectivamente.

Para as NPs-TiO<sub>2</sub> não houve halo de inibição para ambas as bactérias em estudo. Alguns estudos atestam que as NPs-TiO<sub>2</sub> possuem atividade antimicrobiana frente às bactérias gram-

positivas e gram-negativas em virtude de sua atividade fotocatalítica, estando esta atividade associada aos pares elétron/buraco gerados no processo de fotoexcitação, os quais interagem com a membrana celular dos microrganismos, causando danos à mesma e ocasionando vazamento de minerais, proteínas e materiais genéticos, culminando em morte celular (Bonilla *et al.*, 2013; Fu *et al.*, 2005; Joo *et al.*, 2005). Porém, tal atividade se limita a exposição do composto a luz UV e/ou luz visível, agentes responsáveis por promover a ativação do composto e consequente geração dos pares elétron/buraco. Logo, sem a presença deste agente, as NPs-TiO<sub>2</sub> não apresentam atividade antimicrobiana eficaz, o que é comprovado no presente estudo.

### 3.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O estudo da CIM é importante para determinar qual a menor concentração de solução capaz de inibir o crescimento de microrganismos. A Figura 2 mostra os resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima para as NPs-ZnO quando testadas frente a *S. aureus* e *E. coli*, Figura 2(a) e 2(b), respectivamente.

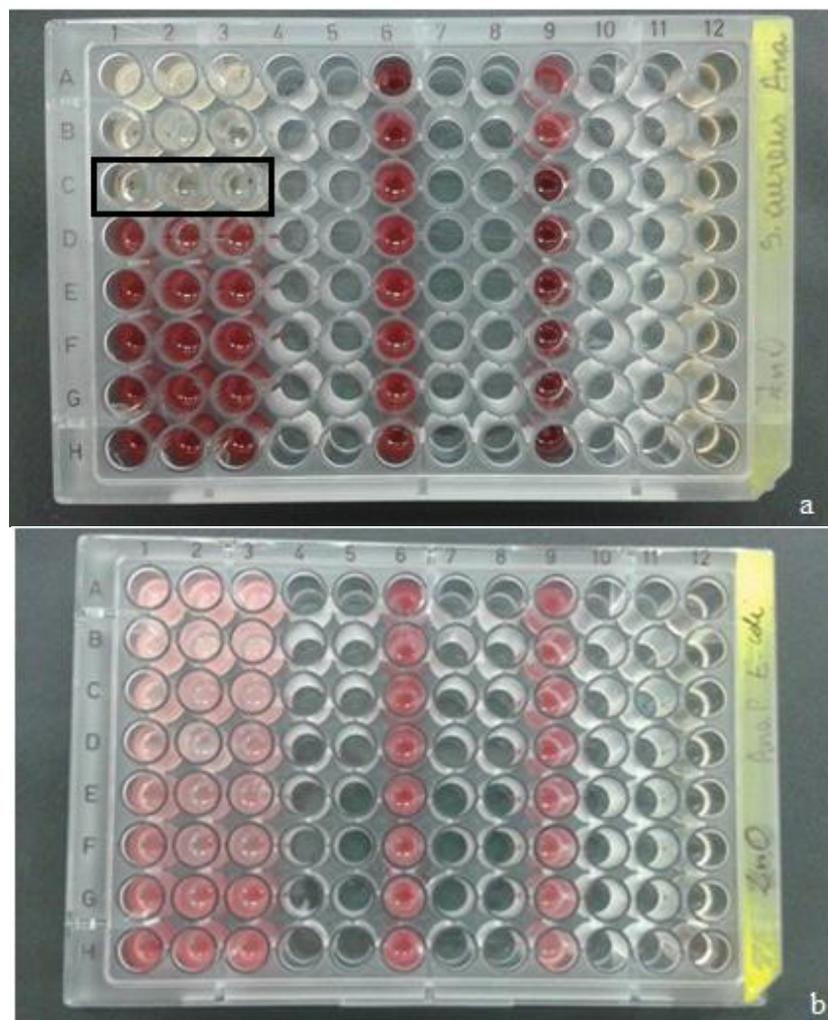


Figura 2 – Resultados do teste de CIM para as NPs-ZnO frente a *S. aureus* (a) e *E. coli* (b).

Como pode ser observado na Figura 2(a), a CIM das NPs-ZnO para inibir o crescimento de *S. aureus* na concentração de  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  está entre a Linha C e D, ou seja, entre  $391,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $783,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para a bactéria *E. coli* não observou-se inibição de células microbianas em nenhuma das concentrações estudadas, ou seja, estas foram insuficientes para inibir o crescimento da referida bactéria.

Embora o ensaio de difusão em meio sólido tenha atestado a capacidade bactericida e/ou bacteriostática das NPs-ZnO frente a *E. coli* através do mecanismo de difusão, as concentrações utilizadas para o ensaio de CIM não foram suficientes para atestar a concentração inibitória mínima para tal bactéria. Devido a saturação da solução de água ultrapura/NPs-ZnO em concentrações acima da utilizada, esta não pode ser aumentada, em virtude de que a solução precipitaria no fundo dos micropoços, levando à um erro de procedimento e, desta forma comprometendo a análise.

Emami-Karvani e Chehrazi (2011) determinaram a concentração inibitória mínima para nanopartículas de óxido de zinco frente a *S. aureus* e *E. coli* e verificaram que os valores da CIM foram respectivamente de 500 e  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Lakshmi *et al.* (2012) sintetizaram através de método químico nanopartículas de óxido de zinco e determinaram a CIM das mesmas para *S. aureus* e *E. coli*, sendo esses valores de  $3000 \mu\text{g mL}^{-1}$  para ambas as bactérias. Essa diferença na concentração inibitória mínima pode estar associada ao tamanho das nanopartículas, sendo que quanto menor for o tamanho, maior a relação área/volume e consequentemente a atividade antimicrobiana é potencializada e, a quantidade de bactérias utilizadas na análise.

De forma análoga ao realizado para as NPs-ZnO, realizou-se o ensaio de CIM para as NPs-TiO<sub>2</sub>, porém, como já mencionado, o TiO<sub>2</sub>, sem um agente externo fornecedor de luz, não apresenta atividade antimicrobiana eficaz, pois a fotoexcitação não acontece e o mecanismo inibidor fica comprometido, fato este, comprovado na presente análise. Salienta-se que, de forma semelhante ao ocorrido com as NPs-ZnO, não foi possível a utilização de uma solução mais concentrada para os testes de CIM, devido à saturação ser alcançada e ocorrer a deposição do material no fundo dos micropoços, comprometendo a análise.

Em estudo realizado por Maness *et al.* (1999), os autores incidiram energia luminosa sobre o TiO<sub>2</sub> e verificaram através do teste de plaqueamento em superfície que a concentração de TiO<sub>2</sub> que se mostrou mais eficaz para matar células de *E. coli* variando entre  $10^3$  e  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  foi de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Ainda, o estudo comprovou que concentrações de TiO<sub>2</sub> maiores que  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  reduzem a eficiência de morte para bactérias *E. coli*. Tal fato pode ser justificado pela turbidez causada pela elevada concentração de partículas do TiO<sub>2</sub> em suspensão e o baixo poder de penetração da radiação UV, o que reduz a intensidade da radiação pelo sistema.

#### 4. CONCLUSÃO

Quando avaliada a atividade antimicrobiana das NPs-ZnO pelo ensaio de difusão em meio sólido verificou-se que o valor do halo médio de inibição foi de  $1,1 \pm 0,06 \text{ cm}$  e  $0,7 \pm 0,15 \text{ cm}$  para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. A CIM das NPs-ZnO determinada no estudo para inibir *S. aureus* está entre  $391,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $783,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Já para *E. coli* não foi possível determinar a

CIM. Para as NPs-TiO<sub>2</sub>, não observou-se a manifestação da atividade antimicrobiana nem pelo teste de difusão em meio sólido e nem pela CIM.

O presente estudo demonstrou que as NPs-ZnO apresentam potencial aplicação para suporte em materiais cuja funcionalidade antimicrobiana deseja ser inserida. Ainda, sugere-se estudos para as NPs-TiO<sub>2</sub> fotoexcitadas, com intuito de verificar se há atividade antimicrobiana frente as bactérias testadas.

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Unochapecó pela estrutura disponibilizada para a realização deste trabalho. Agradecem também a CAPES pelo suporte financeiro e a *Kher Group* pelo fornecimento das nanopartículas de óxido de zinco usadas no estudo.

## 6. REFERÊNCIAS

BONILLA, A.M.; CERRADA, M.L.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M.; KUBACK, A.; FERRER, M.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Biodegradable polycaprolactone-titania nanocomposites: preparation, characterization and antimicrobial properties. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 14, p. 9249-9266, 2013.

BONILLA; A.M.; GARCÍA, M.F. Polymeric materials with antimicrobial activity. *Prog. Polym. Sci.*, v. 37, p. 281– 339, 2012.

BRAYNER, R., ILIOU, R. F., BRIVOIS, N., DJEDIAT, S., BENEDETTI, M. F., FIÉVET, F. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Lett.*, v. 6, p. 866-870, 2006.

CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptible tests; Approved standard – Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012a.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012b.

DIZAJ, S. M., LOTFIPOUR, F., BARZEGAR-JALALI, M., ZARRINTAN, M. H., ADIBKIA, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C*, v. 44, p. 278-284, 2014.

EMAMI-KARVANI, Z., CHEHRAZI, P. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram-positive and gram-negative bacteria. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 5, nº 12, p. 1368-1373, 2011.

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 Tech.*, v. 5, p. 1447-1464, 2012.

FU, G.; VARY, P.S.; LIN, C.T. Anatase TiO<sub>2</sub> nanocomposites for antimicrobial coatings. *J. Phys. Chem. B.*, v. 109, p. 8889-8898. 2005.

JOO, J.; KWON, S.G.; YU, T.; CHO, M.; LEE, J.; YOON, J.; HYEON, T. Large-scale synthesis of TiO<sub>2</sub> nanorods via nonhydrolytic sol-gel ester elimination reaction and their application to photocatalytic inactivation of *E. coli*. *J. Phys. Chem. B*, v. 109, p. 15297-15302, 2005.

KUMARI, M., KHAN, S. S., PAKRASHI, S., MUKHERJEE, A., CHANDRASEKARAN, N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *J. Hazard. Mater.*, v. 190, p. 613–621, 2011.

LAKSHMI, J., SHARATH, R., CHANDRAPRABHA, M.N., NEELUFAR, E., HAZRA, A., PATRA, M. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles. *J. Biochem. Tech.* v. 3, n° 5, p. S151-S154, 2012.

MANESS, P-C.; SMOLINSKI, S.; BLAKE, D.M.; HUANG, Z.; WOLFRUM, E.J.; JACOBY, W.A. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *J. Appl. Microbiol.*, v. 65, n° 9, p. 4094–4098, 1999.

MIRZA, E. H., IBRAHIM, W. M. A. B. W., MURPHY, B. P., DJORDJEVIC, I. Polyoctanediol citrate-zinc oxide nano-composite multifunctional tissue engineering scaffolds with anti-bacterial properties. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.*, v. 10, p. 415-428, 2015.

NAFCHI, A.M., ALIAS, A.K., MAHMUD, S., ROBAL, M. Antimicrobial, rheological, and physicochemical properties of sago starch films filled with nanorod-rich zinc oxide. *J. Food Eng.*, p. 511–519, 2012.

NARAYANAN, P. M., WILSON, W. S., ABRAHAM, A. T., SEVANAN, M. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against human pathogens. *BioNanoSci.*, v. 2, p. 329–335, 2012.

OHIRA, T.; YAMAMOTO, O.; IIDA, Y.; NAKAGAWA, Z. Antibacterial activity of ZnO powder with crystallographic orientation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, v. 19, p. 1407–1412, 2008.

PADMAVATHY, N., VIJAYARAGHAVAN, R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, v. 9, p. 1-7, 2008.

RAI, M., YADAV, A., GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, n° 1, p. 76–83, 2009.

SAWAI, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO,

MgO and CaO) by conductimetric assay. *J. Microbiol. Methods*, vol. 54, p. 177-182, 2003.

SINGH, S.; MAHALINGAM, H.; SINGH, P.K. Polymer-supported titanium dioxide photocatalysts for environmental remediation: A review. *Appl. Catal., A.*, v. 462–463, p. 178-195, 2013.

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.*, v. 7, n° 3, p. 219–242, 2015.

YAMAMOTO, O. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *Int. J. Inorg. Mater.*, v. 3, p. 643-646, 2001.